



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Милош З. Милосављевић

**УТИЦАЈ СИГНАЛНОГ ПУТА IL-33/ST2 НА РАЗВОЈ  
НЕКРОЗЕ КОД КАРЦИНОМА ДОЈКЕ**

докторска дисертација

Крагујевац, 2017. године

*Мојој мајци*

*Родитељима за љубав, подршку и стрпљење.*

*Захваљујем се ментору, проф. др Ивану Јовановићу на подршци, сугестијама и залагању у реализацији тезе, као и уживању на заједничком научном путу.*

*Посебно се захваљујем проф. др Миодрагу Лукићу на иницијативи, указаном поверењу, подршци и сугестијама у реализацији тезе, као и проф. др Небојши Арсенијевићу, пријатељу и учитељу, за стручну и очинску подршку, као и на укупном позитивном приступу којим ме је храбрио да истрајем у тешким тренуцима, током заједничког научног путовања.*

*Захваљујем се доц. др Слободанки Митровић на стручној и пријатељској подршци.*

*Свим колегама и пријатељима из Центра за Молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу као и Центра за патологију, Клиничког центра у Крагујевцу.*

*Велико хвала!*

## САДРЖАЈ

|   |    |
|---|----|
| УВОД .....  | 7  |
| 1.1. Сигнални пут IL-33/IL-33R .....  | 7  |
| 1.1.1. Биолошка функција IL-33R .....   | 7  |
| 1.1.2. Биолошка функција IL-33 .....  | 11 |
| 1.1.3. Механизми ослобођања IL-33 .....   | 11 |
| 1.1.4. IL-33 као нуклеарни фактор .....   | 13 |
| 1.1.5. IL-33 као алармин .....  | 15 |
| 1.1.6. IL-33 као цитокин .....  | 17 |
| 1.1.7. IL-33 као покретач ангиогенезе .....                                     | 19 |
| 1.1.8. Сигнални пут IL-33/IL-33R у патолошким стањима .....                     | 21 |
| 1.1.9. Сигнални пут IL-33/IL-33R у биологији тумора .....                       | 27 |
| 1.2. Карцином дојке .....   | 32 |
| 1.2.1. Инвазивни и <i>in situ</i> карцином дојке .....                          | 32 |
| 1.2.2. Инвазивни дуктални карцином (IDC) .....                                  | 33 |
| 1.2.3. Биологија карцинома дојке .....  | 33 |
| 1.2.4. Прогностички фактори у карциному дојке .....                             | 38 |
| 1.2.5. Маркери карцинома дојке .....  | 51 |
| 1.2.6. Молекулска класификација карцинома дојке .....                           | 57 |
| 1.2.7. Епидемиологија карцинома дојке .....                                     | 58 |
| 1.3. Ћелијска смрт. Врсте ћелијске смрти. ....                                  | 60 |
| 1.3.1. Апоптоза (основне карактеристике, механизми, биолошки значај) .....      | 60 |
| 1.3.2. Аутофагија (основне карактеристике, механизми, биолошки значај) .....    | 67 |
| 1.3.3. Некроза .....  | 69 |
| 1.4. Ангиогенеза .....  | 74 |
| 1.4.1. Биолошки значај и механизми физиолошке ангиогенезе .....                 | 75 |
| 1.4.2. Ангиогенеза у туморима .....   | 79 |
| 1.4.3. Механизми ангиогенезе у карциномима .....                                | 80 |
| 1.4.4. Улога хипоксије у ангиогенези тумора .....                               | 81 |
| 1.4.5. Медијатори ангиогенезе у туморима .....                                  | 82 |
| 1.4.6. Ендогени инхибитори ангиогенезе тумора .....                             | 86 |
| 1.4.7. Детекција и квантификација ангиогенезе (најчешћи маркери у пракси) ..... | 87 |
| 1.5. Други механизми васкуларизације тумора .....                               | 90 |
| 1.6. Мишји модел тумора дојке .....   | 93 |
| ЦИЉ СТУДИЈЕ .....   | 95 |

|  |     |
|--|-----|
| ПАЦИЈЕНТИ, МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....  | 96  |
| 3.1. Лабораторијске животиње .....   | 96  |
| 3.2. Одобрење етичког комитета .....   | 96  |
| 3.3. BALB/c мишеви са циљаном делецијом гена за IL-33R.....  | 97  |
| 3.4. Ћелијска линија мишјег тумора дојке 4T1 .....   | 99  |
| 3.5. Индукција примарног тумора дојке .....  | 99  |
| 3.6. Жртвовање, одвајање ткивног материјала и верификација индукованог тумора.....   | 101 |
| 3.7. Процена раста тумора у мишјем моделу тумора дојке.....  | 101 |
| 3.8. Фиксација ткива и бојење хематоксилином и еозином (H&E).....  | 101 |
| 3.9. Фотографисање ткивних пресека и аквизиција слика .....  | 102 |
| 3.10. Компјутерска квантификација некрозе у туморском ткиву.....   | 103 |
| 3.11. Испитивана популација .....  | 104 |
| 3.12. Имунохистохемијски метод бојења ткивних исечака калуљених у парафину .....   | 105 |
| 3.13. Имунохистохемијски метод бојења смрзнутих ткивних исечака .....  | 107 |
| 3.14. Контрола квалитета и специфичности имунохистохемијског бојења .....  | 108 |
| 3.15. Очитавање имунохистохемијске експресије испитиваних белега у мишјем и хуманом ткиву тумора дојке.....                              | 109 |
| 3.16. Евауација микроваскуларне густине (MVD) у карциномима хуманог порекла .....  | 110 |
| 3.17. Прогностички индекси у хуманом карциному дојке .....   | 111 |
| 3.17.1. Nottingham-ov прогностички индекс.....   | 111 |
| 3.17.2. Имунохистохемијски прогностички индекс.....  | 111 |
| 3.18. Снага студије и величина узорка.....   | 112 |
| 3.19. Статистичка обрада података .....  | 113 |
| РЕЗУЛТАТИ.....   | 114 |
| 4.1. Делеција гена за IL-33R успорава раст примарног 4T1 тумора и повећава поље туморске некрозе .....                                   | 114 |
| 4.2. Експресија IL-33 у туморским ћелијама је у позитивној корелацији са величином 4T1 тумора дојке у IL-33R <sup>+/+</sup> мишева ..... | 122 |
| 4.3. Експресија IL-33 и VEGF-а је у негативној корелацији са туморском некрозом .....  | 126 |
| 4.4. Експресија IL33, IL-33R и VEGF-а је у негативној корелацији са некрозом у хуманом карциному дојке .....                             | 129 |
| 4.5. VEGF је у позитивној корелацији са MVD у перинекротичном рубу хуманог карцинома дојке.....  | 132 |
| 4.6. Експресије IL-33 и IL-33R су маркери туморске некрозе. Некроза је индикатор преживљавања код пацијената са карциномом дојке.....    | 134 |
| 4.7. Експресије IL-33 и IL-33R у туморским и ћелијама туморске строме хуманог карцинома дојке.....                                       | 141 |
| 4.8. Некроза је параметар лоше прогнозе у хуманом карциному дојке.....   | 145 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.9. Висока експресија IL-33 у туморским ћелијама карцинома дојке указује на биолошки мање агресивну форму тумора .....                             | 151 |
| 4.10. Висока експресија IL-33 у стромалним ћелијама карцинома дојке праћена је појачаном експресијом p53 у туморским ћелијама .....                 | 154 |
| 4.11. Висока експресија IL-33R у туморским ћелијама карцинома дојке указује на биолошки мање агресивну форму тумора .....                           | 157 |
| 4.12. Висока експресија IL-33R у ћелијама строме указује на биолошки агресивну форму карцинома дојке .....  | 160 |
| ДИСКУСИЈА.....  | 163 |
| 5.1 <i>In vivo</i> ефекат одсуства рецептора за IL-33 на настанак некрозе у тумору дојке .....  | 164 |
| 5.2. Улога експресије IL-33 и IL-33R у настанку некрозе и ангиогенезе у хуманом карциному дојке. Повезаност са клиничкопатолошким параметрима ..... | 171 |
| ЗАКЉУЧЦИ .....  | 191 |
| СКРАЋЕНИЦЕ.....   | 192 |
| ЛИТЕРАТУРА.....   | 198 |
| ПРИЛОГ .....  | 262 |
| 8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА .....   | 262 |
| 8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION .....  | 266 |
| 8.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА .....   | 270 |
| 8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА .....   | 271 |
| 8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS .....   | 272 |
| 8.6. ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ .....   | 273 |

## УВОД

Интегративни механизми ћелијских комуникација подразумевају и групу протеинских медијатора-citoкина, који су одговорни како за пролиферацију и диференцијацију хематопоетских ћелија тако и за њихову комуникацију током активације и ефеката у циљним ткивима. У мноштву биолошки активних супстанци, посебно место заузима плејотропни цитокин интерлеукин-33 (енгл. *Interleukin-33*, IL-33), заштитник баријера и стимулатор ћелија урођене и стечене имуности, који на више различитих начина регулише имуноинфламацијске и имунометаболичке процесе. Претходна истраживања су показала да делеција гена који кодира рецептор интерлеукина-33 (енгл. *Interleukin-33 receptor*, IL-33R, IL-1RL1, ST2) подстиче антитуморску имуност. Циљ овде приказаног истраживања је да се испита значај и улога сигналног пута IL-33/IL-33R у процесима некрозе и ангиогенезе у карциному дојке. У уводном делу ове студије приказани су грађа и функција молекула IL-33R и IL-33, клиничке, патолошке и епидемиолошке карактеристике карцинома дојке, као и биолошки ефекти сигналног пута IL-33/IL-33R у онкогенези.

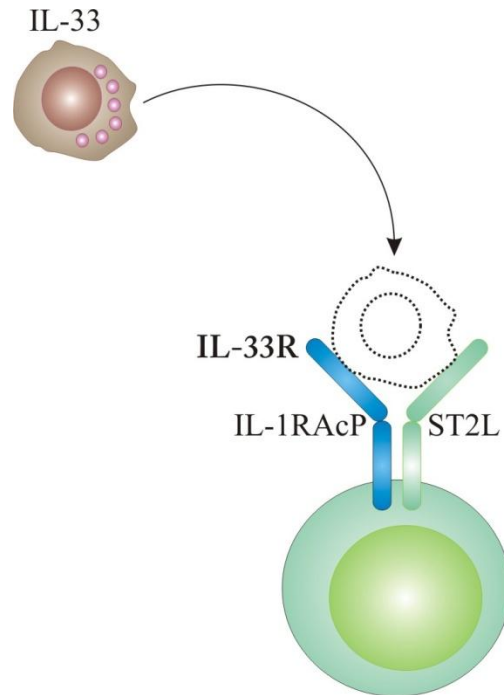
### 1.1. Сигнални пут IL-33/IL-33R

#### 1.1.1. Биолошка функција IL-33R

Рецептор за IL-33 је хетеродимерски комплекс сачињен од молекула ST2L и помоћног протеина рецептора за IL-1 (енгл. *Interleukin-1 Receptor Accessory Protein*, IL-1RacP), заједничке компоненте рецептора за више цитокина фамилије IL-1 (Слика 1). ST2 кодира истоимени протеин који је члан фамилије IL-1R и првобитно је идентификован на мишјим фибробластима (1-3). Као и сви гени ове фамилије, ST2 је конзервисан генски локус лоциран на хуманом хромозому 2 и мишјем хромозому 1 заједно са другим генима за рецептор сврстане у породицу рецептора за IL-1, укључујући и оне за IL-1 (IL-1R1, рецептор „мамац“ IL-1R2), IL-18 (IL-18R1, IL-18RAP) и IL-36 (IL-1RL2) (4).

Алтернативна обрада mRNA за синтезу ST2 генерише следеће изоформе протеина ST2:

- трансмембранску: ST2L
- секретовану-солубилну: sST2
- варијантне изоформе: ST2V и ST2VL



**Слика 1. Структура и биолошка функција IL-33R.** IL-33R је хетеродимерски комплекс грађен од ST2L молекула и помоћног протеина, IL-1RAcP, заједничког за више цитокина фамилије IL-1. IL-33 је најбоље описани лиганд за овај рецептор.

Код мишева, ST2 кодира две mRNA (енгл. *Messenger RNA*): краћу (2,7 kb; енгл. килобазних парова) за солубилну sST2 изоформу и дужу (5 kb) за трансмембранску изоформу ST2L. Уз ове две, хумани ген ST2 кодира још две mRNA и то за варијанте ST2V и ST2VL (5). Солубилни sST2 је идентичан екстрацелуларном региону ST2L осим што поседује додатних 9 аминокиселина на С крају молекула (6). Солубилну форму молекула ST2 стварају различити типови ћелија: фибробласти, макрофаги, Th2 лимфоцити (енгл. *T helper*), ћелије карцинома дојке, многе ембрионалне ћелије (6-10) док је мембранска форма експримирана на мастоцитима, базофилним и еозинофилним полиморфо-нуклеарним леукоцитима, дендритским ћелијама, макрофагима, Th2 лимфоцитима, NK (енгл. *Natural killer cells*) и NKT ћелијама (енгл. *Natural killer T cells*), регулаторним Т лимфоцитима, мијелоидним супресорским ћелијама, урођеним лимфоидним ћелијама (1,9,11). Карактеристично је да, иако је члан фамилије рецептора IL-1R, ST2L не везује IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-1Ra (12).



Транскрипцију гена за ST2 контролишу два посебна промотора (покретача). „Горњи“ управља транскрипцијом у ћелијама хематопоетске лозе (мастоцити), док „доњи“ промотор регулише експресију у фибробластима (9). Регулација експресије IL-33R остала је еволутивно конзервиран процес (од миша до човека), обзиром да поменута два промотора контролишу његову експресију и у хуманим ћелијама (13). Присуство IL-33R на различитим типовима ћелија указује на важну улогу у многим биолошким системима. Поред регулације ћелијског раста и ембриогенезе, присуство IL-33R у линијама хематопоетских ћелија и његова хомологност са фамилијом IL-1R указује на значајну улогу и у имунском систему.

Студије које су проучавале улогу *ST2L* у имунском систему показале су да многе ћелије имунског система (макрофаги, мастоцити, Т лимфоцити) експримирају овај рецептор (14). IL-33 се везује за ST2L који је члан суперфамилије Toll like рецептора (енгл. *Toll like receptor*, TLR). Рецептори налик Toll-у чине фамилију трансмембранских сигналних протеина који, делујући као сензори за продукте микроорганизама, започињу антимикуробни имунски одговор. Код сисара је, до данас, описано 12 TLR гена који кодирају исти број гликопротеина са екстрацелуларним делом хомологним са TIR (енгл. *Toll-IL-1 receptor*). TIR домен садржи конзервирану протеинску секвенцу, која је осим у овим рецепторима присутна и у цитоплазматском делу рецептора тип 1 за интерлеукин-1 (енгл. *Interleukin 1 receptor, type I*, IL-1R1). Цитокини који припадају фамилији IL-1 остварују своју функцију везујући се рецепторе припаднике исте фамилије (IL-1R), а који припадају суперфамилији Toll-like/IL-1 рецептора (TLR-IL-1R). Структура ванћелијског дела комплекса IL-33/IL-33R је разјашњена (15). Екстрацелуларни део IL-33R се састоји од три домена слична имуноглобулину, попут IL-1R1. Прва два дистална домена (D1D2) су међусобно спојена и повезана са трећим, мембранским, доменом (D3). IL-33 се за овај комплекс везује између D1D2 и D3 домена (15). Овако повезани IL-33 и IL-33R граде хетеродимерски комплекс IL-33/IL-33R на коме је експримиран помоћни протеин IL-1R (IL-1RacP). IL-1RacP је заједничка сигнална компонента рецептора за IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  и IL-36 $\gamma$ . Активација IL-1RacP, преко TIR домена, појачава већ покренути сигнализацију преко рецептора за MyD88 (енгл. *Myeloid differentiation primary response gene 88*), IRAK (енгл. *Interleukin-1 receptor-associated kinase*), IRAK4 и TRAF6 (енгл. *Tumor necrosis factor receptor associated factor 6*), активира MAPK (енгл. *Mitogen-activated*

*protein kinase*), ERK1/2 (енгл. *Extracellular signal-regulated kinases 1/2*), p38 и JAK2 (енгл. *Janus kinase 2*) као и транскрипциони фактор AP-1 (енгл. *Activator protein 1*) и на крају деградира IκBα (енгл. *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*) што покреће транслокацију NF-κB (енгл. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) у једро. Низ ових догађаја као крајњу последицу има продукцију проинфламацијских медијатора (Слика 2) (16,17). Поред тога, сигнализација путем IL-33R промовише развој Th2 лимфоцита и поларизацију имунског одговора у правцу Th2, секрецијом IL-4, IL-5 и IL-13. Сигнализација IL-33 у неким условима може захтевати JAK2 активацију (18). Како су ови сигнални путеви конзервирани сигнализацијом путем TLR, IL-1 и IL-18, биолошки ефекат IL-33 је условљен експресијом IL-33R. Сигнални пут IL-33R може бити супримиран SIGIRR (енгл. *Single Ig IL-1-related receptor*) молекулом, сличном IL-1R (19). Улога раније поменутих инхибитора MyD88 попут TNFAIP3 (енгл. *Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3*), IRAK-M као и чланова SOCS (енгл. *Suppressor of cytokine signaling*) породице у инхибицији IL-33/IL-33R сигнализације је још увек непозната (20).

*sST2* је кратка форма којој недостају продукти три завршна егзона, који кодирају трансмембрански и интрацелуларни део молекула, па тако настаје секреторни солубилни протеин и који се састоји само од екстрацелуларног домена који се везује за цитокин. *sST2* је присутан у хуманом серуму (21,22). Овакав солубилни рецепторски „мамац“ негативно регулише биолошке ефекате IL-33, тако што га везује и инактивише његову системску улогу (Слика 2) (23). Концентрација *sST2* се повећава услед инфламацијских стимулуса који настају током кардиоваскуларних, хематолошких и алергијских болести потенцијално ограничавајући штетне ефекте повећања системског IL-33 (24-28). Студије које су се бавиле проучавањем хуманог генома су идентификовале различите подврсте гена за ST2 (IL-1RL1) које су повезане са променљивим концентрацијама серумског *sST2* (29) чиме могу да модулирају ефекте IL-33 посредовани одговор. Функција ST2V још увек неразјашњена а сама изоформа рецептора је присутна у гастроинтестиналном тракту у људи.

Код кичмењака, рецептори цитокинске породице IL-1 су присутни у оних врста у којих постоје и њихови цитокински лиганди што указује на истовремени еволутивни развој. Иако ST2 показује сличну расподелу, његов лиганд IL-33 је вероватно настао касније

током еволуције, јер је присутан у сисара али не и код осталих кичмењака (30). Иако постоји ово неслагање, до данас код мишева и људи нису идентификовани други лиганди за IL-33R и IL-33 је најбоље описани лиганд за овај рецептор (Слика 1).

### 1.1.2. Биолошка функција IL-33

IL-33 је идентификован, када су *Schmitz* и сарадници анализирајући чланове IL-1 фамилије открили лиганд за IL-33R (17). Активација IL-33R потенцира Th2 имунски одговор (17). Детаљније студије у вези са овим цитокином су указале на идентичност IL-33 и нуклеарног фактора венула високог ендотела (енгл. *Nuclear factor of high endothelial venules*, NF-HEV), који је повезан са регулацијом транскрипције, истовремено функционишући као цитокин и као нуклеарни транскрипциони фактор (31). IL-33 се конститутивно експримира у многим ткивима (плућа, мозак, кожа, кичмена мождина), при чему су његови главни извори фибробласти, ендотелне и епителне ћелије (32,33).

Овај цитокин је локализован у једру (31,34). Састоји се од N краја, који је одговоран за његову једарну локализацију и C терминал који је сличан IL-1 преко кога се овај цитокин везује за свој рецептор (17,31,34,35). N терминал IL-33 садржи везујући мотив који гради H2A-H2B (енгл. *Histone2A-Histone2B*) димер на нуклеозомалној површини и поспешује формирање хроматина (34).

IL-33 се продукује као прекурсор односно у форми пуне дужине (*full-length form*) (270 аминокиселина код људи и 266 код мишева) са пресавијеним делом као код IL-1 на C крају (36). N терминални домен је неопходан за нуклеарну транслокацију - уколико тај домен недостаје IL-33 не може да уђе у једро (31,34).

### 1.1.3. Механизми ослобођења IL-33

IL-33 је производ ћелија ткива пре него активираних леукоцита који су класичан извор проинфламаторних цитокина, иако су активирани леукоцити значајан извор IL-33 (37). Различите ћелије могу бити стимулисане да произведу и ослободе IL-33 (37). Како би ослободиле IL-33, ћелије имунског система морају бити стимулисане активацијом TLR или дејством проинфламаторних цитокина (37). У великом броју случајева IL-33 је детектован само у једру различитих типова ћелија уз немогућност индукције његовог

ослобађања (38). Механизмом позитивне повратне спреге, IL-33 стимулише сопствену продукцију и ослобађање у макрофагима костне сржи и дендритским ћелијама мишева (39). Сличан ауторегулаторни механизам је идентификован у макрофагима коже мишева (40). Цитокини, попут TNF (енгл. *Tumor necrosis factor superfamily*, TNF), IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-4 и агониста TLR, позитивно регулишу експресију IL-33, док улога IFN- $\gamma$  (енгл. *Interferon- $\gamma$* ) у контроли експресије и ослобађања IL-33 није јасна (41-47). Улога IFN- $\gamma$  у регулацији продукције и ослобађања IL-33 захтева нова испитивања, посебно јер је познато да у различитим околностима IL-33 може да стимулише продукцију IFN- $\gamma$  и обрнуто (48). До данас, свеобухватна слика о продукцији и ослобађању IL-33 из различитих ћелија није формирана. Детаљна анализа промотера IL-33 у различитим типовима ћелија може у значајној мери да разјасни механизме регулације и продукције IL-33 на молекулском нивоу. Неки од испитиваних индуктора продукције и ослобађања IL-33 су апликовани, током дужег временског периода и у високим дозама, због чега се не може искључити ћелијска смрт као фактор који доприноси или проузрокује продукцију и ослобађање IL-33 (37). Иако је повећана концентрација IL-33 детектована у серуму и другим телесним течностима оболелих од многих болести, мало се зна о томе које су форме IL-33 присутне и код оболелих и код здравих испитаника. Код пацијената са хроничном инсуфицијенцијом срца присутне су обе форме IL-33, док је код здравих контролних испитаника детектована само обрађена (краћа) форма IL-33 (49). Време полуживота секретованог IL-33 представља потпуну непознаницу што отежава примену овог цитокина као значајног прогностичког и дијагностичког параметра у великом броју болести.

Код интактних механичких баријера које сачињавају кератиноцити, епителне ћелије, као и фибробласти, фиброцити и глатко-мишићне ћелије, међућелијски контакти емитују сигнал који иницира конститутивну продукцију *full-length* IL-33 али не и његово ослобађање (37). У ћелијама механичке баријере, *full-length* IL-33 је стационаран у једру где контролише експресију гена и укључен је у механизме задужене за стање мировања ових ћелија (37). Након озледе ова форма IL-33 се ослобађа и обавља функцију алармина (37). У зависности од локације баријере (кожа, плућа, црева), вероватни узрок нарушавања је другачији и креће се од бактерија, гљивица, вируса све до хелминта (37). Иако се окидачи разликују, јасни су основни принципи којим IL-33 алармира околне ћелије (37). Структуре које исказују различити микроорганизми активирају рецепторе за препознавање молекулских

образаца присутних на околним ћелијама (37). *Full-length* IL-33 се везује и активира ћелије које експримирају IL-1R3 и IL-1R4 попут мастоцита, дендритских ћелија, макрофага и тип 2 имунских ћелија (37). Активирани ћелије ослобађају протеазе које разграђују везивно ткиво и на тај начин олакшавају агрегацију леукоцита у инфламисаном ткиву. Поред тога, протеазе обрађују *full-length* IL-33 чиме повећавају његову биолошку активност. Иницијално, локални имунски одговор започиње мали број аларминских IL-33 који може бити појачан садејством молекула CD117 (енгл. *Mast/stem cell growth factor receptor; proto-oncogene c-Kit*) и IL-33R комплекса. Након озледе епителне ћелије ослобађају цитокине попут тимусног стромалног лимфопоетина (енгл. *Thymic stromal lymphopoietin*, TSLP) и IL-25 (50,51), који регрутују лимфоците из крвотока и доводе их до места акутне инфламације. Активирани ћелије, такође продукују и активно ослобађају IL-33 што значајно доприноси рапидном порасту његове локалне концентрације (52-56). Ослобођен као алармин, IL-33 постаје цитокин са свим својим системским испољавањем. Паралелно са овим процесима, IL-33 покреће поступак репарације и зарастања ткива како би се осигурала брза резолуција повреде. Везујући се за IL-33R, IL-33 може директно да активира локалне и инфилтришуће фибробласте чиме стимулише процес репарације баријере (57-59). Као алармин, IL-33 је кључни иницијатор акутног локалног инфламацијског одговора и репарације ткива.

#### 1.1.4. IL-33 као нуклеарни фактор

Функција и улога нуклеарног IL-33 је превасходно описана и проучавана у хуманим ендотелним ћелијама (60,61). Студије су показале да је IL-33 локализован у једру и да се синтетише искључиво у стању мировања, унутар непролиферујућих хуманих ендотелних ћелија, посредством Notch лиганда (32,62,63). Корелација између смањене експресије IL-33 и убрзане ћелијске пролиферације, указује да се IL-33 експримира у непролиферујућим ћелијама са очуваним међућелијским везама које функционишу као механичка баријера (32,37,63). IL-33 производе ћелије које су укључене у одржавање механичких баријера попут кератиноцита, епителних ћелија плућа и црева, фибробласта, фиброцита и глаткомишићних ћелија. Прекомерна експресија *full-length* IL-33 помоћу промотера цитомегаловируса (енгл. *Cytomegalovirus*, CMV) резултира нуклеарном локализацијом IL-33 и ослобађањем биоактивног IL-33 (64,65). Истраживања показују

евидентне разлике у конститутивној и индукованој експресији IL-33 људи и мишева. Две главне разлике се преваходно тичу продукције IL-33 у ендотелним ћелијама и кератиноцитима. Конститутивна продукција IL-33, код људи се обавља у стању мировања ендотелних ћелија и његова продукција опада након стимулације проинфламацијским цитокинима (32,61,63). Код мишева, у ендотелним ћелијама није запажена конститутивна продукција IL-33, али може бити индукована различитим инфламацијским процесима (41,66). Конститутивна експресија IL-33 је присутна у епителним ћелијама мишева и његова продукција значајно опада током акутне инфламације (17,32,41,66-68). Супротно овоме, кератиноцити хумане коже показују слабу или потпуно одсутну експресију IL-33 коју појачава присуство IFN- $\gamma$  током запаљења (41). Без обзира на порекло, након синтезе у цитосолу, IL-33 се транслоцира у једро где се везује за хроматин. У фибробластима мишева IL-33 је локализован на еухроматину и цитоплазматским везикулама везаним за мембрану. Динамички флуks између једра и цитоплазме зависи од функције нуклеарних пора, што указује на механизам ослобађања (69).

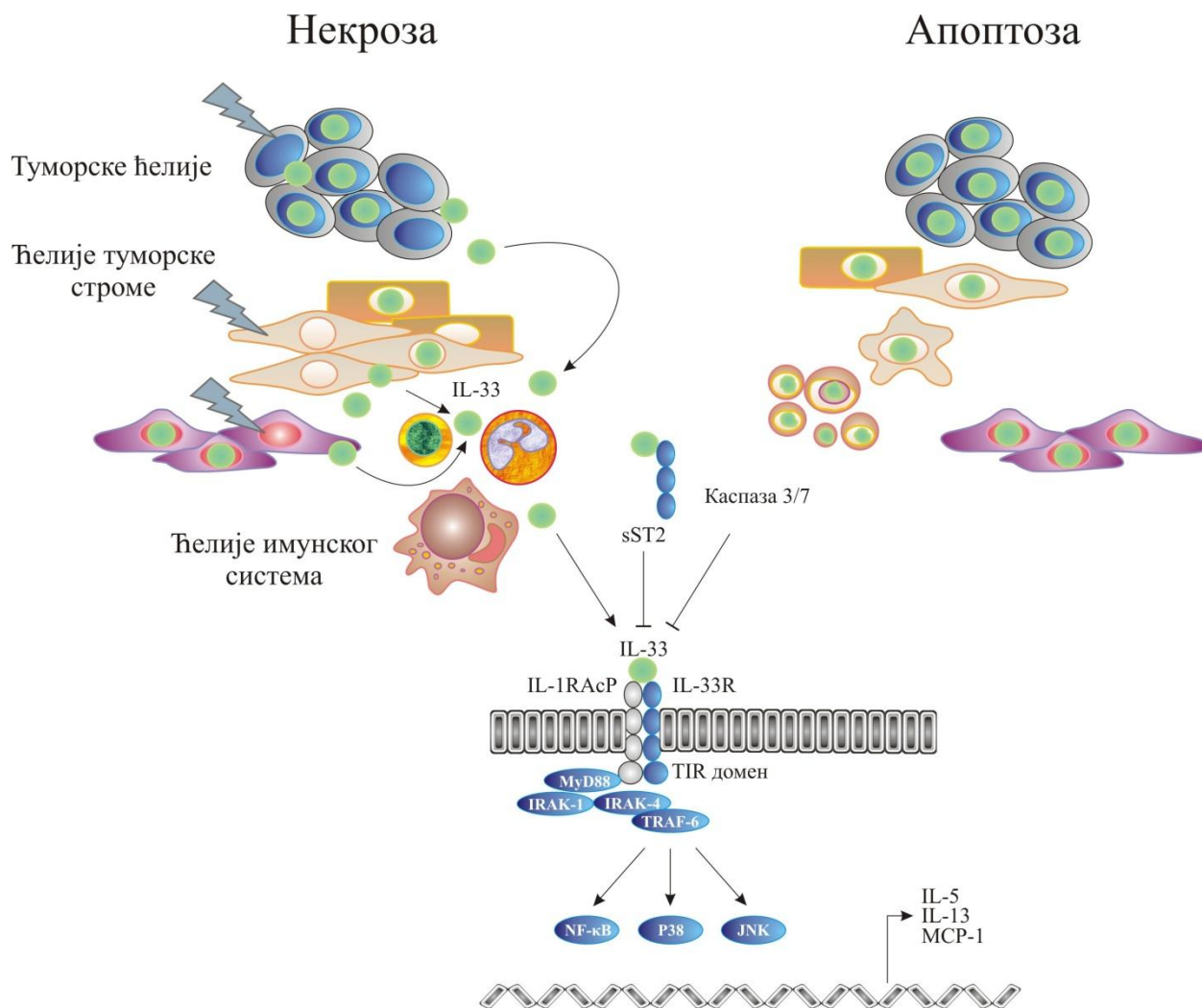
Истраживања у којима су коришћени мишеви у којима изостаје синтеза нуклеарне секвенце IL-33, показала су да ендогени промотери појачавају конститутивно ослобађање биоактивног IL-33 (70). Подаци указују да интрануклеарни IL-33 контролише сопствену продукцију и ослобађање у ауторегулаторном маниру. Интрацелуларни IL-33 (енгл. *Intracellular interleukin-33*, icIL-33) може да регулише експресију гена различитим механизмима. Прво, icIL-33 модулира структуру хетерохроматина и регулише генску експресију (31,34,71). На другом месту, icIL-33 може обављати функцију транскрипционог фактора везујући се за репресор транскрипције, хистон метилтрансферазе SUV39H1 и смањује експресију солубилних IL-1R4 и IL-6 (31,72). Треће интеракција icIL-33 са транскрипционим фактором NF- $\kappa$ B инактивише овај фактор и смањује проинфламацијске сигнале (73). Друге студије су icIL-33 идентификовале као регулатор транскрипције p65 субјединице NF- $\kappa$ B транскрипционог фактора и показано је да се icIL-33 везује у p65 промотерском региону (74). Истраживање у коме су епителне ћелије езофагуса претходно третиране IFN- $\gamma$  указује да једарни IL-33 регулише продукцију проинфламацијских цитокина попут IL-6 и IL-8 (75).

Код оболелих од мултипле склерозе показана је веза између icIL-33 и активности хистонске деацетилазе-3 што указује на могући ефекат генске регулације и на епигенетском нивоу (76). Претпоставља се да једарни IL-33 утиче на експресију гена помоћу више молекулских механизма који ову функцију обављају заједнички, као и да је на овај начин регулисана експресија гена условљена типом ћелија. Нека истраживања указују на полиубиквитацију и последичну деградацију icIL-33 помоћу протеозома (77). Такође, неопходно је да се разјасни да ли IL-33 након синтезе остаје увек у једру или постоје разлике између хомеостатског и индукованог проинфламацијског IL-33.

IL-33 на основу своје интрацелуларне функције показује сличности са IL-1 $\alpha$ . IL-1 $\alpha$  је локализован у једру, везан за хроматин и вероватно модулира експресију различитих гена (78), док IL-33 конститутивно производе ћелије ткива укључене у одржавање механичких баријера и учествује у регулацији експресије гена.

### 1.1.5. IL-33 као алармин

Након оштећења ћелија IL-33, локализован у једру, се пасивно ослобађа због чега је нуклеарни IL-33, попут HMGB1 (енгл. *High mobility group box 1*) и IL-1 $\alpha$  означен као алармин или молекулски образац повезан са оштећењем (енгл. *Damage-associated molecular patterns, DAMP*) (79). Прерада *full-length* IL-33 ослобађеног из ћелија услед некрозе није могућа јер је ова форма попут IL-1 $\alpha$  биолошки активна (Слика 2) (35,80-82). Прве студије су указивале да, аналогно пуној форми IL-1 $\beta$  и IL-18, каспаза-1 обрађује *full-length* IL-33 до зреле биоактивне форме (hIL-33<sub>112-270</sub>) (17). Касније студије су показале да каспаза-1 нема ову функцију али да биоактиви IL-33 обрађују апоптотске каспазе 3 или 7 до биолошки инактивних фрагмената (Слика 2) (35,81,83). У строго контролисаном експерименталном систему у коме су све остале протеазе елиминисане, доказано је да каспаза-1 није у стању да обради про-IL-33 (83). Сумирањем резултата из публикованих истраживања закључује се да каспаза-1 не активира *full-length* IL-33 али да је каспаза-3 и каспаза-7 инактивирају током апоптозе, као и да се ослобађа услед ћелијске смрти која настаје као последица механичке повреде или некрозе (84) (Слика 2).



**Слика 2. Ослобађање IL-33 и сигнализација преко IL-33R.** Услед некрозе, туморске и ћелије туморске строме ослобађају IL-33 који се везује за IL-33R на туморским, ћелијама имунског система, фибробластима, епителним и ендотелним ћелијама чиме активира сигнализацију IL-33/IL33R. Апоптотске ћелије не ослобађају биолошки активан IL-33. Проапоптотске каспазе 3 и 7 разграђују IL-33 до биолошки неактивних фрагмената чиме инхибирају активацију сигнализације IL-33/IL33R. Везивање IL-33 за IL-33R условљава нисходну активацију MyD88, IRAK-1/4, ERK1/2, p38 и JAK2, као и транскрипционог фактора NF-κB и последичну продукцију проинфламацијских медијатора. Поред проапоптотских каспаза солубилна форма ST2 рецептора обавља функцију „мамац“ рецептора, спречавајући да IL-33 оствари биолошку функцију

У одсуству ћелијске смрти, ендотелне ћелије и фибробласти срца ослобађају биолошки активан IL-33, услед механичког стреса (69,85). Исти механизам секреције је присутан код оптерећења миокарда услед хипертензије, што проузрокује снажну системску инфламацију код мишева (85). Повећане серумске концентрације IL-33 су детектоване у многим болестима, а *in vitro* стимулисане различите ћелија ослобађају биоактивну форму



IL-33 што указује на постојање молекулског механизма за контролу ослобађања овог цитокина. Као и већина других чланова породице цитокина IL-1, IL-33 не поседује сигналну секвенцу која овај цитокин усмерава ка ендоплазматични ретикулум-Голџи секреторном путу. Молекулски механизми ослобађања још увек нису потпуно јасни (86) и могу да укључују различите типове секреторних везикула, као што је то случај са IL-1 $\beta$  (69,87).

Протеазе ослобођене из других ћелија, попут неутрофила, макрофага или мастоцита, обрађују *full-length* IL-33 до форми које показују разноврсност у структури N краја (hIL-3395–270, hIL-3399–270, hIL-33109–270) и које карактерише до 30 пута снажнија биолошка активност у односу на *full-length* IL-33 (87,88). Ниска потенција малог броја аларминских молекула IL-33 се брзо повећава на месту инфламације услед протеолизе N термина. Као и код осталих чланова породице цитокина IL-1 биоактивност се губи након разградње основне структуре (87). Протеаза попут химазе, ослобођена из активираних мастоцита деактивира IL-33 и на тај начин ограничава трајање сигнала иницираног овим алармином (89). Поред описане протеолитичке разградње, истраживања су указала и на нове облике инкапсулације екстрацелуларног IL-33, па тако формирањем два унутармолекулска дисулфидна моста (C208-C259 и C227-C232 у хуманом IL-33) и следственом оксидацијом везе IL-33 и IL-33R (IL-1R4) активност IL-33 нестаје унутар неколико минута (90). Укратко, *full-length* IL-33 ослобођен из оштећених или некротичних ћелија је биолошки активан, након чега се његова активност у инфламисаном ткиву повећава ограниченом протеолизом N термина. Активност се губи услед разградње или оксидације C краја тетрахедронске структуре.

#### 1.1.6. IL-33 као цитокин

IL-33 је првобитно означен као лиганд мембранског рецептора ST2 (ST2L, IL-33R) и цитокин што потенцира Th2 имунски одговор и важан медијатор репарације епителних ткива (91). Новије студије су показале да осовина IL-33/IL-33R може промовисати и Th1 имунски одговор у зависности од присуства IL-12 (23). Према томе, улога овог сигналног пута у запаљењским болестима може бити заштитна али и штетна у различитим болестима (92,93). IL-33 игра важну улогу у запаљењу и повезан је са многим болестима укључујући

темпорални артеритис (артеритис циновских ћелија) (94), билијарну атрезију (95) и хроничну опструктивну болест плућа (96). Међутим, у малом броју студија испитивана је улога осовине IL-33/IL-33R у карциномима а посебно је мало позната улога IL-33 у биологији карцинома дојке.

IL-33 може да модулира функцију свих ћелија које експримирају IL-33R. Показано је да се IL-33R специфично експримира на Т лимфоцитима и представља важан молекул Th2 имунског одговора (8). Делујући на наивне Т лимфоците, IL-33 подстиче диференцијацију Th2 лимфоцита, чак и у одсуству IL-4 (97). Стимулацијом ефекторских Th2 лимфоцита, IL-33 подстиче продукцију IL-4, IL-5 и IL-13, као и хемотаксу Th2 лимфоцита (98,99).

Недавно је показано да и NKT ћелије експримирају рецептор IL-33R (98). Иако је очекивано да усмери поларизацију у Th2 смеру, третман IL-33 изазвао је продукцију и Th1 и Th2 цитокина (98). IL-33 је снажан активатор мастоцита, базофила и еозинофила. Дејство IL-33 на мастоците изазива продукцију IL-5, IL-13, фактора стимулације раста гранулоцита и моноцита (енгл. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) и TNF- $\alpha$  (100). IL-33 такође, подстиче и сазревање, као и преживљавање ових ћелија у инфламисаном ткиву (100). Базофилни гранулоцити након стимулације овим цитокином секретују друге цитокине (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, GM-CSF) (98). Уз то, IL-33 функционише као хемоатрактант базофила (98). Еозинофилни гранулоцити третирани IL-33 појачано стварају IL-8 и имају продужен животни век (101).

IL-33 активира ћелије које презентују антиген (енгл. *Antigen presenting cells*, APC). Примена IL-33 појачава алтернативну активацију макрофага и стимулише продукцију хемокина CCL17 (енгл. *Chemokine (C-C motif) ligand 17*) и CCL24 (енгл. *Chemokine (C-C motif) ligand 24*) (102). Група аутора је показала да IL-33 подстиче развој дендритских ћелија (103). Ћелије добијене након стимулације IL-33 су функционално незреле уз смањен капацитет наивних Т лимфоцита али са могућношћу поларизације имунског одговора у Th2 смеру (52).

### 1.1.7. IL-33 као покретач ангиогенезе

Проангиогену функцију IL-33, остварује независно од васкуларног ендотелног фактора раста (енгл. *Vascular endothelial growth factor*, VEGF) и игра важну улогу у формирању капилара и крвних судова (104). *Theoharides* и сарадници (105) су показали да IL-33 директно олакшава експресију и секрецију VEGF-а из мастоцита. Такође, студија *Stojkovic*-а и сарадника (106) је указала да IL-33 индукује пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија преко IL-33R експримираног на ендотелним ћелијама. Овај ефекат је посредован појачавањем активности урокиназног активатора плазминогена (енгл. *Urokinase plasminogen activator*, u-PA) (106).

IL-33 покреће ангиогенезу и повећава пермеабилност ендотела посредством азот монооксида (енгл. *Nitric oxide*, NO) (104). *Choi* и сарадници (104) су показали да IL-33 појачава продукцију NO и то кроз појачану активност eNOS (енгл. *Endothelial Nitric Oxide Synthase*). IL-33 се везује за рецепторски комплекс ST2L/IL-1RacP на ендотелним ћелијама и преко адаптерског протеина TRAF6 активира бројне сигналне путеве укључујући NF- $\kappa$ B, MAPK и PI3K/Akt/mTOR (енгл. *Phosphatidylinositol-3-kinases/Protein kinase B (AKT)/mechanistic target of rapamycin*). Сигнална каскада PI3K/Akt на концу активира eNOS. Повећане концентрације IL-33 у плазми могу директно да активирају ендотелне ћелије и тиме покрену ангиогенезу и вазодилатацију. IL-33 значајно повећава продукцију и присуство u-PA на површини хуманих ендотелних ћелија потенцирајући његову ангиогену улогу (106). Инхибиција IL-33, коришћењем IL-33R дефицијентних мишева смањује продукцију u-PA у ендотелним ћелијама, што указује да IL-33 овај ефекат остварује везивањем за IL-33R (106). *Stojkovic* и сарадници (106) су по први пут показали да је овај процес u-PA зависан и да изостаје након блокаде његовог рецептора. Блокада u-PA указује да IL-33 ангиогену активност остварује управо преко овог молекула, а независно од ткивног активатора плазминогена (енгл. *Tissue plasminogen activator*, t-PA) као и комплекса матрикс-металопротеиназа (енгл. *Matrix metalloproteinases*, MMP) и ткивних инхибитора металопротеиназа (енгл. *Tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMP) (106). Поред u-PA, IL-33 као IL-1 и TNF (107,108) повећава ниво инхибитора активатора плазминогена (енгл. *Plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1). IL-33 и u-PA су присутни у ендотелним ћелијама атеросклеротских плакова, а нивои mRNK за IL-33, sST2 и ST2L

корелирају са mRNK за u-PA (106). Проучавањем хуманог атеросклеротског ткива, иста студија је показала корелацију у експресији u-PA и IL-33 што указује да у хроничном запаљењу попут атеросклеротских лезија, IL-33 може бити укључен у покретање неоваскуларизације посредоване u-PA (106). Раније студије су показале да IL-33 индукује инфламацију ендотелних ћелија (109). Према томе, IL-33 се ослобађа након оштећења ткива и укључен је у ангиогенезу посредовану u-PA која је раније повезивана са процесом инфламације (110).

*Theoharides* и сарадници (105) су показали да IL-33 појачава секрецију VEGF-а из леукемијских ћелија и нормалних мастоцита и то појачаном акумулацијом супстанце P (енгл. *Substance P*, SP). SP је снажан медијатор запаљења (111,112) који своје дејство делимично остварује након активације мастоцита (113,114). Укључен је у патогенезу псоријазе (115,116) коју карактерише повећана васкуларизација епидерма, хиперпролиферација кератиноцита и снажна запаљењска реакција (117). SP позитивна нервна влакна су у псоријатичним лезијама гушћа уз повећан број мастоцита (118-121). IL-33, као и IL-1, индукује мастоците да секретују VEGF у мастоцитима и појачава ефекат SP (105,122). Претходно је показано да IL-1 индукује секрецију VEGF-а из леукоцита (123). Резултати *Theoharides*-а и сарадника (105) потенцирају значај интеракције између SP, IL-33 и мастоцита у процесу ангиогенезе. IL-33 ослобођен из епителних и ендотелних ћелија, делујући заједно са IgE, активира мастоците у здравој кожи (32,124). Активирани мастоцити ослобађају хистамин и интерлеукине и последично стимулишу синтезу и ослобађање SP из неурона (105). Поред тога, у псоријази потенцијални извор IL-33 могу да буду лимфоцити, пролиферишући кератиноцити као и ендотелне ћелије новонасталих крвних судова (105). На овај начин IL-33 индукује ослобађање VEGF-а преко SP, чиме се повећава васкуларна пропустљивост и убрзава процес запаљења (105). Раније студије су показале да IL-33 индукује секрецију SP која повећава концентрацију калцијума у цитосолу LAD2 ћелија (125). Повишена концентрација калцијума у цитосолу је довољна за синергистичко ослобађање VEGF-а (105).

### 1.1.8. Сигнални пут IL-33/IL-33R у патолошким стањима

Постоје бројне студије о плејотропном дејству IL-33 и његовој улози у запаљењским, алергијским и аутоимунским болестима (14,23). Међутим, његова улога у протуморској и антитуморској имуности није јасна.

#### 1.1.8.1. Астма

Астма је хронично запаљење које карактерише бронхијална хиперреактивност, алергијска инфламација, повећан ниво серумског IgE и продукција Th2 цитокина. С обзиром да IL-33 снажно потенцира Th2 имунски одговор, испитивана је његова улога у астми (126). Студије експресије гена људи и мишева показале су експресију IL-33 у ткиву плућа и јаку експресију у глаткомишићним ћелијама бронха (17). У скорије време показано је да је у биопсијским узорцима бронха људи оболелих од астме присутна снажна експресија IL-33. Експресија IL-33 је посебно снажна код пацијената са тешким обликом астме (67) и углавном је детектована у епителним ћелијама бронха (67). У студијама које су идентификовале популације ћелија које се активирају под дејством IL-33 у астми, установљена је важност епителних и ендотелних ћелија али не и глаткомишићних ћелија и фибробласта (127). Апликација IL-33 промовише хиперреактивност дисајних путева, хиперплазију пехарстих ћелија, еозинофилију, поларизацију макрофага у М2 правцу и продукцију IL-4, IL-5 и IL-13 у плућима (102,128,129). *Oboki* и сарадници (130) су показали да је болест индукована овалбумином код IL-33<sup>-/-</sup> мишева праћена слабијом инфилтрацијом плућног ткива еозинофилима и лимфоцитима, хиперреактивношћу дисајних путева и запаљењем.

#### 1.1.8.2. Кардиоваскуларне болести (CVD)

IL-33 је првобитно идентификован у једру ендотелних ћелија HEV-а секундарних лимфних ткива (61). Поред тога, експресија IL-33 је детектована у глаткомишићним и ендотелним ћелијама коронарних артерија (17,131), другим ендотелним ћелијама (32,63), адипоцитима (132,133) и у фибробластима срца што сугерише потенцијално значајну улогу IL-33 у разним CVD (енгл. *Cardovascular disease*) (134).

*Фиброза и хипертрофија срца.* Студије у животињским моделима указују да је sST2 више од маркера у CVD болестима, јер активација IL-33/IL-33R сигнализације има протективну улогу у различитим кардиоваскуларним болестима. У моделу хипертензије IL-33 смањује хипертрофију и фиброзу срца код WT (енгл. *Wild type*) али не и код IL-33R<sup>-/-</sup> мишева (134). sST2 у миокарду блокира антихипертрофични ефекат IL-33 и последичну активацију IL-33/IL-33R сигнализације чиме погоршава болест. Поред тога, IL-33 инхибира апоптозу кардиомиоцита, ублажава развој исхемијских лезија и фиброзу након инфаркта и побољшава вентрикуларну функцију *in vivo*, сузбијањем активности каспазе-3 и појачавањем експресије антиапоптотских протеина (135).

*Атеросклероза.* Током атеросклерозе моноцити, Т лимфоцити и мастоцити инфилтришу плак унутар интима артеријског зида. Болест вероватно покреће Th1 имунски одговор уз помоћ цитокина попут IL-12 и IFN- $\gamma$  који индукују болест (136,137). Активација осовине IL-33/IL-33R може имати протективан ефекат у атеросклерози поларизацијом имунског одговора у Th2 правцу (99,138).

### **1.1.8.3. Реуматоидни артритис (RA)**

Значајан број истраживања указује на значај IL-33 у патогенези реуматоидног артритиса (RA). Раније студије су применом хибридизације *in situ* показале присуство IL-33 у крвним судовима синовијалног ткива оболелих од RA (31). Касније је доказано присуство IL-33 и IL-33R у свим слојевима захваћених ткива (139,140). Иако примарни синовијални фибробласти RA пацијената показују слабу или потпуно одсутну експресију IL-33, стимулација проинфламацијским цитокинима попут TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  позитивно регулише експресију у овим ћелијама (139). RA пацијенти са добрим терапијским одговором на инхибиторе TNF, имали су ниже концентрације IL-33 у серуму (141,142). Ови резултати указују да сигнални пут IL-33/IL-33R учествује у патогенези запаљења и деструкције зглобова.

Неке новије студије су покушале да процене концентрацију IL-33 и sST2 у серуму и синовијалној течности у RA пацијената са циљем идентификације потенцијалних биомаркера болести. Резултати различитих лабораторија су показали да је концентрација IL-33 и sST2 у серуму и синовијалној течности оболелих од RA значајно повећана,

посебно код активне болести у односу на здраве контролне испитанике, као и пацијенте са остеоартритисом и псоријатичним артритисом (141,143-145). *Xiangyang* и сарадници (143) су показали да повећана концентрација IL-33 у серуму RA пацијената позитивно корелира са тежином болести, реуматским фактором и модификованим *Sharp* скором који се користи за процену коштане ерозије, због чега се сматра да IL-33 доприноси патогенези RA делом кроз ерозију костију. Међутим, како је IL-33 инхибитор ресорпције костију (146) могуће је да се IL-33 ослобађа као последица а не као узрок инфламације зглобова и ерозије костију. Неколико година пре него што је идентификован IL-33, *Leung* и сарадници (147) су показали да sST2 ублажава артритис индукован колагеном (енгл. *Collagen-induced arthritis*, CIA) у мишева. Протективна улога је потврђена администрацијом анти-ST2 антитела и ублажавање CIA су повезани са редукцијом деструкције зглобова, као и повећаном продукцијом IFN- $\gamma$  и IL-17 у дренажућим лимфним чворовима (140). Улога IL-33 као про-инфламацијског цитокина код артритиса је потврђена апликацијом рекомбинантног IL-33 (енгл. *Recombinant IL-33*) који изазива егзацербацију болести у CIA и артритису индукованом аутоантителима (енгл. *Antibody-induced arthritis*) у мишева, док IL-33R дефицијентни мишеви показују атенуацију CIA и AIA уз смањену продукцију про-инфламацијских цитокина (IL-17, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ ) (139,148).

Подаци сугеришу да сигнални пут IL-33/IL-33R промовише инфламацију зглобова и представља нову терапијску мету у лечењу RA болести. Међутим, свако лечење које укључује овај сигнални пут мора бити пажљиво праћено јер IL-33 у условима *in vitro* инхибира диференцијацију остеокласта (146). Поред тога, потврђена је инхибиција остеокластогенезе код трансгених мишева који прекомерно експримирају IL-33 (149).

#### **1.1.8.4. Мултипла склероза (MS)**

Улога IL-33 у развоју болести централног нервног система (енгл. *Central nervous system*, CNS), попут мултипле склерозе (енгл. *Multiple sclerosis*, MS), је посредована имунским механизмима и завредила је додатну пажњу због изузетно високог нивоа експресије mRNA за IL-33 у ткиву мозга и кичмене мождине, сугеришући да осовина IL-33/IL-33R може имати специфична обележја у CNS-у, поред улоге медијатора имунског одговора.

Неке новије студије су фокусиране на значај експресије и функцију IL-33 у ћелијама CNS-а.

Данас се мало зна о циљаним ћелијама CNS-а које IL-33 активира везивањем за рецептор. IL-33R показује јаку експресију у ткиву кичмене мождине мишева (150). Коришћењем примарних ћелијских култура CNS-а утврђено је присуство mRNA за IL-33R, IL-1RAcP и sST2 у ћелијама микроглије и астроцитима док је IL-1RAcP присутан у неуронским ћелијама (151).

Улога IL-33 у патогенези MS указује на значај позитивне регулације IL-33 и/или IL-33R у ткиву кичмене мождине мишева код којих је индукован експериментални модел аутоимуног енцефаломијелитиса (енгл. *Experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE) у поређењу са контролним мишевима (150,152). Овај феномен је потврђен код људи код којих је детектован повишен ниво IL-33 у белој маси и подручју плакова код оболелих од MS у поређењу са белом масом контролних испитаника (153). Поред тога, серумски IL-33 је вишеструко повишен код болесника са релапсом MS у поређењу са здравим контролама (154). Као такав, IL-33 може бити потенцијални биомаркер активности MS и терапијског одговора.

Упркос доказима који указују на улогу IL-33 у инфламацији CNS-а, функционални подаци о томе да ли IL-33 има користан или штетан ефекат у MS су мање јасни.

Нека истраживања указују на протективни значај активације сигналног пута IL-33/IL-33R у развоју MS, док друге студије, такође спроведене у анималном моделу болести потенцирају значај његове активације у прогресији болести (150,152,155,156). Разлог опречних резултата још увек није јасан. Постоје индикације да је време давања егзогеног IL-33 од кључног значаја за процену његове функције у развоју EAE. Поред имуномодулаторне цитокинске улоге, IL-33 је потентни активатор ендотелних ћелија. Повећава пропустљивост ендотела редукцијом међућелијских веза *in vitro* и индукује васкуларну пропустљивост (104). Дисфункција крвно-моздане баријере је битан корак за запаљење CNS-а због чега се спекулише да рано давање IL-33 може допринети MS и EAE ометањем крвно-моздане баријере поред модулације имунског система. Одложени третман са IL-33 може бити значајнији у тренутно недефинисаној улози у болестима CNS-



а. IL-33 може бити потенцијални биомаркер у процени развоја и лечења MS, као и потенцијална мета у будућем лечењу MS.

#### ***1.1.8.5. Системски лупус еритематозус (SLE)***

Ранија истраживања су потврдила да је протеин sST2 идентификован у серуму појединих пацијената оболелих од системског лупус еритематозуса (енгл. *Systemic lupus erythematosus*, SLE), RA и других реуматских болести (157). Подаци о улози сигналног пута IL-33/IL-33R у SLE су још увек оскудни. Концентрација sST2 у серуму пацијента са активним SLE је значајно повећана у поређењу са пацијентима у реемисији и здравим контролама (158). Паралелна студија је показала да је ниво IL-33 у SLE пацијената повишен у односу на здраве испитанике (159) али нижи него у RA пацијената. Испитивање повезаности концентрације IL-33 са вредностима других лабораторијских параметара повезаних са SLE су показала да IL-33 учествује у акутној фази SLE али вероватно и у даљем току болести (159). Осим тога, IL-33 има биолошко дејство на еритроците, тромбоците и њихове прекурсоре у SLE. Наведене опсервације указују на могућу улогу осовине IL-33/IL-33R у настанку и развоју SLE.

#### ***1.1.8.6. Системска склероза (SS)***

Недавно је потврђена повезаност између IL-33 и системске склерозе (енгл. *Systemic sclerosis*, SS). Карактеристична је абнормална експресија IL-33 и IL-33R у кожи и висцералним органима оболелих од SS (160). Степен експресије варира од изразито ниске до високе у зависности од фазе болести. У раним насупротив касним фазама болести, експресија IL-33 је ослабљена до одсутна у већини ендотелних ћелија захваћених органа, док је експресија IL-33R у инфилтришућим имунским ћелијама повећана почетком али ослабљена крајем SS. Сматра се да IL-33 ослобођен из активираних и/или оштећених ендотелних ћелија активира IL-33R на имунским ћелијама, фибробластима и миофибробластима и на тај начин промовише фиброзу. Концентрација серумског IL-33 корелира са степеном склерозе коже и фиброзе плућа (161). У пацијената са дифузним променама на кожи детектоване су веће концентрације IL-33 насупротив групи пацијената са ограниченим лезијама на кожи. Повећане концентрације IL-33 код оболелих од ове болести указује и на настанак нових крвних судова (162). На основу оваквих резултата, IL-

33 вероватно игра улогу у настанка кожне и пулмонарне фиброзе у оболелих од SS. Како би се испитала улога IL-33 у развоју SS, недавно је спроведена студија на мишевима, која је показала да субкутана администрација IL-33 доприноси развоју кожне фиброзе, сличну као код SS пацијената што је потврдило улогу IL-33 као профиброзног медијатора (163). Развој фиброзе коже индуковане IL-33 зависи од присуства IL-13 ослобођеног углавном из еозинофила, док присуство IL-4 у мастоцитима није неопходно.

#### ***1.1.8.7. Остале аутоимунске болести***

IL-33 је повезан и са развојем аутоимунских поремећаја попут атопијског дерматитиса. Стимулација комбинацијом TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  ефикасно индукује продукцију IL-33 у кератиноцитима и фибробластима (164). У мишјем моделу атопијског дерматитиса је, након излагања алергену или ентеротоксину В стафилокока, детектовано повећање експресије IL-33 и IL-33R у кожним лезијама уз позитиван терапијски одговор на примену *Tacrolimus*-а (164). Касније студије су сугерисале да IL-33 потпомаже атописки дерматитис негативном регулацијом експресије хуманог  $\beta$  дефензина-2 у кератиноцитима као и код акутног ексема (165). Повећан ниво IL-33 је присутан и у неким ретким аутоимунским болестима као анкилозни спондилитис *Behçet*-ова болест а снижен у амиотрофичној латералној склерози (166-168).

## 1.1.9. Сигнални пут IL-33/IL-33R у биологији тумора

### 1.1.9.1. Експресија IL-33 и IL-33R у туморском ткиву

Улога IL-33 у канцерима још увек није сасвима јасна. Студије у којима је проучавана експресија IL-33 су потврдиле његово присуство у ћелијама карцинома дојке, желуца, плућа, грлића материце, колоректалног и хепатоцелуларног карцинома, меланома, , као и сквамозелуларног карцинома главе и врата.

Поред туморских и ћелија имунског система, примарни извор IL-33 су епителне ћелије, миофибробласти, фибробласти, адипоцити, глаткомишићне и ендотелне ћелије (17,32) док се IL-33R експримира на ћелијама имунског система, миофибробластима, епителним и ендотелним ћелијама (169).

Слично неизмењеном епителном ткиву, IL-33 се детектује у бенигним и добродиферентованим туморима док је његова експресија редукована у слабодиферентованим канцерима (170). Супротно овоме степен експресије је повећан у фибробластима туморске строме и костне сржи (171,172), указујући да туморска строма може бити значајан извор IL-33 код пацијената са карциномом (171). Показано је да IL-33 има важну улогу у иницијацији развоја карцинома и фибрози (173). Фиброза узрокована хроничним запаљењем укључује различите стимулусе попут инфекције, аутоимунског одговора, алергије и туморогенезе (174). Карактерише је прекомерни раст ожиљног ткива, састављен од компоненти екстрацелуларног матрикса (колаген, хијаулонронска киселина, фибронектин, протеоглигани) на месту оштећења ткива (173). Главни ћелијски играчи су фибробласти и миофибробласти који су првенствено ћелије које продукују колаген (173). Упркос експресији IL-33 у стромалним ћелијама канцера, велики број студија указује на редуковану експресију IL-33 у епителним ћелијама (170,173,175,176).

### 1.1.9.2. Протуморска улога сигналног пута IL-33/IL-33R

Експресија IL-33 и/или рецептора sST2 је повезана са лошом прогнозом у болесника са различитим врстама тумора (170,173,177-182). Fang и сарадници (183) су указали на значајну улогу овог сигналног пута у инвазивности и метастазирању. У условима *in vitro*, инхибиција IL-33 успорава туморски раст, миграцију и формирање колонија у глиома и карцинома дебелог црева а његова инхибиција *in vivo* супримира туморски раст (180,183). Присуство метастаза у лимфним чворовима карлице представља лош прогностички параметар у раном стадијуму карцинома грлића материце. Код нодус негативних пацијенткиња забележена је мања експресија IL-33 у туморским ћелијама у поређењу са нодус позитивним, сугеришући да нижи степен експресије IL-33 инхибира прогресију болести (184). Насупрот овоме, у тешким облицима цервикалне интраепителне дисплазије детектовано је значајно мање IL-33 у ендотелним и епителним ћелијама цервикса у односу на дисплазију средњег степена и епителне ћелије неизмењеног ткива цервикса (185). Међутим, није забележена значајно мања експресија IL-33 у ћелијама карцинома у односу на дисплазију тешког степена. Код сквамозелуларног карцинома главе и врата, примена IL-33 промовише миграцију ћелија и инвазивност индукцијом епително-мезенхималне транзиције (171).

Активација сигналног пута IL-33/IL-33R потпомаже миграцију и инвазивност ћелија колоректалног и желудачног карцинома и то продукцијом IL-6, СКCR4 (енгл. *C-X-C chemokine receptor type 4*), MMP-2, MMP-3 и MMP-9 (180,186). У експерименталном моделу болести, IL-33 активира туморску строму и промовише полипозу у мишева (187). У пацијената са колоректалним карциномом код којих је присутна мутација p53 забележена је значајно мања експресија IL-33 у туморским ћелијама (188). Такође, експресије IL-33 и IL-33R су повећане у аденому црева насупрот редукованој или потпуно одсутној експресији у туморским ћелијама колоректалног карцинома (189).

Негативна корелација експресије IL-33 и IL-33R и укупног преживљавања у карциномима јајника приписана је активацији ERK и JAK сигнализације и последичној промоцији миграције, пролиферације и инвазивности туморских ћелија (170). Серумска концентрација IL-33 је повећана у пацијената са карциномом главе и врата (179), желуца (190), плућа (191), дојке (170), као и хепатоцелуларним карциномом (178), док су

повишене концентрације sST2 детектоване у серуму пацијената са метастатским карциномом дојке (192) и хепатоцелуларним карциномом (178). Sun и сарадници (190) су показали да серумска концентрација IL-33 у карциному желуца корелира са тежином и прогресијом болести, док у пацијената са NSCLC (енгл. *Non-small cell lung cancer*) представља значајан дијагностички и прогностички маркер (191).

### **1.1.9.3. Антитуморска улога сигналног пута IL-33/IL-33R**

Недавне студије су показале да IL-33 потпомаже акумулацију Th1 и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита чиме појачава антитуморски имунски одговор. Студије на експерименталном мишјем моделу су истакле важну улогу IL-33 којом он потпомаже антитуморски одговор посредован CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима. Коришћењем метастатског модела болести применом ћелијске линије меланома В16 и карцинома плућа LLC1 показано је да трансгена експресија IL-33 инхибира туморски раст и спречава настанак удаљених метастаза у мишева (193). Трансгена експресија као и примена рекомбинантног IL-33 појачава инфилтрацију туморског ткива CD8<sup>+</sup> и NK ћелијама и појачава цитотоксичност ових ћелија како *in vitro* тако и *in vivo* (193). Ова студија пружа додатне доказе да IL-33 промовише пролиферацију и активацију CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита и NK ћелија активацијом NF-κB и показује нови механизам којим IL-33 промовише акумулацију и активацију CD8<sup>+</sup> и NK ћелија. Студије су показале да апликације обе форме IL-33 у комбинацији са вакцином HPV (енгл. *Human papillomavirus*) DNA (енгл. *Deoxyribonucleic acid*) проузрокује брзу и комплетну регресију тумора плућа индуковоног ћелијском линијом ТС.1 (194). Примена IL-33 поларише имунски одговор у Th1 правцу и појачава антитуморски одговор ефекторских и меморијских Т лимфоцита специфичних за антиген. Користећи модел трансгеног миша Р14, IL-33 на периферији тумора појачава акумулацију CD8<sup>+</sup> меморијских Т ћелија што резултује брзом и потпуном регресијом индукованог тумора (194).

Barrera и сарадници (195) су показали да је системска концентрација IL-33 значајно смањена код пацијената са NSCLC у односу на групу контролних испитаника. Поред ове студије, Musolino и сарадници су приказали негативну корелацију серумске концентрације IL-33 и туморског стадијума код пацијената са мултиплим мијеломом, указујући на протективну улогу IL-33 (196).

#### 1.1.9.4. Сигнални пут IL-33/IL-33R у карциному дојке

Обзиром на значај инфламације у развоју канцера, све је више студија посвећених проучавању улоге овог сигналног пута у канцерогенези и имунском одговору на туморе. Имуни одговор тип 1 се карактерише Th1 ћелијама које продукују IFN- $\gamma$ , цитотоксичним Т лимфоцитима, NK и NKT ћелијама и овај одговор представља кључну компоненту имуности на туморе (197,198). Присуство компоненти имунског одговора тип 1 је повољан прогностички знак (198). Познато је да Th1 и CD8+ Т лимфоцити који инфилтришу тумор нису у стању да одговоре на локалне и системске механизме имунске супресије како у анималним моделима тако и у људи (199).

Туморски антигени могу бити ослобођени због хиперпролиферације ћелија тумора, као и услед ћелијске смрти. Туморске ћелије развијају снажне механизме за избегавања имунског одговора, тако што смањују одашиљање штетног сигнала. Недостатак штетног сигнала као што је IL-33 у туморској средини је главни механизам туморске имунске толеранције и један од важних фактора неуспеха тренутне имунотерапије.

Jovanovic и сарадници (200) су показали да активација сигналног пута IL-33/IL-33R инхибира антитуморски имунски одговор, последично убрзавајући развој удаљених метастаза. Студија на експерименталном моделу карцинома дојке је показала да активација сигналног пута IL-33/IL-33R појачава интратуморску акумулацију имуносупресивних и урођених лимфоидних ћелија, промовишући туморски раст и метастазирање у карциному дојке (200). IL-33 се експримира у нормалном ткиву дојке док је његова експресија редукована у дукталном *in situ* карциному (енгл. *Ductal in situ carcinoma*, DCIS) (201). Kretschmer и сарадници су потврдили да је експресија IL-33 значајно смањена и у инвазивном карциному дојке (201). Локална експресија IL-33 може бити важан маркер у диференцијацији малигног од бенигног/здрог ткива (170). Експресија IL-33, утврђена имунохистохемијски у околном ткиву карцинома је значајно већа него у здравом ткиву дојке што имплицира да околно нетуморско ткиво може имати значајну улогу у антитуморској имуности (170). Тумори високог хистолошког градуса показују значајно мању експресију IL-33 у поређењу са туморима ниског градуса што потенцира прогностички и потенцијално терапијски значај овог цитокина посебно код HER2 (енгл. *Human epidermal growth factor receptor-2*) позитивне групе тумора и тумора

који експримирају друге цитокине (170). Осим тога, експресија IL-33 је значајно већа у HER2 позитивним туморима што је у складу са подацима из студија које су показале да оверекспресија sST2 убрзава метастазирање карцинома активацијом HER2 у ћелијским линијама карцинома дојке (192). У HER2<sup>+</sup> мишијим туморима дојке експресија IL-33 је мања у поређењу са преканцерозним лезијама (202). Студија која се бавила испитивањем серумске концентрације IL-33 код пацијената са карциномом дојке показала је да је ниво IL-33 већи код пацијената са карциномом дојке у поређењу са бенигним туморима дојке (170). Концентрација sST2 је повећана код пацијената са метастатским карциномом дојке док је смањена концентрација овог протеина повезана са смањењем ћелијске покретљивости индуковане HER2 у две ћелијске линије (192). Концентрација IL-33 у серуму је већа код ER (енгл. *Estrogene receptor*) позитивних пацијената што указује на могућу зависност IL-33/IL-33R сигнализације од хормонских рецептора (170).

Концентрација IL-33 у серуму нижа је у групи пацијенткиња са туморима дојке који у значајно мањој мери експримирају Ki-67 у туморском ткиву што указује на негативну повезаност серумског IL-33 и пролиферације ћелија карцинома дојке (170). Повећане серумске концентрације IL-33 и sST2 код пацијената са карциномом дојке у односу на здраве испитанике, указују на њихову повезаност са овом болести. Такође, концентрације IL-33 и sST2 корелирају са концентрацијом VEGF-а чиме је потврђена улога IL-33 и sST2 у ангиогенези код ове болести (203). Тромбоцитни фактор раста C (енгл. *Platelet-derived growth factor C*, PDGF-C) је новооткривени фактор раста који се везује за PDGF  $\alpha$  и  $\beta$  рецептор (204). PDGF-C обавља улогу трансформишућег и митогеног фактора у туморским ћелијама (205,206), као и митогеног фактора и хемоатрактанта за фибробласте повезане са канцером (207,208). Студије су показале да је концентрација PDGF-C значајно већа код пацијената са карциномом дојке у односу на здраве испитанике као и да корелира са серумском концентрацијом IL-33 и sST2 указујући на дијагностички и прогностички значај IL-33 и sST2. Екстрацелуларни матрикс се разграђује преко система који је активиран матрикс-металопротеиназама и u-PA. Показано је да се MMP-11 експримира у фибробластима карцинома али не и у бенигним туморима дојке (209). Концентрација MMP-11 је значајно повишена у серумима оболелих од карцинома дојке и корелира са концентрацијом IL-33 и sST2. Сви ови подаци указују да повећане концентрације IL-33 и sST2 указују на лошу прогнозу болести. Поред наведеног, IL-33 је доказан и као

потенцијални прогностички маркер али и као потенцијална мета за нове видове терапијског приступа (178,190,191). Елевација концентрације IL-33 у серуму као и његове локалне експресије могу убрзати прогресију и метастазирање карцинома дојке, негативном регулацијом сигналног пута IL-12 (170). Ова студија је утврдила обрнуту повезаност између серумске концентрације и локалне експресије IL-33 са експресијом ER у ћелијама карцинома дојке (170). Системска концентрација и локална експресија IL-33 могу имати различите улоге у зависности од хормонског статуса, због чега IL-33 може бити један од важних фактора који учествују у резистенцији тумора на хормонску и терапију *Herceptin*-ом у групи ER<sup>+</sup>/HER2<sup>+</sup> позитивних карцинома (170).

## 1.2. Карцином дојке

Инвазивни карциноми дојке су хетерогена група тумора који највећим делом настају од истог сегмента терминалног канала лобуларне јединице (енгл. *Terminal duct lobular unit, TDLU*). Карактеришу се различитом клиничком презентацијом, патолошком класификацијом и клиничким током. Инвазивни дуктални карцином (енгл. *Invasive ductal carcinoma, IDC*) је најчешћа форма инвазивних карцинома са учесталошћу од 55% у односу на све дијагностиковане (210). Са инциденцом од 5 до 15%, инвазивни лобуларни карцином је други најчешће дијагностикован тумор дојке епителног порекла. Поред ове две групе, Светска здравствена организација (енгл. *World Health Organization, WHO*) је као посебне туморе дојке, дефинисала и прихватила више од десет различитих варијанти.

### 1.2.1. Инвазивни и *in situ* карцином дојке

Тумори дојке епителног порекла су подељени на *in situ* и инвазивне карциноме (211). Карциноми *in situ* подразумевају потенцијално малигну интрадукталну пролиферацију епителних ћелија, ограничену на дуктусе и лобулусе.

Инвазивна или инфилтративна форма карцинома дојке се односи на малигну, абнормалну, пролиферацију неопластичних ћелија и урастање у стромално ткиво и околне структуре. Обе форме се на основу хистолошких карактеристика, класификују у дукталне и лобуларне карциноме.



## 1.2.2. Инвазивни дуктални карцином (IDC)

Инвазивни дуктални карцином карактерише малигна пролиферација дукталног епитела уз инвазију стромалног ткива и присуство или одсуство поља карцинома *in situ*. Дијагноза се поставља на основу подтипа IDC (енгл. *Invasive ductal carcinoma*) а ређе на основу врсте и градуса дукталног *in situ* карцинома (енгл. *Ductal in situ carcinoma*, DCIS). У погледу хистолошких и цитолошких карактеристика, IDC показују велики број варијација због чега су у зависности од типа ћелија, секреције, архитектуре ткива и имунофенотипа класификовани на различите подгрупе.

Са друге стране, око 75% свих IDC не показује особености и није их могуће класификовати у посебне подврсте, већ припадају категорији „без посебних карактеристика,, (енгл. *Not otherwise specified*, NOS). Други аутори користе термин „без посебног типа“ (енгл. *No special type*, NST) чиме се морфолошки али и биолошки, издвајају тумори који не могу бити класификовани у друге, међународно прихваћене групе (212).

## 1.2.3. Биологија карцинома дојке

### 1.2.3.1. Онкогенеза

Као што је то случај и са карциномима других локализација, узрок настанка карцинома дојке је и даље непознат (213). Сматра се да су сви чиниоци груписани у три основне групе утицаја: **1. генске промене, 2. утицај хормона и 3. фактори околине.**

**Генски фактори.** Око 5% до 10% карцинома дојке је повезано са специфичним наследним мутацијама (214). Око половина жена са наследним карциномом дојке има мутацију у BRCA1 (енгл. *Breast cancer*) (док се код трећине идентификује мутација BRCA2 гена (213). То су велики комплексни гени, међу којима не постоји значајна хомологија, као што је нема ни са другим познатим генима (213). Иако се прецизна улога ових гена карциногенези и њихова релативна специфичност за карцином дојке још увек проучавају, сматра се да они учествују у процесу поправке DNA (енгл. *Deoxyribonucleic acid*) (215). Понашају се као тумор супресорски гени јер карцином настаје само када су оба алела инактивна или дефектна (216,217). Један је инактивисан услед мутације герминативних

ћелија, а други накнадном соматском мутацијом (217). Генетско тестирање је доступно али је компликовано услед постојања више стотина различитих мутираних алела, од којих су само неки повезани са склоношћу ка карциному (213). Степен пенетрантности, узраст у коме карцином настаје и његова повезаност са осетљивошћу на друге типове карцинома могу да варирају зависно од типа мутације (213). Око 70% носиоца ових мутација карцином дојке добије до 70. године живота, на супрот 7% оболелих код којих ова мутација није присутна (213). Улога BRCA1 и BRCA2 гена у нехерeditарном карциному дојке је мање јасна јер су њихове мутације у овим туморима ретко присутне (213). Могуће је да други механизми, попут метилације у регулаторним регионима, инактивирају гене у спорадичним карциномима (213). Ређа генетска обољена повезана са карциномом дојке су *Li Fraumeni*-јев синдром (условљен мутацијама p53 у герминативним ћелијама) и *Cowden*-ова болест (условљена мутацијама PTEN (енгл. *Phosphatase and tensin homolog gene*) у герминативним ћелијама) (218,219). Карцином дојке је чешћи код носиоца мутираних атаксија-телеангиектазија гена (220). Као код већине других карцинома, мутације које захватају не само тумор-супресор већ и онкогене у епителу дојке доприносе процесу малигне трансформације (213). Међу најбоље проучаваним је прекомерна експресија HER2 (221,222). У неким хуманим карциномима дојке је описана и амплификација гена Ras и Muc (енгл. *Myelocytomatosis viral oncogene homolog*) (223). Велики број гена, укључујући и ген који кодира рецептор за естроген може да буде инактивисан хиперметилацијом промотора (213). Данас се сматра да су бројне стечене генске алтерације укључене у секвенцијалну трансформацију нормалне епителне у карциномску ћелију. Важан концепт који је препознат на основу резултата генских анализа карцинома дојке представља хетерогеност туморских ћелија на молекулском нивоу. На основу профила генске експресије, карцином дојке може да се класификује у 5 субтипова: луминални А, луминални Б, карцином са прекомерном експресијом HER2, базалоидни карцином и карцином сличан нормалној дојци (224). Наведени карциноми се јасно разликују у дијагностичком процесу и имају различите исходе (224).

**Утицаји хормона.** Вишак ендогених естрогена услед поремећене хормонске равнотеже има значајну улогу у настанку карцинома дојке (225). Многи од фактора ризика попут дуготрајног репродуктивног периода су повезани са скоковима у нивоу естрогена током менструалног циклуса. Такође, функционални тумори јајника који луче естрогене

повезани су са карциномом дојке жена после менопаузе (213). Естрогени стимулишу производњу фактора раста у нормалним епителним али и у ћелијама карцинома дојке (226,227). Претпоставља се да рецептори за естроген и прогестерон који су нормално присутни у епителу дојке, а често и у ћелијама карцинома дојке, ступају у интеракцију са промоторима раста, као што су TGF- $\beta$  (енгл. *Transforming growth factor- $\beta$* ), PDGF и FGF (енгл. *Fibroblast growth factor*), које луче ћелије карцинома дојке и тако обезбеђују аутокрини механизам развоја тумора (213).

**Фактори околине** се намећу као значајан узрок у случајевима различите инциденце карцинома дојке у генетски хомогеним групама, као и у чињеници да постоје географске разлике у преваленцији (213). Важни фактори околине су зрачење и егзогени естрогени (225). Продужена изложеност егзогеним естрогенима у постменопаузи, позната као хормонска супституциона терапија, спречава или бар одлаже развој остеопорозе. Новије студије су указале да је релативно краткотрајна употреба хормонске терапије комбинацијом естрогена и прогестерона повезана са повећаним ризиком од настанка карцинома дојке, откривањем карцинома у вишим стадијумима и већим абнормалностима мамограма (213). Примена оралних контрацептива је раније довођена у везу са већим ризиком настанка карцинома дојке (213). Данас се примена препарата са уравнотеженим ниским дозама естрогена и прогестерона третира као безбедна (213). Јонизујуће зрачење грудног коша повећава ризик од настанка карцинома дојке (228). Степен ризика зависи од дозе зрачења, времена које је протекло од експозиције и старости особе (213). Студије су показале да су ризику изложене само особе које су озрачене пре 30. године живота, у периоду развоја дојки (213). Између 20% и 30% жена зрачених због *Hodgkin*-овог лимфома у тинејџерским и двадестеим годинама добијају карцином дојке, док тај ризик није повишен код жена које су зрачене у каснијем животном добу (213). Ниске дозе зрачења услед мамографских прегледа немају или показују слаб ефекат на инциденцу карцинома дојке (213).

Многи други, слабије утемељени фактори ризика као што је гојазност, конзумирање алкохола и исхрана богата мастима су у популационим студијама повезивани са настанком карцинома дојке (213).

### 1.2.3.2. Прогресија (инвазивност и метастазирање)

Процес метастазирања се састоји из низа појединачних корака, а немогућност финализације само једног од њих завршава се заустављањем просеца (229). Метастазирање почиње локалном инвазијом околног ткива ћелијама тумора, а затим инвазијом крвних и лимфних судова (230,231). Ћелије тумора се даље шире путем крвотока и лимфних судова у удаљене органе. Пре екстравазације у паренхим органа, везују се за ендотел капилара циљног органа и стимулишу његову пролиферацију, чиме промовишу ангиогенезу у оквиру органа (230). Како би преживела током ових корака, туморска ћелија мора да избегне имунски одговор и апоптотске сигнале (230,232). Ако ћелије тумора упешно прођу ове кораке, поступак се понавља тако да настају секундарни тумори или метастаско ширење ћелија из раније насталих секундарних туморских депозита (229,231).

Метастазирање почиње инвазијом ћелија тумора у околно ткиво. Инвазивне туморске ћелије прво губе међусобни контакт као и контакт са ванћелијским матриксом (енгл. *Extracellular matrix*, ЕСМ). Кадхерини играју важну улогу у међусобном контакту туморских ћелија (233). Е-кадхерин је важан у одржавању међућелијског контакта и његова смањена експресија представља један од предуслова за метастазирање (234). Смањена експресија или потпуно одсуство Е-кадхерина је повезано са лошом прогнозом и праћена је прогресијом и метастазирањем карцинома дојке (235,236). Експресија N-кадхерина значајно се мења током епително-мезенхималне транзиције (енгл. *Epithelial–mesenchymal transition*, ЕМТ) (237). Све је више студија које показују да ЕМТ своју функцију у прогресији карцинома остварује помажући инвазију и интравазацију туморских ћелија у крвоток и индукцију протеаза које су укључене у деградацију ЕСМ (238,239). Адхезивност туморских ћелија за ЕСМ је посредована интегринима (240). Интегрини су трансмембрански рецептори присутни на компонентама ЕСМ попут фибронектина, ламинина, колагена, фибриногена и витронектина (233). Инвазији туморске строме претходи деградација ЕСМ. Деградација ЕСМ се одвија преко система MMP и uPA (241,242). *Huang* и сарадници (243) су показали да је инхибиција uPA смањила инвазивност и експресију MMP-9.  $\beta$ -глюкоронидаза, је ензим из групе хепараназа који такође помаже у деградацији ЕСМ разградњом хепарин сулфата (244), протеогликана

који се налази унутар ЕСМ или на површини ћелија и важна је за очување интегритета ЕСМ (245) као и за адхезију између матрикса и ћелија (246).

Године 1889. *Stephen Paget* је поставио теорију метастазирања под називом „*seed and soil*“ засновану на постулату да „семе“ (туморске ћелије) расте само када нађе одговарајуће „тло“ (микросредина) (247). Ова теорија се константно мења у складу са доказима који све више упућују да туморска микросредина представља кључни фактор у метастазирању. Микросредина метастатских туморских ћелија је кључна за даљу пролиферацију туморских ћелија, раст тумора и прогресију (248). Много различитих ћелија, укључујући фибробласте, ћелије имунског система као и ендотелне ћелије крвних и лимфних судова, заједно са ЕСМ чине микросредину која утиче на прогресију тумора (249,250). Малигне ћелије су у сталној комуникацији са ћелијама микросредине како у примарном тако и у метастатским туморима (251-256). Ове интеракције отварају пут напредовања карцинома дојке од *in situ* до метастатског карцинома (257). Регрутовање макрофага, активацијом ћелија строме, индукује ангиогенезу и промовише малигну трансформацију (258). Тумор асоцирани макрофаги (енгл. *Tumor-associated macrophages*, ТАМ) утичу на инвазију туморских ћелија, ангиогенезу, избегавање имунског одговора и миграторно понашање (259-262) и формирају интерактивну нишу са ендотелним и ћелијама карцинома дојке промовишући интравасацију и метастатско ширење (263). У костима, интеракција туморских ћелија са остеокластима и остеобластима може да убрза раст тумора или да индукује мировање туморских ћелија. Другим речима раст метастатских колонија у костима зависи од стромалних ћелија (264,265).

Ћелије тумора луче супстанце којима припремају „земљиште“ за успостављање преметастатске нише олакшавајући формирање секундарних тумора (248). Карцином дојке најчешће метастазира у кости и плућа а ређе у друге органе попут јетре и мозга (266). У преметастатским лимфним чворовима пацијената са карциномом дојке детектовани су VEGFR1 позитивни прогенитори хематопоезе. Овакав налаз сугерише претходно формирање преметастатске нише (248). *Hiratsuka* и сарадници (267) су показали да сигнали индуковани из примарног тумора условљавају експресију MMP-9 у ендотелним ћелијама и макрофагима плућа чиме промовишу инвазију плућа туморским ћелијама. Идентификовани су сетови гена који се експримирају у туморским ћелијама које

превасходно метастазирају у ткиво костне сржи и плућа указујући на ткивни тропизам метастатских колонија (268,269).

Још један важан аспект у настанку метастаза је успостављање туморске васкулатуре. Ангиогенеза игра значајну улогу у настанку и расту секундарних туморских депозита (270) и представља један од кључних елемената адаптације на микросредину и обележје карцинома (271). Сматра се да генске мутације, механичко оптерећење, запаљењски процеси, експресије ангиогених протеина и туморска хипоксија условљавају „ангиогени прекидач“ (272,273). За разлику од ангиогенезе у физиолошким условима, крвни судови тумора су структурно, функционално и генски измењени. Абнормални крвни судови нису довољни за снабдевање тумора кисеоником што узрокује хипоксију унутар туморског ткива (274). У складу са овим, туморске ћелије продукују веће количине проангиогених фактора што резултује повећањем абнормалне васкулатуре. Из тог разлога овај зачарани круг се наставља. Како би се избегла хипоксија микросредине индукована овим циклусом, укључују се инвазивни и метастатски програми (275).

#### **1.2.4. Прогностички фактори у карциному дојке**

Прогностички фактори пружају информације о клиничком исходу у тренутку оперативног лечења, независно од примењене системске адјувантне терапије. Одражавају суштинске биолошке карактеристике тумора који су показатељи за раст, инвазију и метастатски потенцијал тумора (276). Класични прогностички фактори карцинома дојке су независне варијабле и укључују старост, статус аксиларних лимфних чворова, величину тумора, као и патохистолошке карактеристике тумора попут хистолошког типа и градуса тумора, лимфоваскуларне инвазије, митотског индекса или експресије Ki-67 као маркера пролиферације, ER, PR и HER2 (276-279). Предиктивни фактори су повезани са позитивним одговором на примењену терапију, али не могу да предвиде исход код нелечених болесника (276,277). Поједини биолошки фактори, укључујући прекомерну експресију ER, PR, HER2 и Ki-67 представљају значајне прогностичке и предиктивне факторе. (277,280). Поред експресије ER, PR и HER2 и амплификације њихових гена, не постоје други клинички значајни предиктивни фактори за идентификацију пацијената са карциномом дојке који ће имати добар терапијски одговор на хормонску и циљану

онколошку терапију (281-283). Традиционално, прогностички фактори се користе за идентификацију пацијената, код којих је неопходна примена адјувантне терапије, како би се избегао ризик од релапса болести. Предиктивни фактори одређују најкориснији вид лечења за сваког пацијента посебно (284) што представља значајан искорак у индивидуализацији терапијског приступа. Прогностички и предиктивни фактори се разматрају заједно у процесу одлучивања о терапијском приступу и прогнози болести. Како позитиван прогностички фактор може да има негативну предиктивну вредност и обрнуто, потребна су даља истраживања за избор правилне стратегије у лечењу и развоју индивидуалног терапијског приступа (285).

Сви прогностички фактори могу се поделити на:

- Клиничке, и
- Биолошке прогностичке факторе

У клиничке се сврставају величина тумора и статус аксиларних лимфних чворова и укључене су у TNM класификацију и клинички стадијум болести, док хистолошки градус, нуклеарни градус, митотски индекс или пролиферативна активност детектована експресијом Ki-67, некроза, лимфоваскуларна инвазија, перинеурална инвазија, стромална-мононуклеарна реакција, као и експресије ER, PR, HER2 и p53 припадају групи биолошких прогностичких фактора.

**Хистолошки градус (G).** Хистолошки градус (енгл. *Histological grade*, G) означава степен сличности са нормалним ткивом и сразмеран је степену ткивне и ћелијске атипичности (Табела 1). Његово одређивање се заснива на процентуалној заступљености жлезданих и тубуларних структура са централним луминалним простором. Постоје три степена хистолошке градације. Код хистолошког градуса 1, тумор је саграђен од жлезданих/тубуларних формација у више од 75% туморског ткива. Тумори хистолошког градуса 2 се карактеришу интермедијарним архитектурним налазом што се манифестује присуством glandурних/тубуларних структура у 10% до 75% туморског ткива. Хистолошки градус 3 чине туморске плаже, острва и низови малигних ћелија а жлездане/тубуларне формације су присутне у мање од 10% туморског ткива.

Табела 1. Хистолошки градус тумора и прогноза болести

| G - Хистолошки градус |   |
|-----------------------|---|
| G <sub>x</sub>        | Градус се не може проценити   |
| G <sub>1</sub>        | Хистолошки градус ниског степена, добро диферентован тумор (повољна прогноза болести)           |
| G <sub>2</sub>        | Хистолошки градус средњег степена, средње диферентован тумор (умерено повољна прогноза болести) |
| G <sub>3</sub>        | Хистолошки градус високог степена, слабо диферентован тумор (лоша прогноза болести)             |

Хистолошки градус је независтан прогностички фактор чија је улога доказана у великом броју студија (286). Карциноме дојке високог градуса карактерише повећан ризик за локални рецидив и развој удаљених метастаза у периоду од 8 година након оперативног лечења (286). Показано је да хистолошки градус представља значајан прогностички фактор у различитим подгрупама карцинома дојке, укључујући пацијенте са ER позитивним туморима који су (287) или нису (288) подвргнути неoadјуватној ендокриној терапији као и пацијенте са нодус позитивним (289,290) или негативним (290-293) лимфним чворовима аксиле.

**Нуклеарни градус (NG).** С обзиром да изглед једра у малигној ћелији није увек праћен степеном хистолошке диференцијације, уведен је опис једра као критеријум за нуклеарну диференцијацију (енгл. *Nuclear grade*, NG) (Табела 2).

Степен нуклеарног плеоморфизма се одређује на основу величине и облика једра у подручју туморског ткива које показује највећи степен нуклеарне атипичности. Нуклеарни градус 1 подразумева униформна једра која се по величини не разликују од једара нормалних ћелија дукталног епитела. Ћелије са нуклеарним градусом 2 одликују увећана једра са благим до умереним степеном атипичности и малим али видљивим нуклеолусима. Нуклеарни градус 3 карактеришу изразито велика једра са бројним варијацијама у погледу величине и облика, уз проминентне нуклеолусе. Истраживања су показала да изглед једра даје добру клиничку корелацију и значајну прогностичку вредност.

Нуклеарни градус позитивно корелира са статусом лимфних чворова аксиле, пролиферативном активношћу и прекомерном експресијом HER2 у туморским ћелијама



(294). Повезаност са наведеним патохистолошким параметрима, указује на предиктивну и прогностичку улогу нуклеарног градуса, код оболелих од карцинома дојке (294).

Табела 2. Критеријуми за одређивање нуклеарног градуса и прогноза болести

| NG - Нуклеарни градус |  |
|-----------------------|--|
| NG <sub>1</sub>       | Једра су униформна и правилног облика, једарца се не уочавају (повољна прогноза болести)                   |
| NG <sub>2</sub>       | Једра су увећана са благом до умереном атипичном, нуклеолуси су уочљиви (умерено повољна прогноза болести) |
| NG <sub>3</sub>       | Једра су увећана са варијацијама у облику и величини, нуклеолуси су проминентни (лоша прогноза болести)    |

**Митотски индекс (MI).** Митотски индекс (енгл. *Mitotic index, MI*) је сразмеран пролиферативној активности тумора и корелира са брзином туморског раста (295). Поред прогностичког, има дијагностички значај у микроскопској анализи филодних и глатко-мишићних тумора дојке.

Ћелија у митози се карактерише одсуством једарне мембране и екстензијом нуклеарног материјала ка периферији, након чега настаје деобно вретено и деоба нуклеарног материјала (296). Евакуација захтева бројање јасних митотских фигура. Хиперхроматична и пикнотична једра нису поуздан знак ћелијске пролиферације већ вероватно апоптозе, због чега овакве ћелије нису укључене у укупан збир. Према препорукама WHO (енгл. *World Health Organization*), бројање се обавља на 10 поља највећег микроскопског увећања (енгл. *High Power Field, HPF*) и захтева стандардизацију површина која одговарају микроскопском увећању или коришћење претходно калибрисаног градуисаног система (Табела 3). Одабир поља је насумичан и по правилу на периферији туморског ткива, дуж туморског руба. Уколико туморско ткиво карактеришу хетерогена поља у погледу митотске активности, митозе се броје у подручјима где је ова активност најизраженија.

Митотски индекс је значајан прогностички параметар чије повећане вредности корелирају са краћим преживљавањем (297) и периодом без болести (298). Студије указују на предиктивни значај MI у предвиђању терапијског одговора на адјувантне (299,300) и неoadјувантне (301,302) терапијске протоколе.

Табела 3. Критеријуми за одређивање митотског индекса (MI) према стандардизованим површинама и пречницима великог микроскопског увећања.

| Број митоза у односу на три различите величине микроскопског поља |                  |       |       |                                  |
|---|------------------|-------|-------|----------------------------------|
| Пречник микроскопског поља (mm)                                   | 0,440            | 0,590 | 0,630 |                                  |
| Површина микроскопског поља (mm <sup>2</sup> )                    | 0,152            | 0,274 | 0,312 |                                  |
| MI - Митотски индекс  | Прогноза болести |       |       |                                  |
| MI <sub>1</sub>   | 0-5              | 0-9   | 0-11  | повољна прогноза болести         |
| MI <sub>2</sub>   | 6-10             | 10-19 | 12-22 | умерено повољна прогноза болести |
| MI <sub>3</sub>   | >11              | >20   | >23   | лоша прогноза болести            |

Класично одређивање митотског индекса потиснуто је анализом експресије Ki-67, имунохистохемијском методом.

Ki-67 је нуклеарни протеин откривен 1983.године у ћелијској линији *Hodgkin*-овог лимфома (303). Тада је показано да се Ki-67 експримира у S, G1, G2 и M фази ћелијског циклуса али не и у G0 фази (304,305). Данас се најчешће примењује као имунохистохемијски маркер за детекцију пролиферишућих туморских ћелија што је индикатор брзине туморског раста. Поред тога, његова експресија представља значајан прогностички и предиктивни параметар.

Највећи напредак у градирању тумора направио је *Nottingham–Bloom–Richardson* систем (306,307) као модификација *Scarff-Bloom-Richards*-овог модела (308). Овај систем градирања тумора укључује сабирање појединачних скорова за хистолошки, нуклеарни и митотски градус чиме се добија укупан скор у опсегу од 3 до 9. На основу оваквог бодовног система тумори са скором: од 3 до 5 одговарају добро диферентованим, са 6 и 7 средње диферентованим а скор 8 и 9 карактерише слабодиферентоване карциноме. Систем је присутан у Консензусу патолога Америке и препорукама WHO (309).

**Лимфоваскуларна инвазија (LVI).** Лимфоваскуларна инвазија (енгл. *Limfovascular invasion*, LVI) је дефинисана као присуство туморских ћелија унутар простора ограничених ендотелним ћелијама (лимфног и/или крвног суда). Оцењује се на ткивним пресецима туморског ткива бојених стандардном HE методом (енгл. *Haematoxylin and eosin stain*). Сматра се најважнијим кораком у покретању дисеминације и метастазирању

туморских ћелија. Присуство LVI је снажан показатељ лоше прогнозе за карциноме различитих локализација, укључујући карцином плућа (310), дојке (311), дебелог црева (312), бубрега (313), простате (314), као и карцином горњег уринарног тракта (315,316). Мета анализа којом су анализирани студије у којима је проучавана повезаност LVI са другим прогностичким параметрима, потврдила је повезаност LVI са величином тумора, статусом аксиларних лимфних чворова, годинама старости и хистолошким градусом (317).

**Перинеурална инвазија (PNI).** Перинеурална инвазија (енгл. *Perineural invasion*, PNI) је означена као присуство туморских ћелија унутар епинеуријума, перинеуријума и/или ендонеуријума (318). У неким студијама, PNI подразумева присуство нерва у непосредној близини тумора који обухвата 1/3 његове циркумференције (319). Као значајан прогностички фактор, PNI је потврђена у бројним малигним болестима укључујући туморе главе и врата, карциноме панкреаса, простате и гастроинтестиналног тракта (320-323). Заступљеност PNI се повећава са прогресијом и клиничким стадијумом болести због чега је предложено да се овај податак уврсти у стандардну TNM класификацију (324). У студији на карциному панкреаса, PNI је процењен као независан прогностички фактор и повезан је са појавом неуропатског бола (325), док је у карциному грлића материце снажно повезан са бројним факторима ризика и лошом прогнозом болести (318,326). Друге студије су на ткиву карцинома грлића материце потврдиле повезаност PNI са LVI и присуством метастаски измењених лимфних нодуса (318). PNI је фактор ризика за рецидив карцинома грлића материце и треба га имати у виду у погледу прогнозе болести и избора врсте оперативног захвата (318). Значај PNI у карциному дојке је слабије проучен обзиром да представља ретку хистолошку карактеристику и у овим туморима је заступљена 10 пута ређе него LVI (327). Карциноми дојке у којима је присутна PNI показују већи T стадијум, хистолошки градус и присуство LVI (327). Упркос томе, иста студија је показала да пацијенти са PNI могу очекивати значајно петогодишње преживљавање након примене агресивне адјувантне терапије (регистрован је смртни исход у групи од 13 праћених пацијената након просечног праћења од 5,9 година) (327). Друге студије, такође нису доказале прогностички значај PNI у карциному дојке (328).

**Стромална-мононуклеарна реакција (SMR).** Стромална-мононуклеарна реакција (енгл. *Mononuclear Stromal Reaction*, SMR) настаје као последица антитуморског имунског одговора и означава интензитет мононуклеарне инфилтрације у строми и перитуморском ткиву, утичући на клинички ток малигнух тумора (329-332). Прогностички значај инфилтрације мононуклеарним ћелијама у хуманим карциномима је дуго проучаван (329-333). Такав имунски одговор укључује мононуклеарне, ефекторске ћелије попут В и Т лимфоцита, НК ћелије и макрофаге који уништавају ћелије тумора (334). Истакнуто је да инфилтрација ћелијама имунског система корелира са повољном прогнозом у медуларном карциному дојке (329-335) али су бројне сличне хистолошке студије дале опречне резултате. У неким студијама, приказан је позитиван прогностички значај мононуклеарног инфилтрата (329,330,332) док у другим студијама такав резултат није потврђен (336). Један од разлога оваквих резултата је испитивање различитих популација мононуклеарних ћелија попут лимфоцита, плазмоцита и неидентификованих група ћелија (332,336). Применом имунохистохемије нека истраживања су покушала да окарактеришу тип инфламацијских мононуклеарних ћелија код карцинома дојке (337). Ови резултати су показали да унутар запаљењског инфилтрата доминирају Т лимфоцити, укључујући помагачке и цитотоксичке Т лимфоците (338-340). *Shimokavara* и сарадници (340) су пронашли значајну корелацију између инфилтрације Т лимфоцитима, клиничког стадијума и хистолошких карактеристика карцинома дојке, што указује да Т лимфоцити представљају основу антитуморског имунског одговора.

**TNM класификација.** TNM класификација је међународно прихваћени стандард у стадирању карцинома, заснован на анатомским карактеристикама примарног тумора (T), ширењу у регионалне лимфне чворове (N) и потенцијалном присуству удаљених метастаза (M). Представила га је Међународна унија за контролу рака (енгл. *Union for International Cancer Control*, UICC) као важан критеријум у процени клиничког исхода код пацијената са карциномима различитих локализација (341).

- Т компонента одређује величину и инвазивност примарног тумора, са нумеричком вредношћу која се повећава са величином тумора и степеном локалног ширења (Табела 4).

- N компонента означава присуство или одсуство метастатски измењених регионалних лимфних чворова и независан је прогностички параметар. Нумеричка вредност означава број или локализацију тумором захваћених лимфних чворова (Табела 5 и 6).
- M компонента идентификује присуство или одсуство удаљених метастаза, укључујући и удаљене лимфне чворове. *Imaging* тестови попут позитронске емисионе томографије (енгл. *Positron emission tomography*, PET), компјутерске томографије (енгл. *Computed Tomography*, CT) и магнетне резонанце (енгл. *Magnetic resonance imaging*, MRI) се користе за процену и дијагностиковање метастаза у удаљеним органима (Табела 7).

У употреби су клиничка TNM и патохистолошка, pTNM класификација (енгл. *Pathologic TNM classification*).

Табела 4. Класификација карцинома дојке у зависности од анатомских карактеристика примарног тумора (T)

| T – Примарни тумор      |   |
|-------------------------|---|
| <b>T<sub>x</sub></b>    | Примарни тумор не може бити одређен   |
| <b>T<sub>0</sub></b>    | Нема доказа о постојању примарног тумора  |
| <b>T<sub>is</sub></b>   | In situ карцином  |
| T <sub>is</sub> (DCIS)  | Дуктални карцином <i>in situ</i>  |
| T <sub>is</sub> (LCIS)  | Лобуларни карцином <i>in situ</i>   |
| T <sub>is</sub> (Paget) | <i>Paget</i> -ова болест без присутног инвазивног и/или <i>in situ</i> (DCIS и/или LCIS) карцинома у ткиву дојке. Карциноми у паренхиму дојке повезани са <i>Paget</i> -овом болести се класификују према величини и карактеристикама паренхимске болести, иако је неопходно напоменути постојање напоменути <i>Paget</i> -ове болести. |
| <b>T<sub>1</sub></b>    | Тумор највећег пречника ≤ 20 mm   |
| T <sub>1mi</sub>        | Тумор највећег пречника ≤ 1 mm  |
| T <sub>1a</sub>         | Тумор највећег пречника > 1 mm али ≤ 5 mm   |
| T <sub>1b</sub>         | Тумор највећег пречника > 5 mm али ≤ 10 mm  |
| T <sub>1c</sub>         | Тумор највећег пречника > 10 mm али ≤ 20 mm   |
| <b>T<sub>2</sub></b>    | Тумор највећег пречника > 20 mm али ≤ 50 mm   |
| <b>T<sub>3</sub></b>    | Тумор највећег пречника > 50 mm   |
| <b>T<sub>4</sub></b>    | Тумор било које величине са локалним ширењем у зид грудног коша и/или кожу (улцерације или сателитски чворови у кожи). Зид грудног коша укључује ребра, међуребарне мишиће и предњи зупчасти мишић ( <i>serratus anterior</i> ), али не пекторални мишић.   |
| T <sub>4a</sub>         | Локално ширење у зид грудног.   |
| T <sub>4b</sub>         | Улцерација коже дојке и/или истострани сателитски чворови у кожи и/или Или едем коже (укључујући изглед поморанџине коре - <i>peau d'orange</i> ) без дијагностичких критеријума за инфламацијски карцином дојке.   |
| T <sub>4c</sub>         | T4a и T4b   |
| T <sub>4d</sub>         | Инфламацијски карцином  |

Табела 5. Карциноми дојке у зависности од броја и локализације метастатски измењених регионалних лимфних чворова (N)

| N – Регионални лимфни чворови |  |
|-------------------------------|--|
| N <sub>x</sub>                | Регионални лимфни чворови се не могу проценити (нпр. претходно су уклоњени)  |
| N <sub>0</sub>                | Регионални лимфни чвор без метастазе   |
| N <sub>1</sub>                | Метастаза у покретном истостраном аксиларном лимфном чвору (чворовима) нивоа I и II  |
| N <sub>2</sub>                | Метастазе у истостраном аксиларном лимфном чвору (чворовима) нивоа I и II, клинички фиксирани или сливени или клинички евидентном истостраном лимфном чвору (чворовима) око артерије мамарије интерне (или унутрашње мамарне артерије) у одсуству клинички евидентних метастаза у аксиларним лимфним чворовима   |
| N <sub>2a</sub>               | Метастазе у аксиларном лимфном чвору (чворовима) фиксирани међусобно (сливене) или за друге структуре  |
| N <sub>2b</sub>               | Метастазе само у клинички евидентном <sup>*</sup> лимфном чвору (чворовима) око артерије мамарије интерне (или унутрашње мамарне артерије) у одсуству клинички евидентних метастаза у аксиларним лимфним чворовима   |
| N <sub>3</sub>                | Метастазе у истостраном инфраклавикуларном (Ниво III аксиле) лимфном чвору (чворовима) са или без захватања лимфних чворова нивоа I и II аксиле или у клинички евидентном <sup>*</sup> лимфном чвору (чворовима) око артерије мамарије интерне (или унутрашње мамарне артерије) са клинички евидентним метастазама у аксиларним лимфним чворовима или метастаза у истостраном супраклавикуларном лимфном чвору (чворовима) са или без захватања аксиларних или лимфних чворова артерије мамарије интерне |
| N <sub>3a</sub>               | Метастазе у инфраклавикуларном лимфном чвору (чворовима)   |
| N <sub>3b</sub>               | Метастазе у лимфном чвору (чворовима) аксиле или артерије мамарије интерне   |
| N <sub>3c</sub>               | Метастазе у супраклавикуларном лимфном чвору (чворовима)   |

<sup>\*</sup>Појам клинички евидантан се дефинише као детектован клиничким прегледом или имџинг методама (искључујући лимфосцинтиграфију) са карактеристика високо суспектним на малигнитет или налаз суспектан на макрометастазе у цитолошком прегледу узорка добијеног аспирационом биопсијом танком иглом (fine needle aspiration cytology, FNA).

Патолошка класификација (pTNM) захтева макроскопски преглед примарног тумора на маргинама ресекције. Микроскопски детектовани тумори на маргини се такође могу класификовати као pT. pT категорије одговарају клиничким T категоријама уз напомену да је класификована pT величина тумора мера инванзивне компоненте. Патолошка класификација захтева ресекцију и преглед бар доњих аксиларних лимфних чворова. Таква ресекција ће обично укључивати 6 или више лимфних чворова. Ако су лимфни чворови негативни, а број прегледаних није довољан, класификују се као pN0.

Табела 6. Карциноми дојке у зависности од броја и локализације метастатски измењених регионалних лимфних чворова (pN)

| pN – Регионални лимфни чворови   |   |
|--|---|
| pN <sub>x</sub>  | Регионални лимфни чворови се не могу проценити (нису уклоњени ради испитивања или су претходно уклоњени)  |
| pN <sub>0</sub>  | Регионални лимфни чвор без метастазе* <i>Наномена</i> : Изоловане групе туморских ћелија (engl. Isolated tumor cell clusters, ИТС) су дефинисане као мање групе ћелија ≤ 0,2mm или појединачне ћелије или мање скупине ћелија < 200 ћелија на једном хистолошком пресеку. ИТС могу бити детектоване рутинским НЕ или ИНС бојењем. Чворови који садрже само ИТС се не убрајају у укупан број позитивних лимфних чворова за N класификацију али улазе у укупан број прегледаних лимфних чворова. ИТС обично не доказују метастатску активност, нпр. размножавање или реакцију строме. |
| pN <sub>0(i-)</sub>  | Метастазе у регионалним лимфним чворовима нису детектоване НЕ и/или ИНС   |
| pN <sub>0(i+)</sub>  | Метастазе у регионалним лимфним чворовим ≤ 0,2mm (уочене НЕ или ИНС методом, укључујући ИТС)  |
| pN <sub>0(mol-)</sub>  | Метастазе у регионалним лимфним чворовима нису детектоване НЕ и/или ИНС уз негативан RT-PCR налаз   |
| pN <sub>0(mol+)</sub>  | Позитиван RT-PCR налаз али метастазе у регионалним лимфним чворовима нису детектоване НЕ или ИНС бојењем  |
| pN <sub>1</sub>  | Микрометастазе или метастаза у 1 до 3 исто страна аксиларна лимфна чвора, односно истостраним унутрашњим чворовима дојке са метастазом откривеном дисекцијом стражарског лимфног чвора, али клинички није очигледна <sup>†</sup>  |
| pN <sub>1mi</sub>  | Микрометастаза (>0,2mm и/или више од 200 ћелија, али не >2mm)   |
| pN <sub>1a</sub>   | Метастаза у 1 до 3 аксиларна лимфна чвора, укључујући бар један чија је највећа димензија >2mm  |
| pN <sub>1b</sub>   | Унутрашњи лимфни чворови дојке са микроскопском метастазом откривеном дисекцијом стражарског лимфног чвора, али која клинички није очигледна <sup>†</sup>   |
| pN <sub>1c</sub>   | Метастаза у 1 до 3 лимфна чвора а унутрашњи лимфни чворови дојке садрже микроскопску метастазу откривену дисекцијом стражарског лимфног чвора, која није клинички детектована <sup>†</sup>  |
| pN <sub>2</sub>  | Метастазе у 4-9 истостраних аксиларних лимфних чворова или клинички очигледан <sup>‡</sup> лимфни чвор дуж мамарије интерне у одсуству аксиларних лимфонодалних метастаза   |
| pN <sub>2a</sub>   | Метастазе у 4-9 аксиларних лимфних чворова, укључујући бар један који је већи од 2mm  |
| pN <sub>2b</sub>   | Метастаза у клинички очигледном <sup>‡</sup> унутрашњем лимфном чвору (чворовима) дојке, у одсуству метастазе аксиларног лимфног чвора  |
| pN <sub>3</sub>  | Метастазе у ≥ 10 лимфних чворова аксиле или у инфраклавикуларним лимфним чворовима (аксиларни ниво III) или у клинички детектованом истостраном унутрашњем чвору (чворовима) од којих је најмање један позитиван у аксиларном нивоу I или II или у више од 3 аксиларна лимфна чвора и унутрашњим чворовима дојке са микрометастазама детектованим након дисекције стражарског лимфног чвора а која клинички није детектована <sup>†</sup> или у супраклавикуларним истостраним лимфним чворовима  |
| pN <sub>3a</sub>   | Метастаза у 10 или више аксиларних лимфних чворова (од којих је бар један већи од 2mm) или метастаза у инфраклавикуларним лимфним чворовима   |
| pN <sub>3b</sub>   | Метастаза у клинички очигледном <sup>‡</sup> унутрашњем лимфном чвору (чворовима) дојке у присуству позитивног аксиларног лимфног чвора (чворова); или метастаза у више од 3 аксиларна лимфна чвора и у унутрашњим лимфним чворовима дојке са микроскопском метастазом откривеном дисекцијом стражарског лимфног чвора, а која није клинички очигледна <sup>†</sup>   |
| pN <sub>3c</sub>   | Метастаза у супраклавикуларном лимфном чвору (чворовима)  |
| *Класификације је заснована на микроскопском прегледу лимфних чворова добијених након дисекције аксиле са или без биопсије стражарског лимфног чвора. Класификација је заснована на биопсији стражарског лимфног чвора без накнадне дисекције аксиларних лимфних чворова и означава се (sn) што је скраћеница од „sentinel node“, нпр. pN <sub>0(sn)</sub> |   |
| <sup>†</sup> “Није клинички очигледан“ се дефинише када није детектован клиничким прегледом или имџинг методама (искључујући лимфосцинтиграфију)   |   |
| <sup>‡</sup> “Клинички очигледан“ се дефинише као детектован клиничким прегледом или имџинг методама (искључујући лимфосцинтиграфију) са карактеристика високо суспектним на малигнитет или налаз суспектан на макрометастазе у цитолошком прегледу узорка добијеног аспирационом биопсијом танком иглом (fine needle aspiration cytology, FNA)            |   |

Табела 7. Стратификација карцинома дојке у зависности од броја присуства метастатских депозита у удаљеним органима (M)

| M – Удаљене метастазе   |   |
|---|---|
| <b>M<sub>0</sub></b>  | Без клиничких и радиографских доказа за постојање удаљених метастаза  |
| <b>cM<sub>0(i+)</sub></b>   | Без клиничких и радиографских доказа за постојање удаљених метастаза али су туморске ћелије молекуларним методама или микроскопски детектоване у циркулишућој крви, костној сржи или другом нерегионалним лимфном ткиву у пречнику до 0,2mm код пацијената без симптома и знакова који указују на постојање удаљених метастаза. |
| <b>M<sub>1</sub></b>  | Постојање метастаза је потврђено клиничким и радиографским прегледом и/или су хистолошки доказане у пречнику већем од 0,2mm   |
| <i>Напомена:</i> У односу на претходну TNM класификацију (6th ed.) укинута је категорија M <sub>x</sub> која је означавала не могућност процене удаљених метастаза. |   |

Категорије M<sub>1</sub> и pM<sub>1</sub> се даље могу делити на следећи начин (Табела 8):

Табела 8. Међународно прихваћене ознаке за ближе одређивање локализације клинички детектованих удаљених метастаза

|                       |     |                        |     |
|-----------------------|-----|------------------------|-----|
| <b>Плућа</b>          | PUL | <b>Кичмена мождина</b> | MAR |
| <b>Кости</b>          | OSS | <b>Плеура</b>          | PLE |
| <b>Јетра</b>          | HEP | <b>Перитонеум</b>      | PER |
| <b>Мозак</b>          | BRA | <b>Надбубрег</b>       | ADR |
| <b>Лимфни чворови</b> | LYM | <b>Кожа</b>            | SKI |
| <b>Остало</b>         | OTH |                        |     |

**Клинички стадијум болести.** Систем је развио Амерички заједнички комитет за рак (енгл. *American Joint Committee on Cancer, AJCC*) као стратификациони и прогностички систем (342,343). Заснован је на TNM класификацији и представља одредницу за одговарајуће лечење и прогнозу (Табела 9). Када су утврђене вредности за T, N и M компоненте, информације се групишу и изражавају кроз један од пет могућих стадијума у интервалу од 0 (карцином *in situ*) до IV (присуство удаљених метастаза). У зависности од TNM параметара клинички стадијуми I, II и III су подељени на подскупове означене великим латиничним словом (IA, IIB, IIIC итд.). Стадијум туморске болести представља строги индикатор прогнозе (343). Поред тога, овај параметар је све важнија компонента у праћењу и контроли карцинома, као и крајња тачка у скрининг тестовима и напору за рану детекцију карцинома.



Табела 9. Стадирање карцинома дојке према АЈСС критеријумима

| Груписање по стадијумима                  |   |  |                |
|---|---|--|----------------|
| Стадијум                                  | T   | N  | M              |
| <b>0</b>                                  | T <sub>is</sub>   | N <sub>0</sub>                                   | M <sub>0</sub> |
| <b>IA</b>                                 | T <sub>1</sub> <sup>*</sup>                                   | N <sub>0</sub>                                   | M <sub>0</sub> |
| <b>IB</b>                                 | T <sub>0</sub> , T <sub>1</sub> <sup>*</sup>                  | N <sub>1mi</sub>                                 | M <sub>0</sub> |
| <b>IIA</b>                                | T <sub>0</sub> , T <sub>1</sub> <sup>*</sup>                  | N <sub>1</sub> <sup>†</sup>                      | M <sub>0</sub> |
|   | T <sub>2</sub>  | N <sub>0</sub>                                   | M <sub>0</sub> |
| <b>IIB</b>                                | T <sub>2</sub>  | N <sub>1</sub>                                   | M <sub>0</sub> |
|   | T <sub>3</sub>  | N <sub>0</sub>                                   | M <sub>0</sub> |
| <b>IIIA</b>                               | T <sub>0</sub> , T <sub>1</sub> <sup>*</sup> , T <sub>2</sub> | N <sub>2</sub>                                   | M <sub>0</sub> |
|   | T <sub>3</sub>  | N <sub>1</sub> , N <sub>2</sub>                  | M <sub>0</sub> |
|   | T <sub>3</sub>  | N <sub>2</sub>                                   | M <sub>0</sub> |
| <b>IIIB</b>                               | T <sub>4</sub>  | N <sub>0</sub> , N <sub>1</sub> , N <sub>2</sub> | M <sub>0</sub> |
| <b>IIIC</b>                               | Било који T   | N <sub>3</sub>                                   | M <sub>0</sub> |
| <b>IV</b>                                 | Било који T   | Било који N                                      | M <sub>1</sub> |
| *T <sub>1</sub> укључује T <sub>1mi</sub> |   |  |                |
| †Позитиван RT-PCR                         |   |  |                |

Петогодишњи стопа преживљавања се односи на проценат пацијената који живе најмање пет година од постављања дијагнозе (Табела 10). Релативно преживљавање пореди преживљавање пацијената оболелих од карцинома дојке са очекиваним преживљавањем популације код које није дијагностикована ова болест. Смртни исход услед других узрока је искључена из анализе.

Табела 10. Стандардизоване стопе петогодишњег преживљавања пацијената са карциномом дојке у зависности од клиничког стадијума (SEER)

| Петогодишње преживљавање по стадијумима |      |
|---|------|
| Стадијум 0                              | 100% |
| Стадијум I                              | 100% |
| Стадијум II                             | 93%  |
| Стадијум III                            | 72%  |
| Стадијум IV                             | 22%  |

У табели 10 је приказана петогодишња стопа преживљавања код пацијената са карциномом дојке који су груписани по стадијумима. Подаци су преузети из базе података Националног института за надзор, епидемиологију и крајњи исход (енгл. *National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results, SEER*), Америчког удружења за

борбу против рака (енгл. *American Cancer Society*, ACC) (344). Појединачни резултати могу се разликовати у зависности од индивидуалних карактеристика пацијената као што су старост, опште здравље, менопаузални статус и додатни прогностички фактори у вези са карактеристикама тумора.

**Прогностички индекси.** Величина тумора, статус аксиларних лимфних нодуса, хистолошки тип и градус, као и статус хормонских рецептора представљају независне прогностичке факторе, који у карциному дојке дају значајне информације о ризику за рецидив болести (345). Прогностички индекси комбинују више независних прогностичких фактора (346). Као резултат развоја имунохистохемијске технике и детекције експресије онкогена, нови маркери карцинома дојке се користе појединачно или у комбинацији са другим прогностичким факторима (347,348).

*Nottingham*-ов прогностички индекс (енгл. *Nottingham prognostic index*, NPI) је предложен 1982. године а ревидиран 10 година касније (349,350). Обједињује величину тумора, статус аксиларних лимфних чворова и хистолошки градус, а израчунава се на основу формуле:

$$NPI = 0,2 \times \text{пречник тумора (cm)} + \text{хистолошки градус (1-3; G1, G2, G3)} + \text{статус лимфних чворова (1-3)}$$

Нодални статус се скорује од 1 до 3: скор 1 - група без метастаза у лимфним чворовима, скор 2 – метастазе у 1-3 нодуса и скор 3 - метастатски депозити су присутни у више од 4 лимфна нодуса. У зависности од вредности NPI, пацијенти се стратификују у три прогностичке групе: добру (скор мањи од 3,4) интермедијерну (скор од 3,4 до 5,4) и лошу (скор већи од 5,4). Већа вредност NPI указује на лошију прогнозу болести (350).

У бројним студијама NPI се показао као параметар који корелира са биолошким понашањем тумора уз различиту стопу периода без болести и укупног преживљавања пацијената (351). Прихваћен је као прогностички фактор који указује на метастатско понашање, брзину раста и генетску нестабилност карцинома дојке и предвиђа преживљавање пацијената у оквиру стратификованих група након постављања дијагнозе карцинома дојке (224,352-359). *Kwatra* и сарадници (360) су показали да NPI корелира са пречником и хистолошким градусом тумора, статусом лимфних нодуса, митотским

индексом, нуклеарним градусом, некрозом и микроваскуларном густином (енгл. *Microvessel density, MVD*) у карциному дојке. Показано је да је NPI значајан прогностички маркер у групи пацијената са мањим као и са већим туморима (360). Није утврђена корелација овог параметра са менопаузним статусом, лимфоцитним инфилтратом, инвазијом коже као и статусом хормонских рецептора (360).

*Имунохистохемијски прогностички индекс* (енгл. *Immunohistochemical prognostic index, IHPi*) се израчунава на основу појединачних скорова за експресије: ER, PR, HER2 и p53. Позитивност на HER2 и p53 се скорује са 1, а негативност са 0. Тумори позитивни на ER и PR се бодују са 1, а негативни са 0. IHPi скор се израчунава сабирањем појединачних скорова за експресију ова четири имунохистохемијска белега. Добијене вредности IHPi скора се крећу у интервалу од 0 до 4 на основу којих се тумори класификују у три прогностичке групе: добру (IHPi од 0 до 1), умерену (IHPi је 2) и лошу (IHPi од 3 до 4).

Имунохистохемијски фактори представљају једноставан и поуздан начин у процени прогнозе болести код младих пацијената (346). Раније је показано да је прекомерна експресија HER2 и p53 присутна у туморима млађих пацијенткиња, док је ER и PR позитивност значајно чешћа код старијих болесница (361-363). IHPi показује добру прогностичку вредност у туморима мањим од 2 cm, умерену код тумора од 2 до 5 cm и лошу код тумора већих од 5 cm (346).

## **1.2.5. Маркери карцинома дојке**

### ***1.2.5.1.Рецептор за естроген***

Рецептор за естроген (енгл. *Estrogene receptor, ER*) је члан суперфамилије нуклеарних рецептора који функционишу као лиганд зависини транскрипциони фактори (364-366). Естроген се везује за лиганд везујући домен лоциран на С крају ER и иницира даљу сигнализацију. Овако активирани и димеризовани ER се преко свог DNA домена везује за геномске специфичне естрогенске елементе и контролише транскрипцију циљних гена како би обавили конкретне физиолошке активности. Ови гени кодирају протеине укључене у DNA синтезу, контролу ћелијског циклуса, преживљавање ћелије, као и полипептидне факторе раста и њихове рецепторе, друге рецепторе, протеазе, катепсин D,

колагеназе, ангиогенетске факторе раста и многе друге (226,227). Поред овога, описан је индиректни механизам деловања у коме се ER не везује директно за DNA, већ интерреагује са постојећим факторима транскрипције (нпр. *fos/jun*), који ограниченим механизмом обавља транскрипцију гена. Постоје две изоформе ER. ER $\alpha$  је клониран током '80-их година прошлог века и његова структура и функција су добро описане и проучене, док је ER $\beta$  идентификован у ткиву простате, тек 1996.године. *In vitro* и *in vivo* употреба антиестрогена, је указала на читав низ ефеката који се испољава на нормалном и ткиву тумора дојке: ћелијску пролиферацију, преживљавање, диференцијацију и ангиогенезу. Експресија ER је један од најјачих предиктивних фактора у карциному дојке. Око 60% оболелих жена млађих од 50, а чак 80% старијих од 50 година, поседује ER<sup>+</sup> тумор, што има значајну терапијску импликацију (367). Веома је важан у процесу карциногенезе, због чега инхибиција ER, циљном ендокрином терапијом, коришћењем слабих естрогених агониста (селективни модулатори ER) или индиректном блокадом конверзије андрогена у естроген (инхибитори ароматазе), представља главни облик адјувантне и терапије метастатског карцинома дојке (368,369). ER<sup>+</sup> и/или PR<sup>+</sup> (енгл. *Progesterone receptor*) карциноми дојке имају знатно нижи морталитет у односу на ER<sup>-</sup> и/или PR<sup>-</sup> и зависни су од других клиничко патолошких карактеристика (370).

### **1.2.5.2. Рецептор за прогестерон**

Рецептор за прогестерон (енгл. *Progesterone receptor*, PR) је попут ER члан фамилије нуклеарних рецептора кога одликује способност да веже лиганд у цитоплазми, димеризује и уђе у једру где се везује за DNA и активира гене. Обухвата две изоформе PR $\alpha$  и PR $\beta$ , које кодира један ген на хромозому 11, користећи два различита промотера (371). PR $\alpha$  и PR $\beta$  поседују лиганд и DNA везујући домен на С крају (371). Интеракцијом са лигандом, рецептор се активира што проузрокује конформацијске промене и димеризацију, након чега DNA везујућим доменом активира транскрипцију гена. Потврђено је да се PR везује за промотере познатих циљних гена попут LIFR, GATA2, CYP26A1, IHH, EGFR и WNT7A (371). Код већине стероидних рецептора, постоје два региона активације транскрипције AF-1 и AF-2, а само PR $\beta$  изоформа садржи додатни, трећи домен AF-3 (371). Постоји и трећа изоформа PR, за коју се сматра да појачава транскрипциону активност PR $\alpha$  и PR $\beta$  у ћелијама карцинома дојке (371). У одсуству лиганда, протеин је везан за молекул

„пратилац“ и корепресорски комплекс. PR може да обавља неканонску активност унутар цитоплазме (371). Након стимулације прогестероном, изоформе PR услед присуства полипролинског мотива, који лежи изнад AF-1 домена, интерреагују са SH3 доменом SRC што резултира, активацијом сигналног пута Ras/Raf/MAPK (371).

Повећана експресија PR указује на повољну прогнозу болести и корелира са добром диференцијацијом карцинома дојке. Утицај прогестерона на развој и прогресију карцинома дојке је, поред великог броја истраживања, још увек нејасан. Разлог се огледа у чињеници да је физиологија хумане дојке компликована и нема еквивалентног животињског модела. Такође, трансформисане ћелије у односу на нормалне показују специфичност у погледу регулације, због чега изоформе прогестерона и PR имају различит утицај на ове ћелије. Степен експресије PR је повезан са бољим одговором на хормонску терапију и дужим укупним преживљавањем (372). Користећи двоструки имунохистохемијски метод, применом PR $\alpha$  и PR $\beta$  у пролиферативним болестима без атипичности, утврђено је повећање експресије обе изоформе овог рецептора уз неизмењен однос њихове експресије у односу на здраво ткиво дојке. Значајно већа вредност у експресији једне изоформе је регистрована код пацијената са инвазивним дукталним карциномом. Код половине испитаника у туморским ћелијама је забележена већа експресија PR $\alpha$  у поређењу са PR $\beta$  (373).

PR $\alpha$  и PR $\beta$  су функционално различити и карактеришу их специфичности у погледу инхибиције транскрипције посредоване преко ER, при чему PR $\alpha$  показује јаче репресорске особине у поређењу са PR $\beta$  (374). На основу тога, однос PR $\alpha$ /PR $\beta$  у туморским ћелијама може да предвиди исход ендокрине терапије која је усмерена против ER. Студија која се бавила терапијским одговором на тамоксифен, у зависности од односа PR $\alpha$ /PR $\beta$ , показала је да већа вредност овог параметра корелира са краћим периодом без болести, при чему је у туморским ћелијама забележено значајно повећање присуства обе изоформе (375).

### 1.2.5.3. Хумани епидермални фактор раста -2 (HER2)

Хумани епидермални фактор раста-2 (енгл. *Human epidermal growth factor receptor-2*, HER2) је члан породице рецептора епидермалног фактора раста са тирозин-киназном активношћу и игра значајну улогу у патогенези бројних хуманих карцинома (222,376-378). Рецептори ове фамилије броје четири члана: HER1 (ERBB1), HER2 (ERBB2), HER3 (ERBB3) и HER4 (ERBB4) који су у карциногенезу укључени активацијом бројних сигнални путева (379). За рецепторе ове породице карактеристични су цистеином богат, екстрацелуларни, лиганд-везујући домен и унутарћелијски домен са тирозин-киназном активношћу (380). Везивање лиганда за екстрацелуларни домен условљава димеризацију и трансформацију унутарћелијског домена (222). До данас није откривен HER2 специфични лиганд (222). Сматра се да активација HER2 настаје конститутивно или процесом хетеродимеризације са другим члановима породице рецептора хуманог епидермалног фактора раста (222). Након формирања хомо- или хетеродимерског комплекса одвија се процес аутофосфорилације тирозинског остатка унутар цитоплазматског домена и последична активација бројних сигналних путева (222). Нисходна HER2 активација молекула MAPK, PI3K и PKC (енгл. *Protein kinase C*) условљава ћелијску пролиферацију и диференцијацију, преживљавање, ангиогенезу, као и инвазивност (222). Димеризацијом HER2 разграђује се протеин p27, моћни инхибитор ћелијског циклуса (376,381,382). Хетеродимерски комплекс HER2-HER3 активира PI3K која регулише раст и преживљавање ћелија (222). HER2 може да буде активиран у комплексу са другим мембранским рецепторима попут рецептора сличног инсулинском фактору раста (енгл. *Insulin-like growth factor receptor*, IGF-1R) (383).

Амплификација гена или прекомерна експресија HER2 јавља се у 15-30% карцинома дојке, као и 10-30% карцинома желуца и једњака, са значајном прогностичком и предиктивном улогом (221,222). Прекомерна експресија HER2 је детектована у карциномима: јajника, ендометријума, мокраћне бешике, плућа, дебелог црева, као и главе и врата (384,385). Циљана терапија инхибиторима HER2 сигнализације значајно побољшава исход болести у HER2 позитивним карциномима дојке, желуца и једњака за разлику од других HER2 позитивних тумора (222). Амплификација HER2 је повезана са краћим периодом без болести и укупним преживљавањем у карциному дојке (386). *Press* и

сарадници (387) су показали да група „нодус негативних“ болесница са прекомерном експресијом HER2 у ткиву карциномима дојке има 9,5 пута већи ризик од релапса болести у односу на групу HER2 негативних болесница. Амплификација гена за HER2 значајно корелира са патолошким стадијумом болести, бројем метастатски измењених лимфних чворова аксиле, хистолошким типом, као и одсуством експресије ER и PR (388). Студије показују да је амплификација HER2 рани догађај у прогресији хуманог карцинома дојке (222). Евидентирана је у готово 50% дукталних *in situ* карцинома дојке и одржава се током процеса метастазирања (389). У карциному дојке амплификација HER2 повећава сензитивност и цитотоксичних хемотерапеутика, резистенцију на антихормонску терапију и склоност настанку удаљених метастаза (390). Анализа и дијагноза карцинома дојке укључује стандардно имунохистохемијско одређивање HER2 статуса (391,392).

#### **1.2.5.4. p53**

p53 је тумор супресорски ген који кодира продукцију истоименог протеина са биолошком улогом у заустављању ћелијског циклуса и/или индукцији апоптозе (393). Већину хуманих карцинома карактерише инактивација или неадекватна функција протеина p53 (394,395). Изостанак нормалне функције p53 праћен је акумулацијом оштећења на DNA у ћелији и трансформацијом у малигну ћелију (394).

p53 активира софистициран систем за детекцију и поправку грешака, због чега се назива „чувар“ генома. Као одговор на оштећења DNA, p53 зауставља ћелијски циклус и индукује апоптозу (396). Још 1991. године је показано да, неизмењени протеин p53 (*Wild type*), индукује апоптозу у ћелијама леукемије, као и да је његова про-апоптотска улога доминантна у односу на улогу негативног регулатора ћелијског циклуса (397,398). Своју функцију *Wild type* p53 остварује везивањем за DNA, док мутирани протеин мења своју конфигурацију везујући се за DNA знатно мањим афинитетом. Полуживот p53 је врло кратак због чега се не акумулира у ћелијама. Мутације гена за p53 условљавају продукцију функционално измењеног и стабилног нуклеарног протеина са знатно дужим полуживотом. За разлику од *Wild type* p53, измењени протеин p53 се нагомилава у туморским ћелијама и детектује се имунохистохемијском методом.

Највећи број мутација p53 настаје унутар DNA везујућег домена што спречава обављање транскрипције циљаних гена. Као транскрипциони фактор p53 „циља“ бројне, већим делом још увек неиспитане, гене (399). Раније студије су показале да се *Wild type* p53 везује за промотерски регион BAX гена (енгл. *BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator*) и регулише његову транскрипцију (400,401). BAX је члан BCL2 породице (енгл. *B-cell lymphoma 2*) који са BCL2 формира хетеродимер и инхибира његову активност (402). FAS (CD95, Apo-1, TNFRSF6, FasR) је још један од фактора апоптозе који се назива рецептор „смрти“ (394). Обавља важну улогу у апоптози индукованој цитотоксичним агенсима и укључује активацију *Wild type* p53(403,404).

p53 индукује заустављање ћелијског циклуса у G1 фази активацијом транскрипције p21, снажног инхибитора циклин-зависне киназе (енгл. *Cyclin-dependent kinase, Cdc*) (405). Прелазак из G2 → M фазу ћелијског циклуса, p53 регулише репресијом циклина B1 (406). Блокада уласка ћелије у митозу укључује p53 инхибицију *Cdc2*, који је неопходан за функцију циклина B1 (406).

Мутације p53 су рани догађај у карциногенези. Присутне су у бенигним и *in situ* лезијама дојке, а експресија се појачава са прогресијом тумора све до настанака метастаза. Учесталост ових мутација варира од приближно 10% код малигних болести крви до 50-70% код тумора јајника, колоректалне и регије главе и врата (407). Мутације за p53 у герминативним ћелијама проузрокују наследни *Li Fraumeni* синдром, који најчешће укључује карцином дојке, као и мекоткивне саркоме и карциноме других локализација (408). Понекад, мутирани p53 не води у губитак нормалне функције *Wild type* протеина, већ промовише карциногенезу алтернативним механизмима (407).

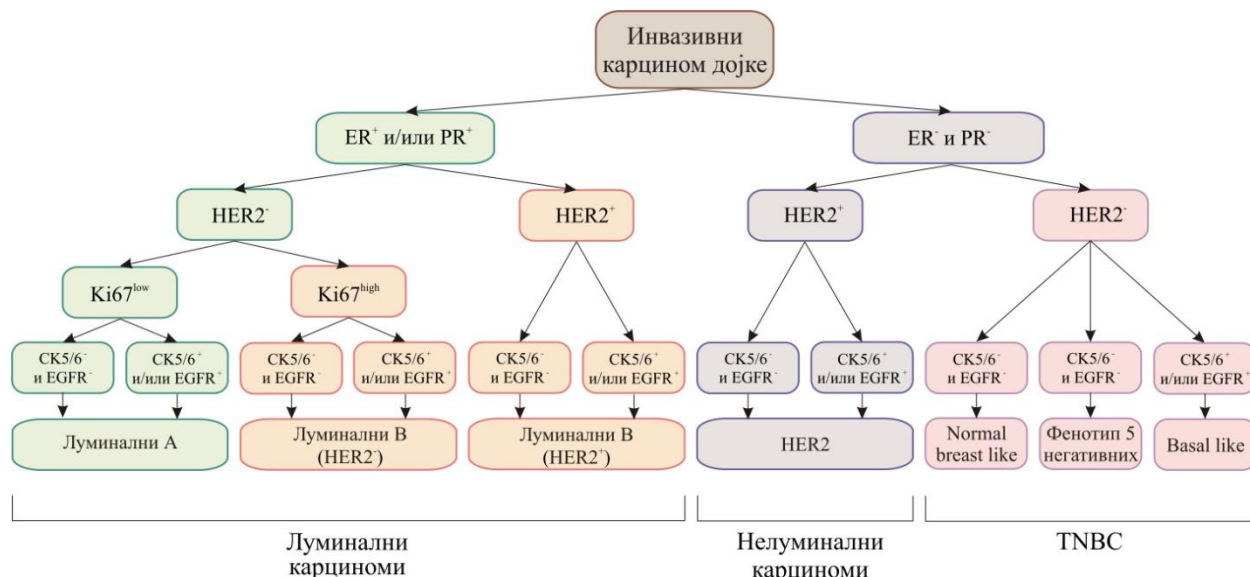
Методом секвенционирања DNA и анализом 6000 пацијената са карциномом дојке из више од 25 студија, потврђен је прогностички значај мутација p53 (409). Касније студије су потврдиле да присуство мутација условљава краће укупно преживљавање и период без болести. *Borresen* и сарадници (410) су закључили да су мутације у цинк везујућим доменима повезане са лошијом прогнозом у односу на друге типове мутација. Касније је додато да пацијенти са мутацијама које оштуђују DNA или везивање цинка, испољавају агресивнији фенотип са краћим укупним преживљавањем. Такође, мутације присутне у конзервисаним регионима 2 и 5 показују лошију прогнозу у односу на неконзервисане



регионе (411). Новије студије су претежно усмерене ка одређивању значаја мутација у предикцији одговара на адјувантну терапију. Показано је да пацијенти са туморима који поседују мутације у p53 имају слаб терапијски одговор (411). Локално унапредовали карциноми дојке са мутацијама у цинк везујућим доменима корелирају са резистенцијом на примену хемиотерапеутика (412,413).

### 1.2.6. Молекулска класификација карцинома дојке

*Perou* и сарадници (224) су проучавајући генску експресију у молекулу DNA, предложили прву молекулску субкласификацију карцинома дојке. Анализирајући 155 карцинома дојке, запажена је експресија појединих сетова или образаца експресије гена карактеристичних за специфични тумор. На основу резултата, истраживачи су карциноме дојке класификовали у 5 подгрупа са различитом прогностичким значајем: луминални А, луминални Б, карциноми са прекомерном експресијом HER2, базалоидни (*basal like*), и подгрупу карцинома сличних неизмењеном ткиву дојке (352,414). Све ове подгрупе су обухваћене већим групама у зависности од статуса ER (ER<sup>+</sup> и ER<sup>-</sup>) (354,356,415,416). Два субтипа су груписана у ER<sup>+</sup> (луминални А и луминални В) а три у ER<sup>-</sup> (HER2, „*basal-like*“ и карциноми налик нормалном ткиву дојке). Тумори ових подгрупа се разликују у биолошком понашању, прогнози и терапијском одговору на лечење (414,417). Подгрупа луминалних А тумора је показала најбољу прогнозу, *basal like* и HER2 тумори најлошију док су тумори груписани у луминалну В категорију имали интермедијарно преживљавање у односу на друге групе. Као јефтинија а ефикасна, данас се примена имунохистохемијских, сурогат, маркера користи за рутинску класификацију карцинома дојке у молекулске субтипове (418-420). Сурогат систем је заснован на примени и одређивању експресије пет имунохистохемијских маркера: ER, PR, HER2, цитокератин 5/6 и EGFR (419,421). Поред наведених пет категорија, и сарадници су описали ретку групу 5-негативних карцинома која је повезана са мутацијама у BRCA1 (422).



Слика 3. Молекуларна класификација карцинома дојке применом имунохистохемијских „сурогат“ белега

### 1.2.7. Епидемиологија карцинома дојке

Током 2010. године у свету је регистровано око 1,4 милиона нових случајева болести и преко 450.000 смртних исхода са дијагнозом карцинома дојке (423,424). Епидемијски талас ове болести погађа развијене, као и земље у развоју (424). Расподела броја оболелих је била готово равномерна у 2010. години, док је број смртних исхода у земљама у развоју био за око 40% већи у односу на развијене земље (424). Студије оптерећења су показале да је карцином дојке најзначајнији узрок малигну болести у популацији жена како у свету тако и у Србији. Целоживотни ризик оболевања од карцинома дојке износи око 12,4%, што значи да једна од осам жена оболи од ове болести (424). На глобалном нивоу, учесталост карцинома дојке је око 25% у односу на друга дијагностикована малигна обољења (до 28% у најразвијенијим земљама) уз стопу морталитета од 14-15% (424). У Србији, 20,2% оболелих и 18,2% умрлих жена због малигну тумора има дијагнозу карцинома дојке (425). У периоду од 1990 до 2013. године, просечна стандардизована стопа инциденце карцинома дојке на територији централне Србије је износила 50,5/100.000, док је стопа морталитета била 19,2/100000 (425). Подаци из 2012. године

показују да се у земљама Европске уније просечна годишња инциденца карцинома дојке креће у распону од 58,6/100000 (Грчка) до 147,5/100000 (Белгија), а стопа морталитета од 15,1/100000 (Естонија) до 29,5/100000 (Белгија) (426). Исте године у Србији (са Косовом) је забележена инциденца од 92,3/100000 уз стопу морталитета од 31,5/100000 која је на другом месту у Европи, после Македоније (36,3/100000) (426). Географска дистрибуција карцинома дојке на глобалном нивоу није равномерна. Подручја у којима се региструје највећа учесталост болести су западна Европа, северна Америка, Аустралија, Нови Зеланд и неке земље јужне Америке (Аргентина), што се приписује вишој преваленцији познатих фактора ризика за ову болест у поменутиим регионима (423). У европској популацији, највећа инциденца се региструје у западној и северној Европи, док је у јужној и источној Европи значајно нижа (423). Систематска анализа оболевања и умирања од карцинома дојке која је укључивала податке регистара за рак из 187 земаља, показала је да учесталост болести на глобалном нивоу континуирано расте већ 630 година и да тај пораст износи 3,1% годишње, док морталитет варира (424). Анализа кретања инциденце карцинома дојке у западноевропским земљама показала је тренд драматичног пораста, посебно код жена старијих од 50 година, што се делом приписује чешћем и ранијем откривању болести, односно ефектима организованог скрининга, али и ефектима демографске транзиције, који воде повећању броја жена у ризику од болести (423). У САД и развијеним земљама забележено је значајно смањење, док у Европи кретање стопе морталитета карцинома дојке последњих деценија има различите тенденције и креће се од смањења за око 30% у Енглеској, до повећања од око 25% у Естонији (424).

### 1.3. Ћелијска смрт. Врсте ћелијске смрти.

Смрт ћелије се дефинише као иреверзибилни губитак интегритета плазма мембране (427). Историјски гледано, на основу морфолошких критеријума у ћелијама сисара постоје три врсте ћелијске смрти:

1. Тип I или апоптоза се карактерише променама у морфологији једра укључујући кондензацију хроматина (пикнозу) и фрагментацију (кариорекса), мање промене у органелама цитоплазме, смањивање ћелије, бубрење плазма мембране и формирање апоптотских тела које садржи нуклеарни или цитоплазматски материјал.
2. Тип II или аутофагија се одликује формирањем аутофагозома, вакуола са двоструком мембраном.
3. Тип III или некроза се у морфолошком смислу често дефинише као смрт која нема карактеристике апоптозе и аутофагије. Још једна од честих дефиниција некрозе на основу морфолошких критеријума је рана руптура плазма мембране и дилатација цитоплазматских органела, посебно митохондрија (427,428).

Диференцијација различитих типова ћелијске смрти је од посебне важности. Некроза се често повезује са неоправданим губитком ћелија у хуманој патологији (429-431) и може условити локалну инфламацију ослобађањем бројних медијатора из мртвих ћелија које алармирају имунски систем (428,429,432). Поред тога, клиренс апоптотских ћелија је другачији у односу на некротичне ћелије (433). Смањене апоптотске ћелије бивају фагоцитоване у потпуности, док се набубреле некротичне ћелије фагоцитују само парцијано (434).

#### 1.3.1. Апоптоза (основне карактеристике, механизми, биолошки значај)

Апоптоза је процес програмиране ћелијске смрти који се одликује специфичним морфолошким карактеристикама и представља енергетски зависан биохемијски механизам. Откривана је више пута и исто толико пута заборављана. *Vogt*, 1842. године по први пут описује ћелијску смрт код водоземаца. *Fleming*, 1885. године открива ћелијску смрт зечијег *de Graf-ovog* фоликула што је први откривени случај ћелијске смрти у склопу

физиолошких функција. *John Kerr* 1972. године у свом истраживању уводи термин апоптоза и описује је као врсту ћелијске смрти која се разликује од некрозе, називајући је скупљајућа некроза (енгл. *shrinkage necrosis*) (435).

Апоптоза је високо регулисан процес елиминисања нефункционалних и непожељних ћелија који се дешава у појединачној ћелији и независно од околних (434). Постоји велики број стимулуса који у физиолошким и патолошким стањима покрећу апоптозу (434). Апоптоза је саставна компонента нормалног промета ћелија, правилног развоја и функционисања имунског система, атрофије услед утицаја хормона, ембрионалног развоја и ћелијске смрти услед деловања хемијских агенаса (434,436). Неадекватна апоптоза, било да је појачана или смањена, учествује у патогенези многих болести попут исхемијских оштећења, неуродегенеративних, аутоимунских и малигних болести (434).

Светлосна и електронска микроскопија су идентификовале многе морфолошке промене унутар ћелије током апоптозе (437). На почетку процеса, применом светлосног микроскопа, уочава се смежување ћелије и пикноза једра (435). Смежување ћелије последица је разарања ламинина и актинских филамената цитоскелета. Смежувањем, ћелије губе волумен, док цитоплазма постаје густа а органеле густо збијене. Пикноза настаје као последица кондензације хроматина и представља једну од најбитнијих морфолошких карактеристика апоптозе. Долази до инверзије ћелијске мембране и излагања фосфатидил-серина на спољашњој њеној страни мембране. У исто време разара се ћелијски матрикс, фрагментише једро и распарчава DNA. Апоптотске ћелије постају овалне или округле са тамном еозинофилном цитоплазмом и густим хиперхроматичним фрагментима хроматина. Хистолошка испитивања на HE бојеним препаратима показала су да апоптоза укључује појединачне или мање групе ћелија. Бубрење мембране настаје након кариорексе и одвајања ћелијских фрагмената у апоптотска тела. Апоптотска тела садрже цитоплазму са густо распоређеним органелама са или без нуклеарних фрагмена. Интегритет ћелијских органела није нарушен услед одржања интактне ћелијске мембране. Овако формирана апоптотска тела фагоцитују макрофаги, док неопластичне и паренхимске ћелије улазе у састав фаголизозома. Излагање фосфатидил-серина на спољњој површини ћелијске мембране представља рани догађај у процесу и служи као „поједи ме“ сигнал (енгл. *Eat me signal*) за околне фагоците, који га препознају

рецепторима за обрасце оштећења. Макрофаги који фагоцитују апоптотска тела се налазе у реактивним герминативним центрима лимфних фоликула или ређе у кортексу тимуса. Брза и ефикасна фагоцитоза апоптотских ћелија спречава ослобађање ћелијског садржаја у околно ткиво и последичну запаљењску реакцију као и развој секундарне некрозе. Ћелије захваћене апоптозом не производе антиинфламацијске цитокине.

### ***1.3.1.1. Механизам апоптозе***

Досадашња истраживања су указала да постоје два главна пута у иницијацији и индукцији апоптозе: спољашњи или путем рецептора смрти и унутрашњи или митохондријски пут (434). *Ighei* и (438) сарадници су показали да ова два пута повезују заједнички молекули путем којих ове две путање могу међусобно утицати једна на другу. Поред ова два, описан је и додатни пут који укључује Т ћелијску цитотоксичност посредством перфоруина и гранзима А и В (434). Сва три пута се међусобно спајају и формирају пут извршења. Овај пут се покреће цепањем каспазе-3, што за последицу има фрагментацију DNA, деградацију цитоскелета и нуклеарних протеина, повезивање протеина, формирање апоптотског тела, експресију лиганата за рецепторе фагоцита и фагоцитозу (434). Пут преко гранзима активира паралелну, каспаза независну, путању ћелијске смрти, преко оштећења једног ланца DNA (439).

#### ***1.3.1.1.1. Ћелијска смрт индукована рецепторима смрти: спољашњи сигнал***

Спољашњи сигнални путеви који иницирају апоптозу подразумевају активацију трансмембранских рецептора смрти као што су чланови породице рецептора за TNF (енгл. *Tumor necrosis factor receptor*, TNFR) (440). Чланови ове фамилије рецептора поседују екстрацелуларни домен богат цистеином као и цитоплазматски домен од 80 аминокиселина познат као „домен смрти“ (441). Домен смрти игра критичну улогу у преношењу сигнала са површине ћелије до унутарћелијских сигналних путева. До данас, најбоље описани лиганди смрти и њихови рецептори су FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 и Apo2L/DR5 (441-445).

Редослед догађаја који дефинишу спољашњи механизам апоптозе најбоље су описани и окарактерисани проучавањем FasL/FasR и TNF- $\alpha$ /TNFR1 лиганата и њихових рецептора.

Везивање лиганда смрти (FasL) за рецептор смрти (FasR) омогућује груписање рецептора (рецепторску тримеризацију) и везивање за хомотримерске лиганде (434). Након везивања лиганда, регрутује се цитоплазматски адапторски протеин који се својим „доменом смрти“ везује за рецептор. Везивање FasL лиганда за FasR резултира везивањем адапторског протеина FADD (енгл. *Fas-Associated protein with Death Domain*), док везивање лиганда TNF за TNFR1 резултира везивањем адапторског протеина TRADD (енгл. *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*) и укључивањем FADD и RIP киназа (енгл. *Receptor-interacting protein kinases*) (446). Протеин FADD је повезан са прокаспазом-8 (434). Димеризацијом домена смрти и његовом следственом активацијом, укључује се читава каскада ефекторских каспаза (434). Формирани сигнални комплекс индукује аутокаталитичку активацију прокаспазе-8 (447).

Апоптоза посредована активацијом рецептора смрти може бити инхибирана применом протеина с-FLIP, који се везује и инактивира FADD и каспазу 8 (447). Протеин Toso негативно регулише апоптозу блокадом FasR на Т ћелијама и инхибицијом каспазе 8 (448).

#### *1.3.1.1.2. Ћелијска смрт као резултат губитка стимулуса за преживљавање: унутрашњи сигнал*

Унутрашњи сигнални путеви који иницирају апоптозу обухватају низ стимулуса који нису посредовани рецепторима смрти (434). Стимулуси који иницирају унутрашњи пут апоптозе, продукују унутарћелијске сигнале који делују позитивно или негативно. Негативни сигнали укључују одсуство одређених фактори раста, хормона и цитокина што инхибира програм смрти (434). Стимулуси који делују на позитиван начин укључују зрачење, токсине, хипоксију, хипертермију, вирусне инфекције и присуство слободних радикала (434).

Наведени чиниоци узрокују промену интегритета унутрашње митохондријалне мембране, што условљава отварање „пора митохондријалног транспорта“ (енгл. *Mitochondrial permeability transition MPT pore*), губитак трансмембранског потенцијала митохондрија и ослобађање про-апоптотских протеина у цитосол (449). У ове проапоптотске протеине убрајају се цитохром-с, Smac/Diablo (енгл. *Second mitochondria-derived activator of*

*caspases*) и серин протеазе HtrA2/Omi (енгл. *Serine protease HTRA2, mitochondrial*) (450-452) и активирају пут зависан од каспаза. Цитохром-с се везује за фактор активације апоптозе-1 (енгл. *Apoptotic protease activating factor 1, Araf-1*) уз утрошак АТФ-а (енгл. *Adenosine triphosphate*) и активира прокаспазу-9, формирајући „апоптозом“ (453,454). Апоптозом даље активира каспазу-3 након чега се формира апоптотско тело (434).

Груписање молекула прокаспазе 9 даље активише процес апоптозе. Smac/Diablo и HtrA2 промовишу апоптозу негативном регулацијом протеина који инхибирају апоптозу (енгл. *Inhibitors of apoptosis proteins, IAP*) (451,455). Експерименти су показали да везивање митохондријалних протеина за IAP само по себи није довољно за индукцију проапоптотског ефекта (456).

Контролу и регулацију митохондријског пута активације апоптозе спроводе молекули чланови фамилије протеина BCL2 који контролишу пермеабилност митохондријске мембране и могу имати проапоптотски или антиапоптотски ефекат (457). p53 тумор супресорски ген обавља улогу контроле у регулацији фамилије протеина BCL2 још увек недовољно проученим механизмом (458). Идентификовано је 25 гена у фамилији BCL2. Група антиапоптотских протеина ове фамилије укључује: BCL2, BCLX, BCLXL, BCLXS, BCLW и BAG, док су у протеине са проапоптотском улогом укључени: BCL10, BAX, BAK, BID, BAD, BIM, BIK и BLK (434). Сматра се да је главни механизам деловања фамилије протеина BCL2 регулисан ослобађањем цитохрома-с из митохондрија, као и променама у пропустљивости митохондријалне мембране (434).

Унутрашњи путеви апоптозе представљају пасивну ћелијску смрт. Не захтевају активне сигнале из рецептора смрти. Названи су још и смрт услед запостављања или занемаривања јер ћелија умире апоптозом ако није заштићена стимулусима за преживљавање.

#### *1.3.1.1.3. Ћелијска смрт индукована перфоринима и гранзимима*

Цитотоксичност посредована путем Т лимфоцита подразумева да CD8<sup>+</sup> лимфоцити убијају ћелије које су носиоци антигена (434). CD8<sup>+</sup> лимфоцити имају могућност да убију циљне ћелије активацијом спољашњег пута преко сигналног пута FasL/FasR, који је доминантни начин индукције апоптозе цитотоксичним Т лимфоцитима (459). Ове ћелије



цитотоксични ефекат испољавају на туморске и ћелије инфициране вирусом путем секреције перфорина (434). Перфорини су пептиди који праве поре у ћелијској мембрани кроз које у ћелију улазе и други макромолекули излучени из гранула цитотоксичних Т лимфоцита (460). Серин протеазе гранзим-А и В су најважније компоненте гранула (461).

Гранзим В активира прокаспазу-10 и разлаже ICAD (енгл. *Inhibitor of caspase-activated DNase*) (462). Такође, гранзим-В може да користи митохондријални пут за појачавање сигнала смрти разлагањем Bid протеина и индукцијом цитохрома-с (463). Поред тога, овај молекул може да активира каспазу-3 чиме се прескаче целокупна каскада и директно индукује фаза извршења апоптозе (434).

Гранзим-А је важан у индукцији апоптозе преко цитотоксичних Т ћелија, активацијом путање независне од каспаза (434).

### **1.3.1. 2.Значај апоптозе**

Физиолошка улога апоптозе је подједнако важна, комплементарна и супротна од митозе и ћелијске пролиферације у регулацији различитих ћелијских популација (434). Како би се одржала нормална хомеостаза, процењује се да у људском организму дневно умире око 10 милиона ћелија чиме се број ћелија у одређеној популацији одржава у релативно константном броју (464). У одређеним условима, током развоја организма, старења или у току болести број умирућих ћелија се значајно може повећати (434). Нервни и имунски систем настају кроз прекомерну продукцију ћелија, која је праћена апоптозом ћелија које нису успеле да формирају функционалну синапсу или адекватан антигенски рецептор (465,466). Значајна је током зарастања рана у елиминацији ћелија имунског система и процесу фиброзе и гранулације. Поремећај апоптозе проузрокује формирање прекомерног фиброзног и ожиљног ткива (467). Апоптоза игра важну улогу и у инволуцији ткива дојке након периода лактације и атрезии постовулаторног фоликула (468,469). Са старењем организма ћелије које брже пропадају уклањају се апоптозом. Сматра се да оксидативни стрес игра важну улогу у патофизиологији апоптозе, кроз оштећење митохондријалне DNA (470,471).

Поремећај у регулацији ћелијске смрти је значајна компонента болести попут карцинома, AIDS-а (енгл. *Acquired immune deficiency syndrome*), неуродегенеративних и многих других болести. У овим болестима апоптоза је негативно или позитивно регулисана (434). У карциномима су нормални механизми регулације ћелијског циклуса дисфункционални што се манифестује прекомерном пролиферацијом и/или смањеном апоптозом ћелија (472). Сматра се да супресија апоптозе у склопу карциногенезе игра главну улогу у развоју и прогресији карцинома (473). Постоји читав низ молекулских механизма којима ћелије сузбијају апоптозу. Неки од њих подразумевају прекомерну експресију антиапоптотских протеина попут BCL2 или негативну регулацију или мутацију проапоптотских протеина попут BAX. Поједини облици лимфома хуманих В ћелија имају прекомерну експресију Bcl-2 што то је један од првих доказа да смањена апоптоза доприноси развоју и прогресији карцинома (474). Мутације супресорског гена p53 такође доводе до поремећаја апоптозе. Овај транскрипциони фактор регулише ћелијски циклус и најчешћи је мутирани ген у највећем броју хуманих карцинома (475).

Синдром стечене имунодефицијенције (енгл. *Acquired immune deficiency syndrome, AIDS*) је пример аутоимунске болести која настаје након инфекције вирусом хумане имунодефицијенције (енгл. *Human immunodeficiency virus, HIV*) (476). Овај вирус инфицира CD4<sup>+</sup> Т ћелије везивањем за рецептор CD4. Накнадно се инкорпорира у Т ћелије након чега оне продукују протеин HIV Tat који повећава експресију рецептора за Fas и изазива убрзану апоптозу Т ћелија (434).

Алцхајмерова болест је неуродегенеративна болест за коју се сматра да настаје услед мутација које доводе до смањења или одсуства продукције амилоидног прекурсорског протеина (енгл. *Amyloid precursor protein, APP*) и пресенилина (434). Пресенилини обрађују APP до амилоида-β (434). Услед мутација формирају се екстрацелуларни депозити амилоида-β који испољавају неуротоксично дејство (434). Амилоид-β апоптозу изазива оксидативним стресом или повећаним ослобађањем FasL у неуронима и ћелијама глије (434). Активацијом микроглије секретује се TNF-α који последично активира TNFR1 и индукује апоптозу (477).

### 1.3.2. Аутофагија (основне карактеристике, механизми, биолошки значај)

Аутофагија је високо конзервисан процес деградације ћелија у којој су делови цитосола и органеле заплењене аутофагозомом (вакуола са двоструком мембраном) и допремљене до лизозома у којима се обавља разлагање или рециклажа насталих макромолекула (478). Игра важну улогу у ћелијском развоју и диференцијацији, као и супресији тумора (478). Аутофагија обавља различите улоге у урођеној и стеченој имуности попут отпорности на патогене утицаје (478). Последњих година, направљен је значајан напредак у идентификацији гена који су неопходни за овај ћелијски процес, укључујући селективну и неселективну врсту аутофагије (478). Базална аутофагија игра важну улогу у хомеостази и деградирању прекомерних, оштећених и/или старих протеина и органела чиме одржава контролу квалитета неопходних ћелијских компоненти (479,480). Дефектна аутофагија је умешана у патогенезу различитих болести попут миопатије (481), неуродегенеративних болести (482), инфекције микробима (483), инфламацијске болести црева (484,485), старења (486) и карцинома (487). Поред своје базалне функције аутофагија се иницира као одговор на недостатак хранљивих материја (488-491), метаболичког стреса (492-494), зрачења (495) и примене антиканцерских лекова (496-499). Аутофагија може бити и алтернативни извор енергије као и привремени механизам преживљавања у одређеним стањима (500). У ћелијама еукариота постоје три главне врсте аутофагије: макроаутофагија, микроаутофагија и *chaperone-mediated* аутофагија, које се у погледу механизма међусобно разликују (501,502). Макроаутофагија подразумева испоруку цитоплазматског садржаја лизозому посредством аутофагозома, који спајањем са лизозомом формира структуру названу аутолизозом (503). Посредством инвагинација на мембрани, у процесу микроаутофагије лизозом директно преузима компоненте цитосола (503). Приликом оба типа аутофагије лизозоми су у стању да „прогутају“ велике структуре, селективним и неселективним механизмима (503). У *chaperone-mediated* аутофагији, циљни протеини пролазе кроз лизозомалну мембрану у комплексу са *chaperone* протеином, као што је протеин топлотног шока-70 (енгл. *Heat shock 70 kDa protein 8*, Hsc-70), кога препознаје лизозомски мембрански рецептор 2 (енгл. *Lysosome-associated membrane protein 2*, LAMP-2a) (503).

Процес аутофагије је регулисан преко сигналног пута PI3K/AKT/mTOR (478). У одговору на расположивост фактора раста и хранљивих материја, активација сигналног пута PI3K/AKT/mTOR супримира аутофагију и стимулише ћелијску пролиферацију (478). Гладовање ћелија, потискује PI3K, деактивира сигнални пут и истовремено активира катаболичке процесе аутофагије чиме се обавља алтернативни процес за стварање енергије и обезбеђује привремено преживљавање ћелија (478). На крају, аутофагија може да индукује ћелијску смрт прогресивним трошењем ћелијских компоненти што представља програмирану ћелијску смрт тип II (478). Аутофагија може бити покренута и као резултат нагомилавања реактивних облика кисеоника, услед хипоксије и бактеријске инфекције (478). Није увек јасно да ли је аутофагија укључена у иницијацију смрти или представља неуспели случај преживљавања ћелије која је лишена хранљивих састојака (478).

Аутофагија је у туморима регулисана сличним принципима. Комплексност регулације у туморима је условљена честом ирегуларном активацијом PI3K и мноштвом интеракција између сигналног пута PI3K/AKT/mTOR и других сигналних каскада (478). Механизам којим изостанак или непотпуна аутофагија убрзава карциногенезу није очигледан, посебно ако се узме у обзир добро документована функција аутофагије која омогућује опстанак како нормалних тако и туморских ћелија услед метаболичког стреса (500,504). У том случају губитак пута који омогућује преживљавање а промовише туморогенезу представља занимљив парадокс. Скорашње студије су откриле ангажовање ћелија аутономним и зависним механизмима (504), чиме су дале увид у улогу аутофагије у супресији тумора. Функционална аутофагија омогућава преживљавање ћелија, док непотпуна аутофагија у туморским ћелијама резистентним на апоптозу, *in vivo* и *in vitro*, промовише смрт некрозом (492). У том случају, аутофагија нарушава преживљавање туморских ћелија које су изложене дефициту кисеоника и хранљивих материја. Смрт ћелија некрозом, је повезана са накупљањем леукоцита, продукцијом цитокина и последичном активацијом сигналног пута NF- $\kappa$ B, који је повезан са промоцијом туморског раста (505). На тај начин аутофагија може да функционише у супресији тумора спречавањем ћелијске смрти некрозом. Међутим, механизме интеракције између некротичних тумора, микросредине и ћелија имунског система тек треба расветлити.

Алтернативни и вероватно комплементарни механизам којим аутофагија потискује туморогенезу укључује јединствену улогу у очувању ћелијске кондиције и интегритета генома (478). Недостаци аутофагије су повезане са акумулацијом: 1) убиквитин позитивних протеинских агрегата у јетри и неуронима (506), 2) деформисаних и нефункционалних органела попут митохондрија (488) и пероксизома (507) и 3) оштећења DNA у ћелијама тумора са инактивираним контролним тачкама ћелијског циклуса (493) (504). Иако тачан механизам којим аутофагија ограничава оштећења у геному још није утврђен, неколико хипотеза се активно истражују, укључујући одржавање енергетског баланса и/или превенцију оксидативног стреса, потенцијално узроковану дефектним органелама и накупљеним протеинима у ћелијама у којима аутофагија није присутна (478).

И нормалне и туморске ћелије „користе“ аутофагију да преживе метаболички стрес (недостатак хранљивих и градивних састојака). Аутофагија је механизам који штити ћелије од инфекција интраћелијским микроорганизмима (урођена имуност) али и који интензивира преживљавање и пролиферацију Т лимфоцита (стечена имуност). Игра значајну улогу у диференцијацији ћелија. Поред тога, повезана је са неуродегенеративним болестима и инфламацијским болестима црева.

### 1.3.3. Некроза

Пре неколико деценија, откривање нових образаца ћелијске смрти створило је концепт апоптозе (508). Апоптоза је сматрана процесом који је уређен јасним морфолошким и биохемијским догађајима док је некроза посматрана као неуређен (случајан) облик ћелијске смрти (508). Морфолошки, некроза је сасвим другачији процес од апоптозе. За разлику од апоптозе, ћелија прво бубри, плазма мембрана колабира након чега ћелија брзо лизира (508). Биохемијске одлике апоптозе, као што је активација специфичних протеаза (каспазе) и фрагментација DNA најчешће нису присутне у некрози (508). Међутим, побољшањем метода за диференцијацију апоптозе и некрозе показано је да унутар истих ћелија могу бити присутне биохемијске и морфолошке карактеристике оба начина ћелијске смрти (508). Ово указује да у ћелијама постоји читав низ различитих програма самоубилачке смрти, док су некроза и апоптоза крајности тог спектра (509). Из овог

разлога некроза као вид ћелијске смрти привлачи све више пажње и многи истраживачи је уз апоптозу и аутофагију посматрају као један од видова програмиране ћелијске смрти (429,509-511).

Најчешћи тестови за мерење некрозе, *in vitro*, су процена пермеабилности ћелијске плазма мембране бојењењем трипан плавим и пропуштањем цитосолних ензима (лактат дехидрогеназа, креатин киназе) (508). Поред тога, процена је могућа мерењем митохондријалне активности ћелија која није специфична за некрозу и среће се код апоптозе и аутофагије (508).

Важно је поменути да апоптоза и аутофагија у условима *in vitro* условљавају пермеабилizацију плазма мембране („секундарна некроза,“) што није могуће регистровати *in vivo* (508). Разлог је што, током апоптозе, макрофаги и околне ћелије фагоцитишу апоптотичне ћелије пре него што је нарушен интегритет њихове плазма мембране (508). Осим тога, секундарна некроза може да настане услед поремећаја митотске активности, као последица неповратног оштећења DNA (508). Убијање ћелија у екстремним условима попут ниске и високе температуре, као и киселинама, узрокује нерегулисане процесе разарања ћелијских мембрана и цитосола (508). Из тог разлога се претпостављало да је смрт ћелије, која је праћена брзим нарушавањем плазма мембране, структура цитоплазме и једра нужно пасиван и нерегулисан процес (508). Такав став занемарује многе појаве и сазнања у којима је некротична ћелијска смрт регулисан процес, активиран специфичним физиолошким и патолошким стањима (508). Неки стимулуси који активирају некрозу, у зависности од интензитета и врсте ћелија на које делују, могу активирати смрт ћелије апоптозом и аутофагијом (508). Међу најчешћим стањима која активирају некрозу су исхемија и хипоксија (508). Лишавањем кисеоника, глукозе и других хранљивих материја ова стања је могуће успешно симулирати у *in vitro* (508). Другим речима, хипоксија и исхемија настају током раста тумора услед неадекватне васкуларне потпоре. Под овим условима, главни узрок некрозе је недостатак енергије због чега је неопходно да ћелије, како би преживеле, повећају енергију или смање њену потрошњу (508). Како у одсуству кисеоника и хранљивих материја ћелије имају ограничене могућности за повећање АТФ-а, једини начин да избегну некрозу је да смање потрошњу АТФ-а (512). Мутација LKB1 серин-треонин киназе, често присутна у туморима, представља важан фактор за активност

АМР-ом (енгл. *Adenosine monophosphate*) активираних киназа и преживљавање туморских ћелија услед одсуства глукозе (513). *Ginouves* и сарадници (514) су показали да стање акутне хипоксије (1% O<sub>2</sub>) стабилизује апликација фактора индукованих хипоксијом (HIF1 $\alpha$  и HIF2 $\alpha$ ) (енгл. *Hypoxia-inducible factor*). Улога ових фактора је једна од кључних за превенцију некрозе индуковане недостатком кисеоника и њихово присуство је знатно смањено у хроничној хипоксији (која траје више од 3 дана) (514). Поједине компоненте имунског система могу да индукују некрозу активацијом рецептора за TNF, FAS и TRAIL (енгл. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) (508). Активација FasR применом анти-FasL изазива некрозу заједно са апоптозом, док активација CD47 рецептора у лимфоидним ћелијама индукује искључиво некрозу (515). Поједини видови онколошке терапије могу да изазову смрт туморских ћелија некрозом. У ове лекове спадају DNA алкализујући лекови попут MNNG (енгл. *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine*) (516), арсениктриоксида (517), фотодинамске терапије (518) и тамоксифена (519,520). *Resveratrol* као и неке компоненте традиционалне кинеске медицине потенцијално изазивају смрт туморских ћелија некрозом која није негативно регулисана резистенцијом на апоптозу (521-523). Сходно томе, инхибитори каспазе нису спречили некрозу BCR-ABL (енгл. *Breakpoint cluster region-ABL*) позитивних хуманих ћелија леукемије које су третиране инхибитором протеин киназе, иматинибом (*Gleevec*) (508). Занимљиво је да актиномицин D, UV зрачење и цисплатина изазивају апоптозу у младим, док у зрелим хуманим фибробластима изазивају некрозу услед повезаности са мутацијама тумор супресор гена p53 (524). Током иницијације и прогресије карцинома одвија се неколико кључних догађаја при чему сузбијање апоптозе спада међу најважније (525). Многи онкогени могу да активирају програм апоптозе док ћелије карцинома инактивирају туморске супресоре укључене у апоптозу (p53 или BAX протеин) или експримирају протеине који инхибирају овај процес (BCL2 и BCLX протеин) (508). Током раста *in vivo*, туморске ћелије бивају изложене хипоксији и нападнуте цитотоксинима из ћелија имунског система (508). Поред тога што промовише туморогенезу, превенција апоптозе у овим околностима штити туморске ћелије од неповољне средине (508). Налази тих студија имају клинички значај јер су показале да ћелије које су отпорне на апоптозу, могу бити резистентне на терапију лековима који изазивају смрт туморских ћелија некрозом. *Dinnen* и сарадници (526) су показали да p53 C терминални 22-aa пептид везан за 17-aa пептиде из *Drosophila*

*antennapedia-e* може индуковати селективну некрозу у p53 мутираним туморским ћелијама простате. Друге студије су показале да аутофагија има важну улогу у заштити туморских ћелија услед исхемије. Показано је да ћелије отпорне на апоптозу умиру некрозом само ако је онемогућен процес аутофагије (492). Хистолошке анализе су показале да је некроза појава која укључује велику популацију ћелија за разлику од апоптозе којом су захваћене појединачне ћелије (508). Овај тип ћелијске деструкције је условљен комбинацијом различитих стимулуса: токсичношћу фактора које ослобађају некротичне ћелије и који уништавају околне ћелије, супресијом фагоцитозе преко ROS-а (енгл. *Reactive oxygen species*) и слабом мобилизацијом макрофага (508). За разлику од апоптозе у којој садржај ћелија бива изолован пре фагоцитозе, некротичне ћелије ослобађају моћне запаљењске и имунске иницијаторе и стимулаторе (508). На основу опсежних студија, током последње деценије изведени су закључци о повезаности три главна начина ћелијске смрти (508). За неопластичне ћелије хематопоезског порекла, апоптоза је доминантан облик ћелијске смрти како *in vitro*, тако и *in vivo*, што се подудару са апоптотском осетљивошћу одговарајућих нормалних ћелија попут тимоцита, лимфоцити итд (508).

Зрачна и хемиотерапија у клинички релевантним дозама убијају туморске ћелије претежно апоптозом, док се некроза јавља само у случајевима када је апоптоза блокирана инхибиторима каспазе или прекомерном експресијом анти-апоптотских протеина BCL2 фамилије (508). За ову врсту карцинома, инхибитори протеина BCL2 могу бити обећавајући начин за повећање осетљивости и ефикасности терапије (508).

Током развоја тумора или као последица хемиотерапије, апоптоза се *in vivo* ретко среће у карциномима дојке и простате, док *in vitro* може бити изазвана високим дозама (недостижних у клиници) радијације и лекова (508). У складу са тим, већина нормалних неизмењених епителних ћелија су релативно отпорне на апоптозу и код тумора овог порекла не постоји веза између осетљивости на апоптозу и одговора на терапију (508). Пример је висока експресија BCL2 протеина у неким солидним туморима, која парадоксално корелира са бољом прогнозом (527,528). Корелација између осетљивости тумора на терапију и експресије других про- и анти-апоптотичних чланова BH3 (енгл. *BH3 interacting-domain death agonist*) породице није утврђена (508). Присуство некрозе у



солидним туморима је чест налаз током туморског раста и након примене терапије (508). Како конвенционалне дозе лекова и радијације у терапији карцинома не индукују некрозу директно, сматра се да она настаје као последица поремећаја у пролиферативној активности туморских ћелија (смрт ћелија након ћелијске деобе са ирверзибилним оштећењима у DNA) (508). Најчешћи узрок некрозе током развоја тумора је неадекватна снабдевеност кисеоником и хранљивим састојцима (метаболички стрес) (508). Студије су показале повезаност између апоптозе, аутофагије и некрозе током развоја тумора (529,530). Измењене епителне ћелије у којима је супримирана апоптоза, активацијом аутофагије могу да обезбеде есенцијалне хранљиве материје, што је показано *in vitro* и *in vivo*. Уколико је у овим ћелијама поред апоптозе онемогућена и аутофагија, што је често у туморима, ћелије умиру некрозом (492). На основу овога може се рећи да аутофагија има важну улогу у превенцији некрозе током туморског раста. Парадоксално, ћелије карцинома са поремећајем апоптозе су биолошки агресивније и карактерише их бржи раст упркос високом нивоу некрозе (508). Један од разлога је тај што аутофагија ублажава оштећење DNA и геномску нестабилност која настаје током метаболичког стреса (493). Анеуплоидија је карактеристика биолошки агресивних форми карцинома и убрзава прогресију тумора новим мутацијама које промовишу инвазивност и метастазирање (508). Такође, хронично запаљење као последица некрозе је узрок повезаности некрозе и прогресије карцинома (508). Инфламацијске форме карцинома, посебно дојке, представљају најагресивније туморе (508). У покушају да елиминишу туморске ћелије, ћелије имунског система инфилтришу туморско и перитуморско ткиво и ослобађају цитокине који парадоксално потпомажу преживљавање ћелија тумора (531). У складу са овим TNF, IL-6, TGF $\beta$  и неки други цитокини имају промотивну улогу у прогресији тумора (532). Са друге стране, недавне студије јасно показују да исход антитуморске терапије не зависи само од способности ових агенаса да директно убијају ћелије, већ и на њихову способност да стимулишу повољан имунски одговор (533-535).

Регресија тумора након третмана доксорубицином или  $\gamma$ -зрачењем зависи од имунског одговора посредованог Т лимфоцитима што је показано на имунодефицијентним мишевима (508). HMGB1 (енгл. *High mobility group box 1*) је специфичан маркер за некрозу (508). Ослобађање овог протеина и његова интеракција са TLR4 рецептором на

APC супримира анти-туморске Т лимфоците и потенцира значај некрозе у регресији тумора (533-537). Доступни подаци указују да туморска некроза има двоструки значај:

1. након терапије представља добар терапијски одговор директном елиминацијом туморских ћелија и/или активацијом повољног анти-туморског имунског одговора.
2. представља одлику агресивне форме карцинома коју карактерише брз раст услед стимулаторне улоге инфламације и експресије гена повезаних са прогресијом тумора.

#### **1.4. Ангиогенеза**

Ангиогенеза је процес стварања нових крвних судова из постојеће васкулатуре. Састоји се од више координисаних генски програмираних и међусобно условљених корака. Иницијално, ангиогени програм захтева деградацију базалне мембране као и миграцију и пролиферацију ендотелних ћелија уз инвазију екстрацелуларног матрикса, након чега се формирају лумени новонасталих капилара који потом сазревају и постају стабилни. Завршни кораци захтевају инхибицију даље пролиферације ендотелних ћелија, реконституцију базалне мембране, као и спајање и организацију ендотелних ћелија у нове лумене.

Процес ангиогенезе се одвија каскадно и подразумева:

- продукцију фактора ангиогенезе и везивање ових фактора за рецепторе на ендотелним ћелијама
- активацију ендотелних ћелија
- протеолитичку разградњу базалне мембране и ванћелијског матрикса
- пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија
- пупљење и раст ендотелних трака и формирање капиларне петље
- стабилизацију крвног суда.

Значај ангиогенезе се огледа у читавом низу физиолошких и патолошких процеса у организму. Физиолошка ангиогенеза ја саставни део ембрионалног развоја, менструалног циклуса, раста ендометријума као и зарастања рана. У склопу патогенезе многих болести, неконтролисана ангиогенеза се јавља код:

- дијабетичне ретинопатије
- атеросклерозе
- псоријазе
- реуматоидног артритиса
- малигних болести

#### **1.4.1. Биолошки значај и механизми физиолошке ангиогенезе**

Васкуларна мрежа настаје васкулогенезом тј процесом *de novo* формирања крвних судова из прекурсора ендотелних ћелија (диференцијацијом ангиобласта) (538). Током васкулогенезе, ангиобласти пролиферишу и формирају примарни капиларни плексус који је предуслов за наступајућу ангиогенезу (538). Ангиогенеза се одвија ремоделовањем крвних судова примарног капиларног плексуса, гранањем и настајањем изданака нових крвних судова (538). Током ембриогенезе, ангиогенеза започиње формирањем примарног васкуларног стабла што је предуслов за адекватно снабдевање крвљу новонасталих органа и ткива (539). Код одраслих, ангиогенеза настаје током месечног менструалног циклуса као и током зарастања рана (540).

Сазревање и ремоделовање новоформираних микроваскуларних структура се постиже координацијом различитих процеса (541). Како би се формирали изданци нових крвних судова, перицити (муралне ћелије) прво морају бити уклоњени из гранајућих крвних судова (540). Перицити су важне компоненте крвних судова. Модулишу функцију ендотелних ћелија и критичне су за развој зреле васкуларне мреже. Перицити регулишу васкуларну функцију укључујући дијаметар крвног суда и тиме проток крви, као и васкуларну пропустљивост. Ове ћелије такође пружају механичку потпору и стабилност зиду крвног суда и омогућују преживљавање ендотелних ћелија и то директним међућелијским контактом или паракриним дејством. Специфичне протеазе попут матрикс-металопротеиназа трансформишу и разлажу базалну мембрану ендотелних ћелија (542), након чега стромалне ћелије синтетишу нов матрикс. Нов матрикс, заједно са различитим солубилним факторима подстиче миграцију и пролиферацију ендотелних ћелија (542). Након окончања пролиферације, ендотелне ћелије се ређају у један ред и формирају цевасте структуре (543). Перицити постају муралне ћелије (перицити у микроваскуларним структурама а глаткомишићне ћелије у зрелим крвним судовима) и одлазе на спољну

површину ендотела тако да крвни судови њиховим повлачењем остају откривени, након чега се у новоформираним судовима успоставља циркулација (543).

У физиолошким условима ангиогенеза је високо регулисан и уређен процес јер захтева мировање ендотелних ћелија у једном слоју и ширење васкуларне мреже само у оној мери која је неопходна за раст ткива и органа (543). Многи чиниоци позитивно и негативно утичу на ангиогенезу а међу њима су растворљиви полипептиди, међућелијске и интеракције између ћелија и матрикса као и хемодинамски ефекти (543).

Ремоделовање постојећих и раст нових крвних судова су битне компоненте у физиологији ендометријума (543). Након менструалног крварења, најчешће после 5. дана циклуса, настаје брза поправка оштећених крвних судова како би се зауставило крварење. Овај процес се одвија независно од утицаја хормона у јајника (544). Теза је потврђена на основу истраживања спроведених код жена након хируршке оваријектомије код којих крварење престаје упркос недостатку хормона јајника (545). Мишји модел менструалног крварења, показује потпуну поправку ендометријума у одсуству естрадиола (546), сугеришући да се репарација крвних судова у овом моделу одвија независно од естрадиола. Регулација васкуларне репарације у овој фази циклуса још увек није у потпуности разјашњена. VEGF игра кључну улогу у овој врсти ангиогенезе, повећава се током менструације и регулисан је хипоксијом (544,547-549). Током пролиферативне фазе функционални слој ендометријума се умножава што захтева стимулацију ангиогенезе како би се одржала перфузија (550). Иако физиолошки, овај необичан ангиогени одговор може бити добар хумани модел, по свом механизму, сличан ангиогенези која настаје у туморском ткиву. Дефинисање контролних механизма овакве физиолошке ангиогенезе може да отвори врата новим приступима у контроли туморског раста. Упркос значајним структуралним променама ткива ендометријума током циклуса, пролиферација ендотелних ћелија хуманог ендометријума не показује јасан образац (550), што је потврђено анализом узорака ендометријума жена у истој фази менструалног циклуса. Разлог може да представља различити ниво хормона у време узимања узорака или различита места са којих је биопсија узета. Коришћењем Ki-67 или бромодеооксиуридина за идентификацију пролиферишућих ендотелних ћелија у анималном моделу менструалног крварења, утврђено је вишеструко повећање пролиферације током средине пролиферативне фазе

(551). У овом моделу, нису утврђене значајне разлике у другим фазама менструалног циклуса (551). Овај налаз је у складу са испитивањем на хуманим ендотелним ћелијама ендометријума која су показала да је дилатација крвних судова највећа током средине пролиферативне фазе, као и да је издуживање крвних судова главни механизам ангиогенезе у ендометријуму током средине пролиферативне фазе (545).

Током секреторне фазе неопходно је намотавање и сазревање артериола као и раст субепителног капиларног плексуса. НК ћелије утеруса се по свом фенотипу разликују од НК ћелија периферне крви и имају важну улогу у сазревању спиралних артериола (552). Број ових ћелија се током средине лутеалне фазе повећава и тада се налазе у близини ендометријалних жлезда и спиралних артерија (553), чиме утичу на васкуларно ремоделовање. Ранија истраживања у области трудноће подржавају улогу НК ћелија у раним фазама ремоделовања спиралних артерија, чији изостанак доприноси патолошким стањима у трудноћи (554,555). Студије на мишевима дефицитарним за НК ћелије утеруса су подржале ову претпоставку (556,557).

Додатни докази за утицај НК ћелија утеруса на васкулатуру ендометријума дају студије на хуманом ендометријуму у којима су примењивани селективни модулатори рецептора за прогестерон. Код жена код којих су примењивани ови модулатори анализа ендометријума је показала инхибицију секреције IL-15 који регулише функцију НК ћелија (558). Забележено је смањење у броју НК ћелија утеруса, абнормални изглед крвних судова ендометријума уз повећано бојење на  $\alpha$ -SMA (енгл.  *$\alpha$ -smooth muscle actin*) око спиралних артериола (558). Такође, примена модулатора за PR је код жена ублажило менструално крварење повезано са PR, НК ћелијама утеруса, васкуларним структурама и менструалном функцијом (558). Немогућност идентификације PR на НК ћелијама материце (559) указује на индиректни механизам хормонске регулације путем паракриних медијатора (560,561).

У физиолошким условима процес зарастања рана се одвија у четири главне фазе: хемостаза, инфламација, гранулација и ремоделовање. Ангиогенеза има главну улогу у репарацији ткива. Формирање нове васкулатуре је неопходно за уклањање дебрија и допремање кисеоника и хранљивих материја. Фаза хемостазе/коагулације се карактерише активацијом тромбоцита и формирањем фибринског тромба као последица оштећења ендотела. У овој фази активирани тромбоцити ослобађају велики број фактора који

иницирају процес ангиогенезе (562). Ослобађање тромбоцитног фактора 4 (енгл. *Platelet factor 4*, PF4) инхибира ослобађање мноштва фактора раста попут VEGF-а, базног FGF-а (енгл. *Basic fibroblast growth factor*, bFGF), PDGF лимитирајући њихову улогу у промоцији ангиогенезе (562). Међутим, овај фактор промовише ослобађање бројних цитокина попут TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  и IL-8 који активирају запаљењске ћелије и убрзавају настанак фазе инфламације (562). У фази инфламације током зарастања рана, ослобађају се проангиогени молекули (фактори раста и цитокини) које луче макрофаги, епителне ћелије и лимфоцити (563). Под дејством ових протеина одвија се миграција и пролиферација ендотелних ћелија и последична неоваскуларизација (563). Ендотелне прогениторске ћелије (енгл. *Endothelial progenitor cell*, EPC) се регрутују у инфламирано ткиво, диференцирају се и уграђују у новоформиране васкуларне елементе (васкулогенеза) кроз ангажовање и индукцију диференцијације различитим ангиогеним факторима, укључујући SDF-1 (енгл. *Stromal cell-derived factor 1*) и VEGF (563). Када доспеју у озлеђено ткиво, ове ћелије настављају да ослобађају ангиогене факторе и подржавају процес ангиогенезе (563). Четвртог дана започиње фаза гранулације и ангиогенеза је у пуном напредовању. Формирање гранулационог ткива се заснива на васкуларизацији оштећеног ткива. У фази гранулације, постоји око пет пута већи број крвних судова унутар ране како би се задовољиле метаболичке потребе ћелија које обављају репарацију ткива. Многи од ових судова су незрели, пропустљиви и нефункционални. Смањењем метаболичке потребе новог ткива наступа фаза ремоделовања. У овој фази се смањује ослобађање проангиогених молекула а повећава ослобађање ангиостатских молекула што се манифестује регресијом крвних судова (564). Механизам регресије није у потпуности јасан али је регулисан ослобађањем IP-9 и IP-10 (енгл. *Interferon-gamma-inducible protein 9/10*) (565,566). Регресија се завршава када број крвних судова буде на истом нивоу као и пре озледе (567). Смањењем бројних, незрелих и пропустљивих васкуларних елемената ткиво постаје јаче а ожиљак се смањује. Немогућност регресије непотребних и нефункционалних крвних судова резултира појавом дехисценције и улцерација.

### 1.4.2. Ангиогенеза у туморима

Фундаментални значај ангиогенезе у малигним болестима огледа се у расту, прогресији и метастазирању тумора (568). Овај сложени процес укључен је у ремоделовање екстрацелуларног матрикса, као и пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија (569). Комплексна васкуларна мрежа унутар тумора омогућава адекватно снабдевање туморских ћелија хранљивим материјама и кисеоником, као и елиминацију метаболичких продуката. *Algire* и *Chalkley* су 1945. године први закључили да је раст солидних тумора повезан са развојем васкуларне мреже у туморском ткиву (570). *Folkman* и сарадници (571) су претпоставили да смањен или одсутан доток крви у туморско ткиво зауставља његов раст или га чак смањује. Физиолошка основа ове хипотезе се огледа у чињеници да тумори у аваскуларном стању могу да достигну запремину од 1-2 mm<sup>3</sup> али не могу да наставе даљи раст (572). Када допремање крви у туморско ткиво није адекватно, туморске ћелије умиру апоптозом/некрозом (508). Метастатски потенцијал и раст секундарних тумора такође зависи од овог процеса. Након неоваскуларизације, малигне ћелије се одвајају од примарног тумора и продиру у крвне судове (572). По пристизању у удаљене органе, туморске ћелије поново индукују ангиогенезу како би обезбедиле снабдевање потребним материјама (572). Након ових сазнања започела је ера истраживања молекулских механизма ангиогенезе.

Током последњих 30 година откривен је велики број проангиогених и антиангиогених молекула, њихових лиганата и унутарћелијских сигналних путева (572). Уложен је велики напор како би се развила антиангиогена стратегија у лечењу малигних болести. Упркос бројним обећавајућим резултатима у преклиничким моделима, клиничка испитивања нису дала убедљиве доказе за ефикасну, антитуморску, монотерапију применом класичних антиангиогених молекула (572). У комбинацији са хемотерапијом, антиангиогени лекови су се показали као клинички ефикасни у контроли болести код пацијената са узнапредовалим карциномом дебелог црева, продужавајући преживљавање ових пацијената (573). Током 2004. године Управа за храну и лекове (енгл. *The Food and Drug Administration, FDA*) је одобрила антиангиогени лек за примену у првој линији терапије у комбинацији са 5-FU (енгл. *5-Fluorouracil*) за лечење пацијената са узнапредовалим карциномом дебелог црева (572).

### 1.4.3. Механизми ангиогенезе у карциномима

Након мутација и иницијације карциногенезе наступа аваскуларна фаза или стадијум успаваности (*tumour dormancy*) у туморском расту који може перзистирати годинама (574). Туморске ћелије неопходне материје добијају дифузијом све док не достигну запремину од 1 до 2 mm<sup>3</sup>. Данас је прихваћена теорија ангиогеног „свича“ која је заснована на балансу између про- и анти- ангиогених молекула (575). Теорија није заснована на једноставној регулацији ангиогене активности већ подразумева укупан однос између позитивних и негативних регулатора ангиогенезе (575). Када укупни ефекат проангиогених, надјача ангиостатске молекуле тумор стиче проангиогени фенотип и наступа последична неоваскуларизација туморског ткива. Прекурсори ендотелних ћелија, интеракције између ангиогених фактора и њихових рецептора као и интеракција између васкулогенезе и лимфангиогенезе су значајни фактори који доприносе активацији „свича“ (576). Достицање ангиогеног фенотипа заправо представља кључни корак у раној прогресији тумора којом је омогућена трансформација микроскопских лезија до брзорастућих великих тумора са јаким метастатским потенцијалом(572). Експресија онкогених протеина као и бројни фактори ћелијског стреса попут хипоксије, ниске рН вредности, лишавање хранљивим материјама и реактивни облици кисеоника су битни стимулуси у ангиогеној сигнализацији (575). Важно је напоменути да ангиогени „свич“ у примарном тумору може бити усмерен у ангиостатском правцу док истовремено у метастатском тумору његова поларизација може бити окренута у проангиогеном правцу. Хипотеза је потврђена испитивањем ангиогеног фенотипа примарних тумора након хируршког уклањања уз накнадни раст метастатских тумора (577).

Као и код физиолошке, неколико узастопних корака се одвија током туморске ангиогенезе. У зрелим капиларима зид крвних судова је саграђен од ендотелних ћелија, базалне мембране и перицита (572). Ангиогени фактори које продукују ћелије тумора везују се за своје рецепторе на ендотелним ћелијама и иницирају ангиогенезу (572). Ангиогенеза је резултат серије усклађених молекулских и ћелијских догађаја који резултирају миграцијом, пролиферацијом и диференцијацијом ендотелних ћелија у новоформиране капиларе који накнадно постају зрели крвни судови (572). Ангиогена каскада обухвата активациону и фазу резолуције (572). Када су стимулисане да расту



ендотелне ћелије секретују протеазе, хепарине и друге ензиме који разграђују базалну мембрану околних крвних судова (572). Разградњом ванћелијског матрикса ослобађају се проангиогени фактори (572). Везе између ендотелних ћелија постају слабе а као одговор на стимулусе настају изданци новоформираних судова (572). Поред пролиферације и миграције ендотелних ћелија, сматра се да хематопоеетске прогениторске ендотелне ћелије доприносе формирању лумена капилара (572). Фаза резолуције се огледа у сазревању и стабилизацији новоформиране микроваскулатуре уметањем перицита, реконструкцијом базалне мембране и стварањем комплексних међућелијских веза (572). Унутар туморског ткива, фаза резолуције је некомплетна што се манифестује ирегуларном микроваскулатуром са парцијалним облагањем ендотела перицитима, деловима базалне мембране и повећаном микроваскуларном пропустљивошћу (572). Крвни судови тумора показују велике варијације у погледу дијаметра и немају могућност диференцијације у артериоле, капиларе и венуле (572).

#### 1.4.4. Улога хипоксије у ангиогенези тумора

**Хипоксија** је патофизиолошка последица структурно и функционално поремећене микроциркулације (578) и представља једну од особина солидних тумора. Као одговор на хипоксију, тумори одговарају продукцијом и ослобађањем фактора индукованих хипоксијом (енгл. *Hypoxia-inducible factor*, HIF) (579). HIF одговор је посредован транскрипционим фактором HIF-1 $\alpha$  и конститутивно експресијом HIF-1 $\beta$ . Оверекспресија HIF-1 $\alpha$  је присутна у многим карциномима са улогом у промоцији брзине туморског раста и метастаског потенцијала. У карциномима дојке, заступљеност HIF-1 $\alpha$  позитивних ћелија расте са клиничким стадијумом и повезана је са лошом прогнозом (580-583). Поред HIF-1 $\alpha$ , идентификоване су и друге изоформе овог протеина попут HIF-2 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  (584,585). Улога ових изоформи је сложена и неке студије указују да оне у каснијим фазама неоваскуларизације антагонизују експресију гена индукованих хипоксијом. HIF-1 $\alpha$  и HIF-2 $\alpha$  активирају сетове гена индуковане хипоксијом (586), укључујући оне са улогом у гликолизи, преживљавању и пролиферацији ћелија (587). Клиничка релевантност за карцином дојке није позната, јер постоје само ограничени подаци о улози HIF изоформи. Познато је да се HIF-2 $\alpha$  експримира у туморским ћелијама и тумор асоцираним макрофагима (енгл. *Tumor-associated macrophages*, TAM) карцинома дојке (588,589). HIF-

2 $\alpha$  позитивни TAM су повезани са туморском васкуларизацијом сугеришући HIF-2 $\alpha$  позитивни TAM индуковани хипоксијом промовишу настанак проангиогеног туморског фенотипа (589). У складу са овим, одговор на хипоксију путем HIF протеина представља важан механизам којим настаје васкуларно ремоделовање у ткиву карцинома.

#### 1.4.5. Медијатори ангиогенезе у туморима

Којим год механизмом тумори обезбеђују васкуларну подршку увек су ангажовани слични регулаторни фактори са различитим уделом у појединим процесима. Присуство хуморалног медијатора туморске ангиогенезе је предложен много раније али је тек 1968. године показано да фактор којег индукује тумор може да изазове раст капилара (590,591). *Folkman* и сарадници (571) су описали први фактор неоангиогенезе, назван неоангиогени фактор тумора, након чега је откривен велики број других ангиогених промотера и инхибитора (592,593). Многи показују плејотропно дејство и њихова улога у различитим хуманим карциномима до данас није сасвим разјашњена. Промотери и инхибитори ангиогенезе који леже у основи успостављања снабдевања тумора крвљу потичу из туморских ћелија и/или других елемената тумора. Туморске ћелије стимулишу ангиогенезу продукцијом и секрецијом бројних ангиогених фактора од којих су најважнији VEGF, ангиопетини, bFGF и TGF- $\beta$ . Инвазивни и карциноми дојке *in situ* експримирају многе проангиогене факторе укључујући VEGF, aFGF (енгл. *Acidic fibroblast growth factor*), bFGF, PDGF, TGF  $\beta$ 1, тимидин фосфорилазу, пјејотропин и адреномедулин (594-596). Међутим, сваки од ових фактора се експримира у различитим фазама туморског раста и прогресије. Тимидин фосфорилаза се експримира у *in situ* (597) и T1 карциномима дојке (598), док се VEGF експримира у свим туморским стадијумима. Ово указује да карциноми дојке показују различите проангиогене профиле што изискује коришћење другачијег спектра антиангиогених лекова.

Поред малигних, ендотелне ћелије тумора, строме као и циркулишуће ћелије (прогениторске ендотелне ћелије, тромбоцити и макрофаги) секрецијом других протеина имају способност модулације ангиогенезе (576). Туморске ћелије могу регрутовати инфламацијске ћелије као што су макрофаги и мастоцити, који су богати извори проангиогених фактора и цитокина или могу изазвати ослобађање фактора раста и

њихових рецептора из екстрацелуларног матрикса након деградације протеазама (572). Епителне и ендотелне ћелије тумора могу да активирају тромбоците, који су богат извор ангиогених фактора и често су повишени код малигнух болести (599,600). Тромбоцити доприносе ангиогенези ослобађањем проангиогених медијатора из њихових  $\alpha$  гранула попут VEGF, PDGF-а и bFGF (599,600). Поред тога HGF (енгл. *Hepatocyte growth factor*), EGF (енгл. *Epidermal growth factor*), ангиопоетин-1, фибронектион и хепараназа ослобођене након активације тромбоцита такође стимулишу процес ангиогенезе (572).

Студије су показале да VEGF игра главну улогу у ангиогенези, у већини хуманих карцинома (593). Откривен је и описан 1989. године као фактор васкуларне пропустљивости јер повећава микроваскуларну пермеабилност и фенестрацију ендотела (601). Ефекат VEGF у васкуларној пропустљивости је изузетно снажан (50000 пута јачи од хистамина) што сугерише да овај фактор игра значајну улогу у пропустљивости крвних судова тумора. VEGF је високо специфичан и представља снажан митоген за ендотелне ћелије. Претпоставља се да је повећана пропустљивост крвних судова последица присуства интраћелијских фенестри, смањене потпоре перицита и/или присуства специјализованих ендотелних органела које се зову везикуловакуоларне органеле. Ове трансмембранске вакуоле формирају канале који омогућују екстравазацију течности и протеина из крвних судова.

VEGF (зове се још и VEGF-A) је члан VEGF фамилије, са приближно 40-80% хомологије. Данас је познато шест чланова породице VEGF-а: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и PDGF и представљају полипептиде који се јављају у више изоформи и формирају хомодимере и хетеродимере (602). Везују се високим афинитетом за тирозинкиназне рецепторе на ендотелним ћелијама и то Flt-1 [VEGF *receptor* (VEGFR)1], KDR (VEGFR2) и Flt-4 (VEGFR3), који су одговорни за иницирање унутарћелијске сигнализације (602). Активација рецептора резултира различитим ефектима тако да активација: VEGFR1 промовише диференцијацију и васкуларно одржавање, VEGFR2 индукује пролиферацију ендотелних ћелија и васкуларну пропустљивост док активација VEGFR3 стимулише лимфангиогенезу (572). Ангиогени ефекат се примарно постиже везивањем VEGF-A за VEGFR2 (572). Овај рецептор подлеже димеризацији и фосфорилацији у интактним ендотелним ћелијама што резултује митогеним,

хемотактичким и антиапоптоличким сигнаlima у ендотелним ћелијама (572). VEGF-C преко VEGFR-3 испољава митогено дејство на ендотелне ћелије лимфних судова (572). Продукција VEGF-a је позитивно регулисана факторима раста које ослобађају туморске ћелије укључујући EGF, TGF- $\alpha$  и - $\beta$ , FGF и PDGF (572). Хормони попут естрогена и TSH (енгл. *Thyroid-Stimulating Hormone*) као и проинфламацијски цитокини укључујући IL-1 и IL-6 такође индукују експресију VEGF-a у многим туморским ћелијама (572).

Додатна регулација се обавља кроз изоформе специфичних рецептора неуропилина 1 и неуропилина 2. Неуропилини не везују само три класе које су укључене у раст аксона већ и неке изоформе VEGF-a функционишући као корецептори и промовишући везивање VEGF-a за VEGFR2 (603). Даља модулација се обавља протеолитичким процесирањем и/или хепарином који није само неопходан за везивање VEGF-a и FGF-a (603). Овај комплексни сигнални пут омогућава VEGF-у да испољи велики број ефеката укључујући повећање васкуларне пропустљивости, пролиферације и преживљавање ендотелних ћелија као и формирање лумена новонасталих крвних судова (603). Иако је експресија VEGF-a карактеристична углавном за ендотелне ћелије, овај фактор експримирају и неке запаљењске ћелије попут макрофага као и самих ћелија тумора (572,603). VEGF-A се експримира у ћелијама тумора плућа, мозга, гастроинтестиналног и урогениталног тракта као и у *in situ* и инвазивном карциному дојке (593). У неким студијама експресија VEGF-a корелира са MVD (енгл. *Microvessel density*) и прогнозом, потенцирајући значај VEGF-a у хуманим малигним болестима. VEGF се ослобађа као одговор на хипоксију и његов промотер је један од гена који се активира као одговор на ниску концентрацију кисеоника и изазива трансформацију која је неопходна за даљу ангиогенезу (проангиогени фенотип). Са друге стране, улога других чланова породице у хуманим болестима није још увек сасвим јасна јер тумори који нису у стању да експримирају VEGF-A могу другим члановима ове породице да индукују повећање васкуларизације у ткиву.

Експресија VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D у карциному дојке корелира са статусом метастатски измењених лимфних чворова, прогнозом и лимфатичном густином у туморском ткиву (604-611). Сваки од ових фактора може помоћи тумору у снабдевању крвљу и омогућити трансформацију у проангиогени фенотип. Из тог разлога, ангиогена терапија мора бити усмерена на већи број мета из породице VEGF-a. Поред тога, многи од

ових проангиогених молекула имају синергистичко дејство са другим факторима (нпр, VEGF и bFGF), што је показано *in vitro*.

Због круцијалне улоге у патолошкој ангиогенези и утицаја на ендотелне ћелије, поред потенцијално великог броја антиангиогених мета, већина лекова је усмерена на блокаду сигналног пута који активира VEGF. Терапијом могу бити „гађани“ лиганди и рецептори (екстрацелуларни и тирозин-киназни интрацелуларни крајеви) чиме се инхибирају фактори који последично промовишу синтезу и ослобађање VEGF-а.

**Ангиопоетини (Ang-1-Ang-4).** **Ангиопоетини** (енгл. *Angiopoetin*) су цитокини укључени у настанак васкулатуре великог броја тумора (612). До сада су најбоље проучени и описани Ang-1 и 2 који своју биолошку функцију остварују везивањем за рецептор tie-2 (613). Ang-1 промовише преживљавање ендотелних ћелија, формирање изданака и стабилизацију васкуларне мреже регрутовањем перицита у делове незрелих крвних судова (572). Супротно, Ang-2 има улогу у васкуларном ремоделовању, проузрокујући губитак перицита и излагање ендотелних ћелија проангиогеним факторима (572). У присуству VEGF-а ова дестабилизација индукује ангиогени одговор (572). Експресија Ang-1 је ограничена на туморске ћелије, док се Ang-2 поред њих експримира и у микроваскуларним елементима (572). Код значајног броја тумора експресија Ang-1 остаје непромењена током карциногенезе и ангиогенезе, док је експресија Ang-2 посебно повећана у добро васкуларизованим туморима (572).

**Фактор раста фибробласта.** Породица FGF (енгл. *Fibroblast growth factors*) припада групи протеина који везују хепарин. aFGF (кисели) и bFGF (базни) су описани као индуктори ангиогенезе (614). Везују за хепаринсулфат, протеогликане ванћелијског матрикса као и за четири типа тирозин-киназних рецептора индукујући њихову активацију и димеризацију. aFGF и bFGF индукују пролиферацију ендотелних ћелија и диференцијацију епибласта у ендотелне ћелије (572). Поред тога, bFGF стимулише ослобађање урокиназног активатора плазминогена и колагеназа из ендотелних ћелија обављајући улогу хемоатрактанта (572).

#### 1.4.6. Ендогени инхибитори ангиогенезе тумора

Присуство проангиогених фактора није довољно да покрене раст нових крвних судова. Поштујући принципе ангиогеног „свича“, ефекат проангиогених фактора поништава дејство антиангиогених молекула. Најбоље проучени и описани су тромбоспондин-1 (енгл. *Thrombospondin-1*, *TSP-1*), ангиостатин и ендостатин.

**Тромбоспондин-1.** Тромбоспондини припадају породици протеина ванћелијског матрикса. *CD36* (познат још као GP88, GP IV, GP IIIb) је важан ћелијски рецептор за TSP-1 на ендотелу микроваскуларних структура и неопходан је за испољавање ангиостатског ефекта овог молекула (615). Везивањем TSP-1 за његов рецептор дешава се читав низ догађаја који се завршавају апоптозом ендотелних ћелија (616). Поред антиангиогеног ефекта који остварује везивањем за CD36, TSP-1 потенцијално инхибира ангиогенезу интеракцијом са MMP-2/9 и њиховим прекурсорима или заустављањем ћелијског циклуса (572). Међутим, различите студије су показале да TSP-1 може имати двоструку улогу у ангиогенези у зависности од функционалног стања домена којим се везује за рецептор (572). Различити протеолитички ензими укључујући тромбин, плазмин и трипсин генеришу две форме овог домена: први, тежак 25 kDa и други тежине 140 kDa (572). Антиангиогени ефекат путем CD36 рецептора остварује се преко 140 kDa тешког домена док је за позитиван ефекат на ангиогенезу задужен 25 kDa хепаринвезујући фрагмент TSP-1 (572).

**Ангиостатин.** Ангиостатин је фрагмент плазминогена који инхибира пролиферацију и индукује апоптозу ендотелних ћелија. Системска апликација ангиостатина инхибира неоваскуларизацију тумора и раст метастатских депозита. Функционише као инхибитор активације плазминогена што се испољава редукцијом миграције и инвазије ендотелних ћелија што је иницијални корак у формирању изданака нових крвних судова.

**Ендостатин.** **Ендостатин** настаје цепањем фрагмента колагена XVIII тешког 20 kDa, протеогликана који се налази у зидовима крвних судова и базалној мембрани (572). Ендостатин је моћан цитокин који инхибира миграцију и изазива апоптозу ендотелних ћелија као и заустављање ћелијског циклуса (572). Рекомбинантни ендостатин има бројне антиангиогене функције, као што су способност да интерферира VEGF и bFGF сигнални

пут, инхибира покретљивост ендотелних ћелија, зауставља ћелијски циклус у ендотелним ћелијама и изазива њихову апоптозу (572). Све наведене ефекте остварује тако што се везује за интегрине, укључујући  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$  и  $\alpha V\beta 1$  (572).

Претпоставља се да ангиогенеза тумора истовремено захтева два главна догађаја: с једне стране индукцију и појачану експресију једног или више проангиогених фактора као што је VEGF и са друге стране смањену експресију једног или више ендогених инхибитора као што је TSP-1.

#### 1.4.7. Детекција и квантификација ангиогенезе (најчешћи маркери у пракси)

Ендоглин је помоћни корцептор за TGF- $\beta$  и плејотропни цитокин који регулише ћелијску пролиферацију, диференцијацију, миграцију и адхезивност (617-620). Из тог разлога, ендоглин представља адекватан маркер за проучавање туморске ангиогенезе и неоваскуларизације. Улога ендоглина као потенцијалног дијагностичког, прогностичког и терапијског маркера је проучавана у великом броју студија (621). TGF- $\beta$  сигнализација се обавља преко хетеродимерског, серин/тирозин рецепторског комплекса TGF- $\beta$  рецептор тип 1 (TGF- $\beta$ R1) и TGF- $\beta$ R2. TGF- $\beta$ 1 функционише као туморски супресор и индуктор инфламације и као такав промовише ослобађање ангиогених фактора из запаљењских ћелија *in vivo* (622). Ендоглин се везује за TGF- $\beta$ 1 и  $\beta$ 3 који су структурно повезани са активним TGF- $\beta$ R2 (623,624). На овај начин се активирају цитоплазматске киназе TGF- $\beta$ R, фосфорилацију TGF- $\beta$ R1 и последично смањење SMAD (енгл. *Mothers against decapentaplegic homolog 2*) сигналних протеина (625). С обзиром на дистрибуцију у ткиву и познату функционалну повезаност са TGF- $\beta$ , ендоглин обавља значајну улогу у процесу ангиогенезе. Описане су две изоформе ендоглина L и S, које се међусобно разликују у дужини унутарћелијског домена, дистрибуцији у ткиву и степену фосфорилације. L-ендоглин се састоји од 47 аминокиселина, показује висок степен фосфорилације и претежно је експримиран у ендотелним ћелијама, док се S-ендоглин састоји од само 14 аминокиселина (623,626). Обе форме су фосфорилване јер су саставни део активног TGF- $\beta$ R2 (627,628). Солубилна форма ендоглина је такође идентификована у серуму пацијената са карциномом као и код здравих испитаника (629). Повећан ниво је пронађен код пацијената са метастатским меланомом као и код пацијената са карциномом дојке код којих постоји повећан ризик за настанак удаљених метастаза (630,631). Студије на *knock-*

*out* мишевима су показале да недостатак гена за ендоглин узрокује смрт мишева услед васкуларних дефеката (632). Утврђена је и повезаност између нивоа експресије ендоглина и маркера ћелијске пролиферације попут циклина-А и Ki-67 (633). Са друге стране, *in vitro* инхибиција ендоглина у HUVEC (енгл. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) смањује ангиогенезу (634). У складу са чињеницом да хипоксија индукује ангиогенезу (635), потврђено је да активност промотера за ендоглин, mRNA као и ниво самог протеина расте услед присуства HIF-1 (636). *In vivo* и *in vitro* студије су потврдиле да поред активности ендоглина, хипоксија појачава активност сигналног пута ALK-1 (енгл. *Activin receptor-like kinase*) (637). Имунохистохемијско бојење применом ендоглина (CD105) (енгл. *Endoglin*) антитела је изразитије у ендотелним ћелијама новонасталих крвних судова тумора у поређењу са васкуларним елементима у тумором неизмењеном ткиву (629,633,638). За разлику од ендоглина, CD31 (PECAM-1) (енгл. *Platelet endothelial cell adhesion molecule*) показује имунореактивност истог степена у ендотелним ћелијама неизмењеног као и карциномом захваћеног ткива дебелог црева (639). На анималном моделу карцинома плућа индукованом туморском линијом LLC1 показано је да мишеви дефицијентни за ендоглин показују спорији туморски раст и мањи степен ангиогенезе у односу на контролну групу мишева (621). Овај налаз је изазвао интересовање за студије које истражују улогу ендоглина у дијагностици, прогнози и терапији тумора. Интратуморска микроваскуларна густина (енгл. *Microvessel density*, MVD), квантификована имунохистохемијском методом, има прогностички значај и корелира са краћим укупним преживљавањем (640-643). Иако већина студија потврђује овај став, постоје студије које нису у складу са овом тврдњом (644). Разлике највероватније настају као последица различитих метода бојења, као и примене различитих панендотелних ћелијских маркера. Примена адекватних ћелијских маркера уз стандардизован начин бојења и квантификације би у значајној мери хомогенизовали резултате сличних студија (645). Akagi и сарадници (646) су у својој студији показали постепено увећање MVD, мерену применом анти-ендоглина, од колоректалних дисплазија ниског до високог градуса као и од дисплазије високог градуса до карцинома дебелог црева. За разлику од CD31, MVD квантификована анти-ендоглином је показала негативну корелацију са прогнозом болести код пацијената са астроцитомом и глиобластомом (647,648). Слично овоме код пацијената са неситноћелијским карциномом плућа, хепатоцелуларним и карциномом дојке постоји



обрнута повезаност између MVD мерене ендоглином и укупног преживљавања, док примена CD34 (енгл. *Hematopoietic progenitor cell antigen*) антитета није показала значајну разлику у преживљавању (649-652). Поред тога, MVD одређена анти-ендоглином показује већу повезаност са VEGF-ом за разлику од MVD одређиване са анти-CD34 и анти-CD31 (648,651). Код пацијената са карциномом простате експресија CD105 позитивно корелира са *Gleason* скором док код сквамоцелуларног карцинома усне дупље постоји значајна позитивна корелација са стадијумом тумора (653,654). Имунохистохемијско бојење ендоглином се показало као сензитивније у обележавању капилара у карциномима грлића материце и као значајнији маркер у предикцији метастатски измењених лимфних чворова у односу на фактор VIII (655). Експресија ендоглина поред наведеног значајно корелира и са експресијом Ki-67 у глиобластомима (647) али не и код аденома хипофизе (656). Изузетно је важно напоменути да нису све студије потврдиле прогностички значај MVD одређиване применом анти-ендоглина. (657). Узимајући у обзир све досадашње студије на туморима различитих локализација, може се рећи да је ендоглин значајно супериорни маркер за прогнозу малигних болести у односу на традиционалне маркере ендотелних ћелија као што су CD31, CD34 и фактор VIII. Посебно су интересантни резултати студија које су показала да пацијенти са метастатским карциномом дојке и дебелог црева показују значајно већу концентрацију серумског ендоглина (634,658,659). Поред тога, примена хемиотерапије редукује серумске вредности овог маркера (658). Узевши све заједно, може се закључити да серумска концентрација ендоглина може играти значајну улогу у дискриминацији пацијената са узрапредовалим малигним болестима као и пацијената са повећаним ризиком за развој удаљених метастаза. Поред тога, може бити примењен у склопу редовног праћења пацијената након хемиотерапије (660).

## 1.5. Други механизми васкуларизације тумора

Иако је ангиогенеза важна у неоваскуларизацији идентификовани су и описани други механизми помоћу којих тумори успостављају снабдевање крвљу, укључујући: васкуларно ремоделовање, васкулогенезу, васкуларну мимикрију и гломерулоидну ангиогенезу. Сваки од ових механизма има доминантан значај у зависности од врсте или фазе развоја тумора али је релативни значај сваког у хуманим туморима још увек непознат. Ангиогенеза и васкуларно ремоделовање представљају главне механизме у васкуларизацији карцинома дојке, са доказима да васкуларна мимикрија има додатну улогу у инфламацијском карциному дојке. Биолошка сазнања у овој области доприносе напредку индивидуализованог начина лечења. Поред MVD која се користи за процену ангиогенезе, истражени су многи други параметри неоваскуларизације тумора укључујући факторе ангиогене експресије, сазревања и пролиферације ендотелних ћелија као и адхезионе молекуле (661). Сва ова мерења, укључујући и процену MVD, су повезана са бројним проблемима (662) и не дају адекватне информације о протоку крви унутар тумора, који је променљив услед шантовања, стазе и обрнутог протока унутар туморске васкулатуре (663).

Пролиферација ендотелних ћелија у хуманим туморима је релативно ретка док се ендотелне ћелије у крвним судовима тумора индукованих у животиња, независно од врсте и брзине раста, деле 30 до 40 пута брже у поређењу са нормалним ткивом. Из тог разлога **васкуларно ремоделовање** представља доминантан механизам у успостављању неоваскуларизације у карциному дојке (664-666). Одвија се кроз различите процесе, укључујући коптирање којим тумори преузимају постојећу васкулатуру. Овакав механизам је присутан у раној фази развоја тумора мозга и настаје активацијом сигналних путева преко TIE2-ангиопоетина и VEGF-a (667,668).

У неким случајевима иако немају довољно развијену фиброваскуларну строму, тумори перзистирају као „паразити“ обављајући све неопходне метаболичке процесе. Уметање туморских ћелија карцинома дебелог црева је још један од механизма којим тумори могу да обезбеде васкуларну подршку. Процес је брз и зависи од уметања туморских ћелија у постојеће крвне судове делећи их у два или више лумена (669,670). Овај механизам

представља један од видова ремоделовања и могући начин којим тумори обезбеђују подршку.

**Васкулогенеза** представља *de novo* генерацију крвних судова насталу из прогенитора ендотелних ћелија, као код ембриона. У животињским моделима је показано да се циркулишући прекурсори ендотелних ћелија унутар тумора диференцирају у ендотелне ћелије и побољшавају неоваскуларизацију тумора кроз комбинацију васкулогенезе и конвенционалне ангиогенезе (671-674). У зависности од врсте тумора и модела постоји разлика у заступљености васкулогенезе као кључног механизма неоваскуларизације. У ортотопским моделима чини <5%, док су испитивања у хуманим туморима показала да је њен удео у просеку 4,9% (у распону од 1-12%) (675,676). Нека истраживања указују да је овај процес васкуларизације чешћи и значајнији у почетном развоју тумора, услед инхибиције матичних ћелија или мобилизације ендотелних прекурсора (677).

Још увек се разматра могућа улога паракриног дејства ендотелних ћелија које настају из костне сржи обезбеђујући подршку туморској васкулогенези (678). Опречни резултати ових студија, вероватно настају као последица лоше идентификације и замене прогенитора који потичу из костне сржи са ендотелним ћелијама тумора (679). Сам процес је регулисан VEGF-ом који мобилише прекурсорске ћелије из костне сржи. Неки подаци указују да задржавање матичних ћелија унутар туморског ткива захтева присуство стромалног изведеног фактора 1 (енгл. *Stromal cell-derived factor 1*, SDF-1) (680) који се ослобађа услед хипоксије преко HIF протеина (681). Анализа ткива карцинома дојке је показала да је механизам васкулогенезе нешто чешћи у инфламацијском карциному дојке (682).

**Гломерулоидна тела**, чије је присуство карактеристично за глиобластом уочена су у ткиву инвазивног карцинома дојке (683). Представљају сложене васкуларне агрегате, налик гломерулима бубрега и састоје се од мреже различито постављених крвних судова. Њихово присуство је повезано са значајно краћим преживљавањем пацијената са карциномом дојке (684). Индукција и одржавање гломерулоидних тела су повезани са VEGF-ом (685), што је примећено и у анималном моделу тумора дојке након трансфекције са VEGF-ом (686). По својим особинама, овај тип неоваскуларизације је знатно ближи механизму васкуларног ремоделисања него класичне ангиогенезе (687).

**Васкуларна мимикрија** је у великој мери заступљена у меланому ока и тумору јајника (688), али је описана и у карциному дојке (682). Феномен делимичног облагања капиларне површине туморским ћелијама је одавно познат (689), а недавно је доказан у животињском моделу (690). За разлику од овог феномена, васкуларна мимикрија је дефинисана као настанак комплетне капиларне мреже сачињене од туморских ћелија (691,692). Препознавање васкуларне мимикрије има терапијски значај, јер тумори у којима представља доминантан механизам не дају позитиван одговор на конвенционалне антиангиогене лекове.

## 1.6. Мишји модел тумора дојке

Туморску линију 4Т1 су изоловали *Miller* и сарадници из спонтано насталог тумора дојке у BALB/с мишу (693,694). Представља анимални модел који због брзине метастазирања одговара IV стадијуму хуманог карцинома дојке. Инокулација туморских ћелија је могућа директним убризгавањем (инјекцијом); у масно јастуче млечне жлезде, у репну вену интравенски, артеријски катетеризацијом десне каротиде или у леву преткомору срца. Убризгавањем у ткиво дојке туморске ћелије расту брзо, формирајући примарни тумор који се карактерише способношћу брзог метастатског ширења. Секундарни депозити у удаљеним органима настају у периоду од 3 до 6 недеља и то првенствено у плућима, јетри, костима и мозгу (695-698). Овако индуковани тумори првенствено али не и искључиво, метастазирају хематогеним путем. Студије у којима су туморске ћелије детектоване у удаљеним као и у лимфним чворовима у близини примарног тумора су потврдиле да 4Т1 линија метастазира и лимфогеним путем (696,699). Експериментални подаци прикупљени проучавањем 4Т1 индукованих карцинома дојке показали су да се туморске ћелије знатно чешће налазе у крви (38/58 мишева) експерименталних животиња него у дренирајућим лимфним чворовима (12/58) (696).

Анализом животиња и органа у различитим временским интервалима утврђено је да ћелије ове туморске линије прво метастазирају у плућа (од 7 до 14 дана након инокулације, зависно од броја инокулисаних ћелија) док се у јетри секундарни депозити појављују касније (од 21. до 28. дана након инокулације).

Метастатски тумори у мозгу се детектују након 35. дана од инокулације (700). Пут метастатског ширења започиње од примарног тумора, а након тога највероватније преко плућа и дренирајућих лимфних чворова до јетре и мозга (696,700).

Овако настале метастазе показују дистрибуцију сличну хуманом карциному дојке. Поред тога, употреба ове ћелијске линије је последњих година посебно добила на значају јер је једна од ретких коју карактерише способност спонтаног метастазирања у кости (695) (701). Интравенска апликација туморске линије 4Т1 показује исту дистрибуцију метастаских промена уз значајно краће време за њихову детекцију. Метастатски потенцијал као и брз раст примарног тумора чине овај тумор одличним моделом за

проучавање раста и метастазирање. Са друге стране, обзиром да је линија 4T1 синген са BALB/с мишевима овај модел се користи и за испитивање улоге имунског система у расту и метастазирању тумора (700).

Значајан број гена има улогу у ћелијској адхезивности, миграцији, ангиогенези, модификацији екстрацелуларног матрикса, функцији цитоскелета, пролиферацији ћелија, апоптози и преживљавању, ћелијском метаболизму, запаљењу и имунском одговору (700). Забележена је и експресија неких транскрипционих фактора и гена који учествују у модификацији хроматина. Појачана је експресија гена који кодирају међућелијске спојеве/везе (*Cldn3*, *Cldn4*, *Cldn7* и *Tjp2*), адхерине (*Cdh1* и *Vil1*), фокалне адхезије (*Itga3*, *Itgab* и *Lama5*) и спојне филаменте (*Krt1-18* и *Krt2-7*) што указује да линија 4T1 има више епителних карактеристика него не-метастатске линије тумора дојке. Повећана експресија матрикс-протеиназа (Mmp-3, Mmp-9 и Mmp-13), u-Па и секретованих инхибитора протеаза (Serpin3g, Serpin2 и Lcn2) указује на појачану способност ремоделовања ECM. Од сигналних путева који су активирани у овој ћелијској линији најизраженији је Jak/Stat сигнални пут на шта указује појачана експресија Jak и Stat молекула и смањена експресија Socs1 (инхибитора Jak/Stat сигналног пута). Ћелијска линија 4T1 показује значајно смањење нивоа Cdk2-асоцираног протеина 1, p53, инхибитора циклин зависне киназе p21 (Cdkn1a) и циклина G (Ccng1). Ове промене убрзавају почетну фазу ћелијског циклуса (G1 → S) и инхибирају одговор ћелије на оштећење DNA. Супротно овоме, експресија Gadd45 (енгл. *The Growth Arrest and DNA Damage*) је повећана. Gadd45 је регулисан хипоксијом и смањењем глукозе као и p53. Повећана експресија појединих гена је осетљива на хипоксију и/или смањење глукозе (*Pfkfb3*, *Vegf-c*, *Flt1* и *Trib3*), што указује да повећана експресија Gadd45 настаје услед ових фактора и да 4T1 ћелијска линија чак и под оптималним условима егзистира у стању стреса или псеудо-стреса (700).

## ЦИЉ СТУДИЈЕ

Основни циљ истраживања је да се испита улога осовине IL-33/IL-33R у некрози и неоангиогенези карцинома дојке.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

- У мишјем моделу карцинома дојке, испитати ефекат делеције гена за IL-33R на:
  1. Величину поља некрозе.
  2. Експресију IL33 и VEGF-а током раста тумора.
- У хуманим туморима дојке, испитати:
  1. Експресију IL33, IL-33R и VEGF-а као и микроваскуларну густину и њихову међусобну повезаност.
  2. Експресију IL33, IL-33R и VEGF-а у односу на присуство некрозе у тумору.
  3. Повезаност експресије IL33 и IL-33R у туморским и стромалним ћелијама.
  4. Повезаност некрозе и експресије IL-33 и IL-33R са хистопатолошким параметрима.

## ОСНОВНЕ ХИПОТЕЗЕ

1. IL-33/IL-33R осовина стимулише ангиогенезу и смањује некрозу тумора.
2. Делеција гена за IL-33R смањује експресију IL-33 у туморским ћелијама.
3. Експресија IL-33 и IL-33R стимулише експресију VEGF-а.
4. Експресија IL-33 и IL-33R у туморским ћелијама је у негативној корелацији са експресијом истих белега у ћелијама туморске строме.

## ПАЦИЈЕНТИ, МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### 3.1. Лабораторијске животиње

Студија је изведена на мишевима чистог BALB/c соја (енгл. „wild type“, IL-33R<sup>+/+</sup>, WT) и мишевима истог соја са циљаном делецијом гена за IL-33R („knock-out“ или IL-33R<sup>-/-</sup> BALB/c) женског пола, старости од 6 до 8 недеља, телесне тежине од 15 до 20 g (702). IL-33R<sup>-/-</sup> мишеви добијени су из Центра за биомедицинска истраживања Универзитета у Глазгову, љубазношћу проф. др Liew-a (FY, Glasgow Biomedical Research Centre, United Kingdom). Све животиње одгајане су под стандардним условима у виваријумима Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

### 3.2. Одобрење етичког комитета

Истраживање је спроведено у Центру за патоанатомску дијагностику, Клиничког центра у Крагујевцу, Србија и Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Србија у периоду од јула 2013 до октобра 2015.године.

Експерименталне животиње коришћене у студији одгајане су уз људску бригу у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Србија, уз слободан приступ храни и води (лат. *ad libitum*). Експерименте је одобрила Етичка комисија за експерименталне животиње, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Србија, број 01-11037 од 11.12.2012. године.

Спровођење студије на материјалу узетом од болесника одобрио је Етички комитет Клиничког центра Крагујевац, Србија, као клиничко-експерименталну, неинтервентну студију, која се спроводи искључиво у научноистраживачке сврхе, број 01-6933 од 20.06.2013. године. Пре спровођења истраживачког поступка, болесници су информисани о истраживању, након чега су потписали информисани пристанак за учешће у студији. 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. BALB/c мишеви са циљаном делецијом гена за IL-33R

*Knock-out* мишеви поседују један или више нефункционалних гена. Представљају најбољи анимални модел за проучавање гена чија функционалност још увек није довољно разјашењена или је сасвим непозната. Методологија стварања *knock-out* мишева се заснива на уношењу путем вектора страног, нефункционалног, хомологог гена у ембрионалне матичне ћелије са циљем хомологе рекомбинације и замене функционалног гена нефункционалним. У току хомологе рекомбинације долази до замене гена између пара хомологих секвенци два молекула DNA које имају сличне или идентичне нуклеотиде (703,704).

У даљем поступку бирају се само ћелије у којима се одиграла жељена рекомбинација. Вектор садржи и два додатна гена за контролу рекомбинације (705,706):

Нео ген, носилац резистенције на неомицин и

Тк ген, ген за вирусну тимидин киназу

Вектор се убацује у културу ћелија гајених у медијуму који садржи неомицин, као и ганцикловир или FIAU (*1-(29-deoxy-29-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodo-uracil*) који се под утицајем тимидин киназе метаболишу у токсични продукт. *Neo* ген се увек уграђује у геном ћелије, док се *Tk* ген исказује само када се не догоди хомолога рекомбинација. Ћелије резистентне на неомицин, а са активним *Tk* геном биће уништене помоћу ганцикловира или FIAU. Међутим, преживеће све ћелије у којима се одиграла хомолога рекомбинација јер ће бити резистентне и на неомицин и на ганцикловир или FIAU (705,706).

Хомозиготни IL-33R<sup>-/-</sup> мишеви дизајнирани су у лабораторији проф.др McKenzie-a (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, United Kingdom) векторским искључивањем T1/ST2 гена (702). Вектор је тако конструисан да унесе ген одговоран за резистентност на неомицин између дефинисаних места: XbaI на четвртном и

VamHII на петом егзону T1/ST2 гена и на тај начин уклони већи део четвртог и петог егзона. Вектор има 5,1 kb (кило-базних) парова који обезбеђују 5' хомологију и 2 kb пара који обезбеђују 3' хомологију са ендогеним T1/ST2 геном. Хомологи крајеви направљени су PCR техником (енгл. *Polymerase Chain Reaction*), коришћењем *Pfu turbo* полимеразе (Stratagene). Хомологни 5' крај инсертованог гена добијен је помоћу нуклеотида: 5'-AGT-GCATCTAGAGATACTGATGAGGCACC и 5'-СТТСТТТСТАГАТ-ТАТТСААГТТГГГГС-ТАТТААААГААГСС, а хомологни 3' крај помоћу нуклеотида: 5'-CCACCGGATCCT-TCACAGTTGAAGGTAAGCTCTTGGCTTCAACAAGGG и 5'-GGAAGGAAAAAAGC-GGCCGCGATCTCGCTCCACAGAGATGAGGAACGGCC. Вектор је линеаризован и инсертован у E14.1 ембрионалне матичне ћелије (704). Од 1600 G418-резистентних клонова потврђених *Southern* анализом помоћу пробе А, свега 5 је имало коректно инсертован ген. Проба А је направљена PCR техником, помоћу прајмера: 5'-ТАСГТААССТССА-ТГТГСАГТЦСТТГСТГСС и 5'-ГТСАСАТСАСАГГАТГАГГГ. Хибридизацијом са пробом за секвенцу резистентну на неомицин потврђена је величина инсертованог сегмента као и присуство само једне инсерције. Затим су, у циљу стварања химера, две од третираних ембрионалних матичних ћелија убризгане у 3,5 дана старе бластоците добијене из BALB/с мишева. Овако добијени мишеви укрштени су са BALB/с мишевима у генотип ембрионалних матичних ћелија је преношен на потомство. Хомозиготи за нефункционалан T1/ST2 ген добијени су у наредним генерацијама инцестним спаривањем хетерозигота.

У овако добијеним IL-33R<sup>-/-</sup> мишевима није детектована разлика у броју ћелија крви у односу на IL-33R<sup>+/+</sup> мишеве. Уз то, анализирани су и субпопулације лимфоцита у тимусу, слезини, лимфним чворовима, и показано је да нема разлике у укупном броју лимфоцита, као и у односу CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ћелија код IL-33R<sup>-/-</sup> и IL-33R<sup>+/+</sup> мишева (702).

### 3.4. Ћелијска линија мишјег тумора дојке 4T1

У експерименталном моделу користили смо 4T1, ћелијску линију мишјег тумора дојке (енгл. *American Type Culture Collection*, Manassas, ATCC, VA, USA; CRL-2539).

Ова линија је добијена из спонтаног насталог тумора дојке у BALB/с мишу (5,699). Због брзине метастазирања, представља анимални модел за проучавање IV стадијума карцинома дојке. Ћелије се могу инокулисати директно у масно јастуче млечне жлезде (инјекцијом), у латералну репну вену интравенски, катетеризацијом десне каротидне артерије или инјекцијом у леву преткомору срца. Након убризгавања директно у ткиво дојке, ћелије 4T1 расту брзо, формирајући примарни тумор и дају хематогене метастазе у плућима, јетри, костима и мозгу у периоду од 3 до 6 недеља након инокулације (693,695,696,699).

### 3.5. Индукција примарног тумора дојке

Туморске ћелије 4T1 су култивисане у комплетном DMEM медијуму (енгл. *Dulbecco's Modified Eagles Medium*) који садржи: 4,5 g/l глукозе, 10% феталног бовиног серума (FBS), 2 mmol/l L-глутамин, 1 mmol/ml натријум пирувата, 10 mmol/l HEPES-а, 100 U/l пеницилина, 100 mg/ml стрептомицина и 1 mmol/l мешаних неесенцијалних аминокиселина (Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, MO, USA). Како је најлабилнија компонента комплетног медијума аминокиселина L-глутамин, која је потребна већини ћелија сисара и има полуживот од приближно 3 недеље, медијум који се користи дуже од 3 недеље, прављен је без глутамин, а глутамин чуван као замрзнут, концентрован шток, додаван је пре употребе медијума (0,1-0,6 g/l).

Ћелије извађене из контејнера са течним азотом су брзо одмрзаване у воденом купатилу (37°C, не дуже од два минута). Додавањем 9 ml комплетног медијума и центрифугирањем на 350G 10 минута, уклоњен је крио-протективни медијум. Кристо-протективни медијум јесте комплетан медијум за раст ћелија са додатком 5% DMSO. Након одливања супернатанта ћелије су ресуспендоване у 1 ml комплетног медијума, пребачене у фласк за култивацију и инкубиране у атмосфери 5% CO<sub>2</sub>, засићеној воденом паром на температури од 37°C. Пре употребе, комплетан медијум је инкубиран најмање 15 минута, да би се

стабилизovala pH вредност. Ћелије су култивисане у посудама за културу ћелија – T<sub>25</sub> фласкови (BD Falcon) у стриктно асептичним условима. Просечно време удвостручавања броја ћелија износи од 24 до 48 часова.

Субконфлуентне ћелије, у логаритамској фази раста, подигнуте су из флашка краткотрајним третирањем трипсином (0,25% трипсин са хелатором 0,02% EDTA који су растворени у PBS-у (енгл. *Phosphate Buffered Saline*; PBS, PAA Laboratories GmbH)). Ћелије су затим опране у комплетном медијуму, да би FBS инактивисао трипсин и спречио оштећење ћелија, а потом су додатно пране у PBS-у, без FBS-а (енгл. *Fetal Bovine serum*), пре употребе у сваком експерименту *in vivo*. Процент живих ћелија одређиван је виталним бојењем трипан плавим, а у експерименталном раду су коришћене само суспензије ћелија са вијабилношћу већом од 95%. Трипан плаво је боја која служи за разликовање мртвих и живих ћелија јер улази искључиво у ћелије са нарушеним интегритетом ћелијске мембране, док живе ћелије са очуваном ћелијском мембраном остају необојене (707).

Истраживачи су у експерименталном раду користили различити број туморских ћелија 4T1 за индукцију болести, који се кретао од  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^6$  (695). У свим експериментима овог истраживања коришћемо је  $5 \times 10^4$  туморских ћелија за индукцију тумора (175,200,708).

Малигне ћелије 4T1 ( $5 \times 10^4$ ) су ресуспендоване у 50  $\mu$ l PBS-а и убризгаване су инсулинским системом (шприц и игла 21 G) директно у масно јастуче млечне жлезде број 4.

### **3.6. Жртвовање, одвајање ткивног материјала и верификација индукованог тумора.**

Мишице су жртвоване 29-ог и 36-ог дана од инокулације, цервикалном дислокацијом, након чега је изоловано туморско ткиво. Присуство тумора верификовано је микроскопирањем препарата добијених сечењем узорака ткива, укалупљених у парафин, а затим бојених стандардним Н&Е бојењем. Да би се пратила временска зависност и утврдила разлика у експресији IL-33 у туморском ткиву између WT и IL-33R<sup>-/-</sup> групе, мишеви су жртвовани сваког трећег дана након појаве палпабилног тумора.

### **3.7. Процена раста тумора у мишјем моделу тумора дојке**

Раст примарног тумора је праћен свакодневно, регистровањем палпабилног тумора а његова величина је одређивана морфометријски, коришћењем нонијуса. Након жртвовања мишева и екстирпације тумора применом аналитичке ваге одређивана је маса тумора као и запремина тумора на основу формуле (175,200,708):

$$V(\text{mm}^3) = \frac{L \text{ (највећи пречник)} \times W^2 \text{ (најмањи пречник)}}{2}$$

### **3.8. Фиксација ткива и бојење хематоксилином и еозином (Н&Е)**

У рутинској обради препарата, узорци ткива су фиксирани у 10% неутралном, пуферисаном раствору формалина, у току 24 часа, на собној температури. Након моделирања, ткивни узорци су пласирани у одговарајуће касете које су монтиране у ткивни процесор (Leica TP 1020, Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Даље, узорци су у ткивном процесору дехидратисани потапањем кроз серију алкохола растуће концентрације, 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 процедуре у ткивном процесору у трајању од 16 часова, ткивни узорци су разливани и калупљени у

парафинске блокове. Попречни серијски пресеци дебљине 5  $\mu\text{m}$  сечени су 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.

Након сушења у трајању од 30 минута уследило је бојење ткивних пресека, методом хематоскилин-еозин. Плочице са ткивним пресецима су загрејане у термостату на температури од 58°C у трајању од 60 минута. Рехидратација је постигнута потапањем ткивних пресека исечака у серију алкохола опадајућих концентрација и то следећим редом: 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). Потом су ткивни исечци испирани 1 минут у текућој води и најзад бојени алкохолним еозином у трајању од 3 минута (Eozin Y 1% vodeni, EOY-10-OT-1L, BioGnost, Zagreb, Croatia). Након бојења уследила је 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. Након бојења и дехидратације уследио је 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 смо наносили Канада балзам (Canada balsam, Centrohem, Београд, Србија) и прекрили их покровним стаклима. Овако припремљени ткивни исечци су након 24-часовног сушења, анализирани светлосним микроскопом (x100, x200, x400).

### **3.9. Фотографисање ткивних пресека и аквизиција слика**

Ткивни пресеци индукованих тумора дојке, бојени HE методом, фотографисани су дигиталном камером (AxioCam ICc1, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany) појединачним фотографијама у маниру „црва“ применом микроскопског увећања 200x и софтвера *AxioVision* (AxioVision v.4.8.2.0, Carl Zeiss Microscopy GmbH, München, Germany). Сlike су снимљене у резолуцији од 1536x2048 пиксела и сачуване на хард диск-у, у TIFF формату (енгл. *Tagged image file format*). Просветљивање фотографија је

учињено непосредно након фотографисања и укључивала је примену опције *Automatic White Balance* која је калибрисана на основу референтних параметара произвођача. За потребе софтверске анализе коришћене су фотографије високе резолуције.

### **3.10. Компјутерска квантификација некрозе у туморском ткиву**

У нашој студији је коришћен алгоритам за полуаутоматску анализу који одређује пропорцију туморског ткива захваћеног некрозом у односу на целокупни пресек туморског ткива. Овим алгоритмом се однос броја туморских ћелија захваћених некрозом и укупног броја туморских ћелија процењује као однос површине туморског ткива захваћеног некрозом и укупне површине препарата. На овај начин се избегава потреба да се тачно раздвоје појединачне ћелије. На основу начињених фотографија, применом софтверског пакета *Adobe Photoshop CS6* (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA), за сваки тумор посебно генерисали смо мозаик. Фотографије добијене на овај начин представљале су целокупни пресек туморског ткива који је анализиран применом софтвера *Image Pro Plus* (Image Pro Plus v.6.0.0.206, Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA). Први корак у анализи је калибрација на основу корекционе слике камере, уклањањем остатака позадине чије су карактеристике уочене у RGB колор-простору. Наиме, чињеница да G компонента позадине на сликама има знатно већу вредност од G компоненте самог препарата омогућава одабир погодног прага који обезбеђује прецизно раздвајање позадине од самог препарата. Као резултат, добија се монохроматска слика са означеним регионом препарата. У другом кораку одредили смо регију од интереса (зелена линија), тј туморско ткиво у односу на позадину. Некрозу смо квантификовали одабиром нијанси боја које одговарају ткиву захваћеном некрозом. Приказани резултати представљали су проценат ткива захваћеног некрозом (црвени пиксели) у односу на површину целокупног туморског ткива.

### 3.11. Испитивана популација

У студију су укључени ткивни узорци 40 пацијенткиња са инвазивним дукталним карциномом дојке које су оперативно лечене (мастектомија) у Клиници за хирургију Клиничког центра Крагујевац, у периоду од 2003 до 2005. године а којима је болест дијагностикована у Центру за пато-анатомску дијагностику Клиничког центра Крагујевац. Класификација је учињена према критеријумима AJCC (енгл. *American Joint Committee on Cancer*) и UICC (енгл. *The Union for International Cancer Control*), а градирање тумора према класификацији WHO (енгл. *World Health Organization*). У студију су укључене пацијенткиње са карциномима дојке, који су на основу величине класификовани у T2 и T3 стадијум. Карциноми дојке су затим дељени на по две групе у зависности од присуства некрозе у туморима (без и са детектованом некрозом), као и степена експресије IL-33 и IL-33R у туморским и ћелијама туморске строме (ниска и висока експресија).

Након фиксације и рутинске обраде ткивног материјала дијагноза је постављана на основу H&E и стандардног имунохистохемијског бојења.

Поред дијагнозе, микроскопски преглед је укључивао одређивање стандардних и нестандартних параметара тј особина тумора. Хистопатолошки извештај садржи податке о патолошком стадијуму болести (енгл. *Pathologic TNM classification*, 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 моноклеарне реакције, некрозе у тумору, постојању лимфне, васкуларне и перинеуралне инвазије.

Постоперативно, пацијенткиње са карциномом дојке, су праћене у оквиру Конзилијума за патологију дојке, Клиничког Центра Крагујевац, чиме је одређивана даља адјувантна терапија, обављане прве две године тромесечне, а затим шестомесечне контроле и на којима су у случају релапса болести, ординиране секундарна и терцијарна терапија. Преживљавање је додатно праћено кроз телефонски контакт са пацијенткињама и повремено, увидом у матичну књигу умрлих.



Искључујући критеријуми за одабир испитаница су старост изнад 65 година, жене којима је дијагностикована или су раније лечене од малигне болести, други хистолошки типови карцинома дојке, као и пацијенткиње са интермедијарном експресијом HER2 у ткиву тумора.

### **3.12. Имунохистохемијски метод бојења ткивних исечака калупљених у парафину**

Експресија IL-33R, IL-33, VEGF-a, CD105, ER, PR, HER2 и p53 у ткиву карцинома дојке испитана је имунохистохемијски, коришћењем: анти-IL-33R антитела (human: pAb; 1:500; PA5-20077; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), анти-IL-33 (human/mouse: pAb; 1:200; sc-98660; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), анти-VEGF (human: pAb; 1:100; RB-9031-P0; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA; mouse: pAb; 1:120; ab46154; Abcam, Cambridge, UK), анти-CD105 (human: pAb; RTU; RB-9291-R7; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), анти-ER (human: mAb; Clone: 1D5; RTU; IR065760; Dako, Glostrup, Danmark), анти-PR (human: mAb; Clone: 1D5; RTU; IR06861; Dako, Glostrup, Danmark), анти-HER2 (human: pAb; 1:1200; A0485; Dako, Glostrup, Danmark) и анти-p53 (human: mAb; Clone: DO-7; 1:50; M7001; Dako, Glostrup, Danmark).

Ткиво је 24 часа фиксирано у 10%-тном неутралном, пуферизованом формалину и калупљено у парафину. Резови дебљине 4-5  $\mu\text{m}$ , су монтирани на високо адхерентне плочице SuperFrost® и сушени на температури од 56°C у току 60 минута.

Како би се обавила депарафинизација и рехидратација, као што је раније описано, ткивни пресци монтирани на плочице провлачени су кроз серију алкохола опадајућих концентрација. Фиксација ткива у формалину, као и калупљење ткивних узорака у парафину изазивају конфигурацијске промене протеина и формирање интермолекулских веза које маскирају антигене и смањују ефекат имунохистохемијског бојења. Поступком ослобађања, обнавља се примарна конфигурација антигена уклањањем нежељених интермолекулских веза. Демаскирање антигена је обављено у микроталасној пећници (Samsung MG23F301TAS, Seoul, South Korea), 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, Glostrup, Danmark] на 96°C, у трајању од 20 минута. По обављеном „кувању“ плочице са ткивним пресецима су 5 минута испиране дестилованом водом. Како би блокирали ефекат ендogene пероксидазе и елиминисали неспецифично бојење, плочице су постављене у кивете са 3% раствором водоник-пероксида (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), у трајању од 10 минута. Након испирања дестилованом водом, плочице су пласиране у кивете са фосфатним пуфером (енгл. *Phosphate-buffered saline*, PBS). По сушењу плочица и „овичавању“ ткивних пресека посебном оловком за ту намену, плочице су постављене на носач у влажној комори. Ткивни пресеци су инкубирани са 100-200 µl примарног антитела, у трајању од 20-60 минута, на собној температури, према препорукама произвођача за свако антитело (Табела 11). Као растварач примарних антитела коришћен је 0,1 М PBS (pH 7,6) или комерцијални растварач (Antibody diluent, TA-125-ADQ, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). У току бојења, анализирани су раније тестирани негативни и позитивни узорци ткива на примењена антитела.

Табела 11. Карактеристике ИНС белега коришћених у анализи ткивних пресека мишићег и хуманог карцинома дојке

| Име антитела                                  | Произвођач                                    | Кат.број   | Реактивност | Клон           | Разблажење    |
|---|---|------------|-------------|----------------|---------------|
| <b>IL-33R</b>                                 | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA           | PA5-20077  | Human       | polyclonal     | <b>1:500</b>  |
| <b>IL-33</b>                                  | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA | sc-98660   | Human Mouse | polyclonal     | <b>1:200</b>  |
| <b>VEGF</b>                                   | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA           | RB-9031-P0 | Human       | polyclonal     | <b>1:100</b>  |
|   | Abcam, Cambridge, UK                          | ab46154    | Mouse       | polyclonal     | <b>1:120</b>  |
| <b>CD105</b>                                  | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA           | RB-9291-R7 | Human       | polyclonal     | <b>RTU</b>    |
| <b>Estrogene receptor <math>\alpha</math></b> | Dako, Glostrup, Danmark                       | IR065760   | Human       | 1D5            | <b>RTU</b>    |
| <b>Progesterone receptor</b>                  | Dako, Glostrup, Danmark                       | IR06861    | Human       | <b>PgR 636</b> | <b>RTU</b>    |
| <b>HER2</b>                                   | Dako, Glostrup, Danmark                       | A0485      | Human       | polyclonal     | <b>1:1200</b> |
| <b>p53 Protein</b>                            | Dako, Glostrup, Danmark                       | M7001      | Human       | DO-7           | <b>1:50</b>   |
| <i>RTU – Ready To Use</i>                     |   |            |             |                |               |

По истеку инкубације, плочице су испиране у PBS-у, кроз три кивете, а затим је накапано секундарно антителио, дефинисано препорукама произвођача за свако примарно антителио (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, Glostrup, Denmark). Инкубација секундарним антителиом је обављена на собној температури у трајању од 30-60 минута, према протоколу произвођача. Визуализација имунохистохемијске реакције је постигнута накапавањем хромогенског супстрата за детекцију пероксидазе из рена (енгл. *Horse-radish peroxidase*, HRP). Као хромагени накапавани су АЕС (3-Amino-9-Ethylcarbazole) или DAB (3,3'-Diaminobenzidine), након чега су ткивни пресеци инкубирани 5-10 минута. После испирања уследило је бојење са Mayer-овим хематоксилином. Ткивни пресеци на које је накапан DAB су, као што је раније описано, дехидратисани у растућим концентрацијама алкохола и просветљени у ксилолу, а затим прекривени покровним стаклом применом Canada balsam-a. Како се АЕС раствара у алкохолу, плочице су испране водом и покривене покровним стаклом уз примену глицерола. Препарати су складиштени на тамном месту, обзиром да АЕС временом бледи на светлу.

### 3.13. Имунохистохемијски метод бојења смрзнутих ткивних исечака

Након жртвовања мишева и екстирпације тумора, узорци су преношени до криотома на коме су учињени ткивни пресеци дебљине 5-7  $\mu\text{m}$  и монтирани на високо адхерентне плочице SuperFrost<sup>®</sup>. Препарати са смрзнутим резovima туморског ткива су складиштени на температури од  $-80^{\circ}\text{C}$ . Имунохистохемијском анализом је одређивано присуство анти-IL-33 (mouse: pAb; 1:200; sc-98660; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) и анти-VEGF (mouse: pAb; 1:120; ab46154; Abcam, Cambridge, UK) позитивних туморских ћелија, у мишјем 4T1 карциному дојке. Плочице су загрејане на собној температури у трајању од 5 минута. Ткиво је фиксирано 10 минута, пласирањем плочица у кивете наливене претходно расхлађеним ацетоном, на температури од  $-20^{\circ}\text{C}$  у трајању од 30 минута. По завршеној фиксацији, препарати су 10 минута потопљени у 0,3% раствор хидрогена, како би се блокирао ефекат ендogene пероксидазе и елиминисало неспецифично имунохистохемијско бојење. Примарна антителиа су разблажена у PBS, у односу прописаном препорукама произвођача за свако антителио, а затим су наношена на исечке.

Ткиво је инкубирано са 100-200 µl примарног антитела, на собној температури, у трајању од 30 до 60 минута. Након накапавања секундарног антитела, уследила је инкубација у трајању од 20 минута (EnVision FLEX, High pH, k8000, Dako, Glostrup, Denmark). Испирање препарата између појединачних корака процедуре, обављано је применом PBS по 3 пута у трајању од 5 минута. Имунохистохемијска реакција је визуализована инкубацијом ткивних пресека раствором DAB супстрата, на собној температури, у трајању од 10 минута. Препарати су испрани 3 пута по 5 минута у дестилованој води, након чега је наношен раствор Мауер-овог хематоксилина. По испирању дестилованом водом, ткивни резови су, као што је раније описано, дехидратисани у растућим концентрацијама алкохола и просветљени у ксилолу, а затим прекривени покровним стаклом применом Canada balsam-а. Припремљени ткивни исечци су анализирани светлосним микроскопом (Axioskop 40, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany), након сушења од 24 часа.

### 3.14. Контрола квалитета и специфичности имунохистохемијског бојења

Сва имунохистохемијска бојења изведена су уз контролу квалитета и специфичности бојења, применом позитивних и негативних контрола, према стандардним пропозицијама UK NEQAS-а (енгл. *UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry*).

Као позитивна контрола за тестирање датим антителима коришћени су раније вишеструко тестирани ткивни узорци и сигурно садрже испитиване антигене (Табела 12). Припремани су на исти начин као и испитивани узорци у овом истраживању. Као негативна контрола у току имунохистохемијског бојења послужили су узорци ткива третирани индиферентним пуфером који нема афинитет везивања за анализиране антигене.

Табела 12. Ткивни пресеци коришћени као позитивне контроле у ИHC анализи

| Позитивне контроле за дата антитела           |                |
|---|----------------|
| <b>Estrogene receptor <math>\alpha</math></b> | Карцином дојке |
| <b>Progesterone receptor</b>                  | Карцином дојке |
| <b>HER2</b>                                   | Карцином дојке |
| <b>p53 Protein</b>                            | Карцином дојке |
| <b>VEGF</b>                                   | Карцином дојке |
| <b>CD105</b>                                  | Плацента       |
| <b>IL-33</b>                                  | Кожа           |
| <b>IL-33R</b>                                 | Кожа           |

### 3.15. Очитавање имунохистохемијске експресије испитиваних белега у мишјем и хуманом ткиву тумора дојке

Експресију испитиваних имунохистохемијских белега у ткиву тумора су одређивала два истраживача. Нуклеарна експресија ER, PR и p53 у туморским ћелијама је одређивана на основу Allred скорa тј као збир појединачних скорова за проценат и интензитет бојења туморских ћелија (Табела 13). Мембранска експресије HER2 је очитавана у складу са препорукама UK NEQAS. Заснива се на одређивању процента позитивних туморских ћелија (гранична вредност је 10%), континуитету и интензитету имунореактивног бојења мембране (Табела 14) (709).

Табела 13. Одређивање нуклеарне експресије ИНС белега у ткиву хуманог карцинома дојке на основу процентуалне заступљености и интензитета ИНС бојења

| Скор | Процент позитивних ћелија                 | Скор | Интензитет имунохистохемијског бојења        |
|------|---|------|--|
| 0    | Нема позитивних туморских ћелија          | 0    | Нема имунохистохемијског бојења              |
| 1    | Мање од 1% позитивних туморских ћелија    | 1    | Слаб интензитет имунохистохемијског бојења   |
| 2    | Од 1 до 10% позитивних туморских ћелија   | 2    | Умерен интензитет имунохистохемијског бојења |
| 3    | Од 11 до 33% позитивних туморских ћелија  | 3    | Јак интензитет имунохистохемијског бојења    |
| 4    | Од 34 до 66% позитивних туморских ћелија  |      |  |
| 5    | Од 67 до 100% позитивних туморских ћелија |      |  |

Табела 14. UK NEQAS критеријуми за одређивање HER2 статуса у хуманом карциному дојке

| Her2 статус              | Оцена | Присутност мембранске експресије  |
|--------------------------|-------|---|
| негативан                | 0     | Није присутна   |
| негативан                | 1+    | Мање или више од 10% туморских ћелија које показују дисконтинуирану мембранску експресију, слабог интензитета |
| неодређен<br>(equivocal) | 2+    | Више од 10% туморских ћелија које показују континуирану мембранску експресију, слабог и умереног интензитета  |
| позитиван                | 3+    | Више од 10% туморских ћелија које показују континуирану мембранску експресију, јаког интензитета              |

Експресија VEGF-a је процењивана на основу критеријума за скоровање који су предложили *Rydén* и сарадници (710) за интерпретацију овог белега у инвазивном карциному дојке. Очитавано је искључиво цитоплазматско бојење туморских ћелија и имунохистохемијски скор је одређиван на основу процента туморских ћелија које су биле

позитивне на VEGF. Скала за оцењивање експресије се кретала у интервалу од 0 до 5: 0=одсуство имунохистохемијске реакције; 1= $\leq$ 1% позитивних ћелија; 2=1–10% позитивних ћелија; 3=10–50% позитивних ћелија; 4=50-90% позитивних ћелија и 5  $\geq$  90% позитивних ћелија. Имунохистохемијска експресија IL-33 и IL-33R је независно квантификована у туморским и стромалним ћелијама и приказивана као проценат позитивних ћелија у односу на укупан број евакулираних ћелија. У зависности од израчунате *cut off* вредности за процентуалну заступљеност стромалних ћелија позитивних на IL-33 и IL-33R у односу на некрозу, сви тумори су подељени на две групе и анализирани као карциноми са ниском и високом експресијом. Процент имунохистохемијске експресије је одређиван бројањем ћелија у 5 различитих микроскопских поља на увећању x400.

### **3.16. Евакуација микроваскуларне густине (MVD) у карциномима хуманог порекла**

Микроваскуларна густина (енгл. *Microvessel density*, MVD) је процењивана имунохистохемијском методом, применом анти-CD105 антитела и употребом светлосног микроскопа (Axioskop 40, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany). Појединачне ендотелне ћелије или кластери позитивни на CD105 детектовани су као крвни судови. Присуство крвних ћелија или фибрина без детектованих ендотелних ћелија нису анализирани као микроваскуларни елементи као ни крвни судови са мишићним зидом. Све плочице су првобитно анализирани на микроскопским увећањима x40 и x100. На овај начин су одређивана три „жаришта“ (енгл. „*hot spots*“) тј. поља са највећом микроваскуларном концентрацијом, а затим су ова поља фотографисана на x200 увећању применом дигиталне камере (AxioCam ICc1, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany). Независно, два истраживача су применом софтвера (AxioVision v.4.8.2.0, Carl Zeiss Microscopy GmbH, München, Germany) спровела анализу генерисаних фотографија и утврдили број микроваскуларних структура у претходно одабрана три „жаришта“. MVD (микроваскуларне структуре/HPF) је израчунавана према критеријумима које су поставили *Weidner* и сарадници (711) тј као средња вредност појединачних MVD у три одабрана микроскопска фокуса.

### 3.17. Прогностички индекси у хуманом карциному дојке

#### 3.17.1. Nottingham-ov прогностички индекс

Публикован је 1982.године (349) а допуњен 10 година касније (349)након чега је у већини установа ушао у праксу као рутински одређиван прогностички фактор. Израчунава се преко формуле:

$$NPI = 0,2 \times \text{величина тумора(cm)} + \text{градус(1-3)} + \text{нодални статус (1-3)}$$

Код хистолошког градуса, добра диференцијација тумора добија 1 бод, средња 2 и слаба 3 бода. Нодални статус се такође класификује у три групе; прва група је без метастаза у лимфним чворовима (1 бод), 2 добијају ако је захваћено од 1-3 нодуса, а 3 ако су метастатски депозити присутни у више од 4 лимфна нодуса. Добијене вредности се распоређују у три прогностичке групе; добру (скор мањи од 3,4) интермедијарну (скор од 3,4 до 5,4) и лошу (скор већи од 5,4). Са порастом NPI скора прогноза болести је лошија (350).

#### 3.17.2. Имунохистохемијски прогностички индекс

Имунохистохемијски прогностички индекс (енгл. *Immunohistochemical prognostic index*, ИНПИ) је настао у новије време, као резултат имунохистохемијске детекције различитих онкогена (347). Израчунава се сабирањем појединачних скорова за четири имунохистохемијска белега. p53 и HER2 позитивни тумори се оцењују са 1, а негативни са 0. Тумори са експресијом естрогених и прогестеронских рецептора добијају 0 бодова, а без ове експресије 1. Укупан скор за сваки тумор појединачно креће се у опсегу од 0-4 на основу кога се тумори стратификују 3 прогностичке групе: прву, прогностички добрује са добром прогнозом (скор 0 или 1), другу, са интермедијерном прогнозом (скор 2) и трећу групу, са лошом прогнозом (скор 3 или 4).

### 3.18. Снага студије и величина узорка

Снага студије за истраживање на мишевима је израчунавана на основу студије *Jovanovic* и сарадника (200) где је као примарна зависна исходишна варијабла узета експресија CD31, а као примарни независни узрочни фактор – апликација рекомбинатног IL-33. Експресија CD31 је приказана као број ендотелних ћелија у примарном тумору (нумеричка континуирана варијабла) тако да је претпостављена статистички значајна корелација ова два параметра слабе до умерене јачине, ради добијања што већег узорка. Средња вредност броја ендотелних ћелија позитивних на CD31 у групи која је третирана рекомбинантним IL-33 била је  $30,80 \pm 30\%$ , а код групе која није третирана IL-33  $10,57 \pm 30\%$ . За израчунавање величине узорка користили смо двострани независни t тест, жељену снагу студије  $1-\beta=0,99$  (99%), вероватноћу грешке I типа ( $\alpha$ ) 0,05 и претпоставку да ће обе групе садржати подједнак број експерименталних животиња. На основу задатих параметара израчунали смо да је неопходно да укупан узорак садржи 14 експерименталних животиња, односно по 7 у свакој групи ( $n_1 = n_2 = 6,0491 \approx 7$ ).

Прорачун величине узорка је заснован на претпоставци да постоји повезаност између некрозе и експресије IL-33 у туморском ткиву. Као примарна, зависна исходишна варијабла је узета експресија IL-33, а као примарни независни, узрочни фактор – присуство некрозе у туморском ткиву. Вредности експресије се изражавају у процентима (нумеричка континуирана варијабла) тако да је, на основу досадашњих студија, претпостављена статистички значајна корелација ова два параметра слабе до умерене јачине, ради добијања што већег узорка (што је мања корелација, потребан је већи узорак). Величина узорка ће бити израчуната на основу разлике у експресији IL-33 у туморским ћелијама у зависности од хистолошког градуса инвазивног дукталног карцинома дојке, приказаној у студији *Liu* и сарадника (170), где је средња вредност процентуалне експресије туморског IL-33 у групи карцинома са хистолошким градусом I и II била  $87,33 \pm 18,70$ , а код градуса III била је  $58,64 \pm 41,96$ . За израчунавање величине узорка узето је да ће се користити двострани независни t-тест, да је жељена снага студије  $1-\beta=0,80$  (80%), вероватноћа грешке I типа ( $\alpha$ ) 0,027 и да обе групе имају подједнак број испитаница. Применом комерцијалног програма G\*Power v.3.0.10 утврдили смо да је за за дате



критеријуме неопходан узорак од 42 испитанице, односно 21 болесница по групи ( $n_1 = n_2 = 20,62275 \approx 21$ ).

### 3.19. Статистичка обрада података

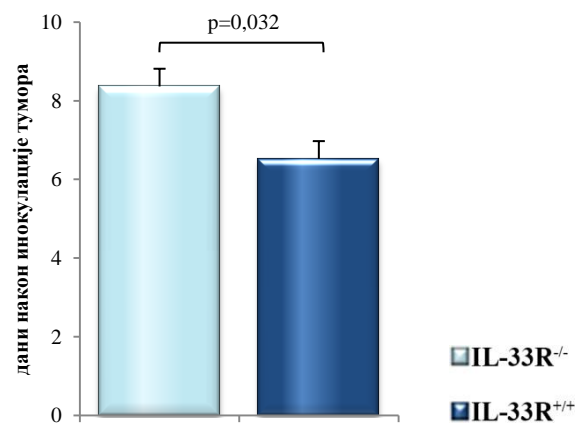
Статистичка обрада резултата извршена је помоћу комерцијалног програмског пакета SPSS (SPSS v.20.0, SPSS Inc., Chicago, IL). У анализи добијених резултата најпре је коришћена дескриптивна статистика за опис општих карактеристика узорка: апсолутни бројеви и пропорције (фреквенције, проценти), мере централне тенденције (аритметичке средине) и мере варијабилитета (стандардна девијација). Нормалност расподеле евалуирана је тестом Kolmogorov-Smirnov. За поређење средњих вредности променљиве двеју популација коришћен је независни t тест и Mann-Whitney-јев тест. Испитивање зависности две описне променљиве реализовано је помоћу  $\chi^2$  теста. Зависности две нумеричке променљиве испитивана је помоћу Pearson-овог и Spearman-овог коефицијента корелације. Могућност да нека променљива буде маркер испитивана је помоћу криве оперативне карактеристике примаоца (енгл. *Receiver operating characteristic curve, ROC curve*), при чему су, за погодно утврђен *cut-off*, одређивани сензитивност и специфичност. Одређивањем сензитивности и специфичности теста за поједине онкогене дат је ниво поузданости ових анализа. Процена функције преживљавања је утврђена методом Kaplan-Meier-а, а Mantel-Cox тест је коришћен за поређење скала. Статистичке анализе су урађене са интервалом поверења од 95%. За статистички значајну разлику у добијеним вредностима сматра се када је  $p < 0,05$ , док је статистички веома значајна разлика када је  $p < 0,01$ .

## РЕЗУЛТАТИ

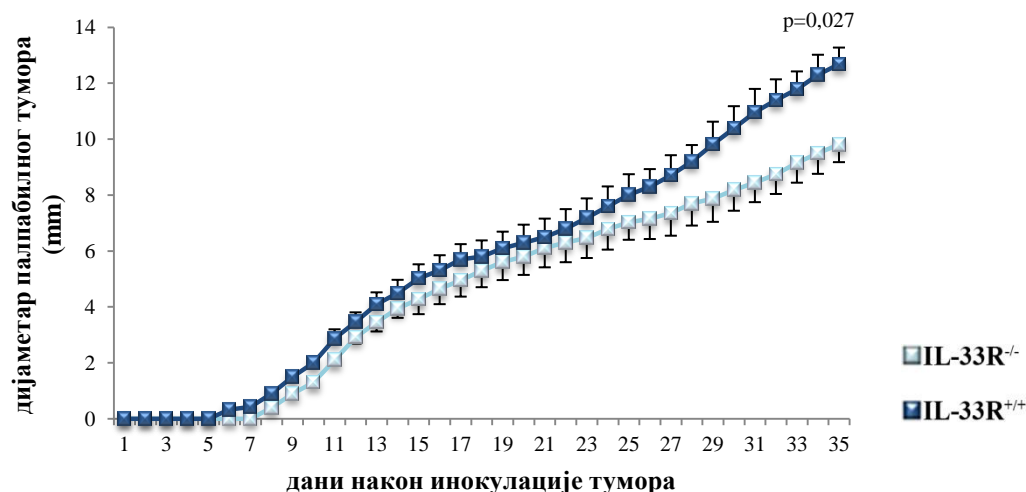
### 4.1. Делеција гена за IL-33R успорава раст примарног 4T1 тумора и повећава поље туморске некрозе

Ћелије из културе 4T1 тумора ( $5 \times 10^4$ ) су убризгане у четврту млечну жлезду IL-33R<sup>-/-</sup> и IL-33R<sup>+/+</sup> BALB/c мишева, а појављивање тумора је дневно праћено палпацијом. Након појаве палпабилног тумора мерен је његов раст док су пречник, маса тумора као и укупан волумен одеђивани 29. и 36. дана експеримента, односно приликом жртвовања животиња.

У IL-33R<sup>-/-</sup> мишева палпабилни тумор се појављује касније, тако да је средња вредност времена протеклог од инокулације туморских ћелија до појаве палпабилног тумора значајно већа у IL-33R<sup>-/-</sup> него у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева ( $8,4 \pm 0,4$  vs.  $6,5 \pm 0,6$  дана) (Students' T тест,  $p=0,032$ ) (Фигура 1).



**Фигура 1. Одсуство гена за IL-33R успорава појаву палпабилног тумора.** IL-33R<sup>-/-</sup> (n=24) и IL-33R<sup>+/+</sup> (n=24) мишевима су тумори индуковани апликацијом ћелијске линије 4T1 мишјег карцинома дојке. Малигне ћелије 4T1 ( $5 \times 10^4$ ) су ресуспендоване у 50μl PBS-а и директно убризгане у масно јастуче 4. млечне жлезде. Појава тумора је утврђивана свакодневном палпацијом код сваког миша појединачно. Резултат је приказан као аритметичка средина ± SEM. Статистичка значајност је одређивана Students' T тестом.



**Фигура 2.** Делетија гена за IL-33R успорава раст примарног тумора у мишева. Након појаве палпабилног тумора, пречник тумора је одређиван свакодневним мерењем нонијусом у IL33<sup>-/-</sup> (n=24) и IL33<sup>+/+</sup> (n=24) мишева. Просечна вредност пречника тумора у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева је током мерења била већа али је статистички значајна разлика утврђена 35. дана након инокулације. Резултат је приказан као аритметичка средина ± SEM. Статистичка значајност је одређивана Students' T тестом.

Током периода праћења до 36. дана, код тумора индукованих у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева забележен је тренд знатно бржег туморског раста, али је разлика у пречнику палпабилног тумора утврђена тек 35. дана од инокулације (9,81 ± 0,63 vs. 12,68 ± 0,59 mm) (Students' T тест, p=0,027) (Фигура 2). Мерењем различитих параметара величине тумора (пречник, запремина и маса) и применом Mann Whitney-јевог теста утврдили смо да постоји статистички значајна разлика у величини тумора између IL-33R<sup>-/-</sup> и IL-33R<sup>+/+</sup> мишева, који су жртвовани 36. дана. Након екстирпације, утврђен је већи пречник тумора у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева (16,45 ± 1,34 mm) у односу на IL-33R<sup>-/-</sup> (11,77 ± 1,78 mm) (Mann Whitney-јев тест, p=0,001) (Фигура 3А). Код мишева жртвованих 29. дана није забележена разлика у пречнику тумора између IL-33R<sup>-/-</sup> (10,54 ± 1,10 mm) и IL-33R<sup>+/+</sup> (9,88 ± 1,22 mm) животиња (Mann Whitney-јев тест, p=0,591). Показан је и статистички значајан пораст пречника тумора у групи IL-33R<sup>+/+</sup> мишева од 29. (9,88 ± 1,22 mm) до 36. дана (16,45 ± 1,34 mm) (Mann Whitney-јев тест, p=0,002) (Фигура 3А). У групи IL-33R<sup>-/-</sup> мишева нисмо забележили ову разлику (10,54 ± 1,10 vs. 11,77 ± 1,78 mm) (Mann Whitney-јев тест, p=0,708) (Фигура 3А).

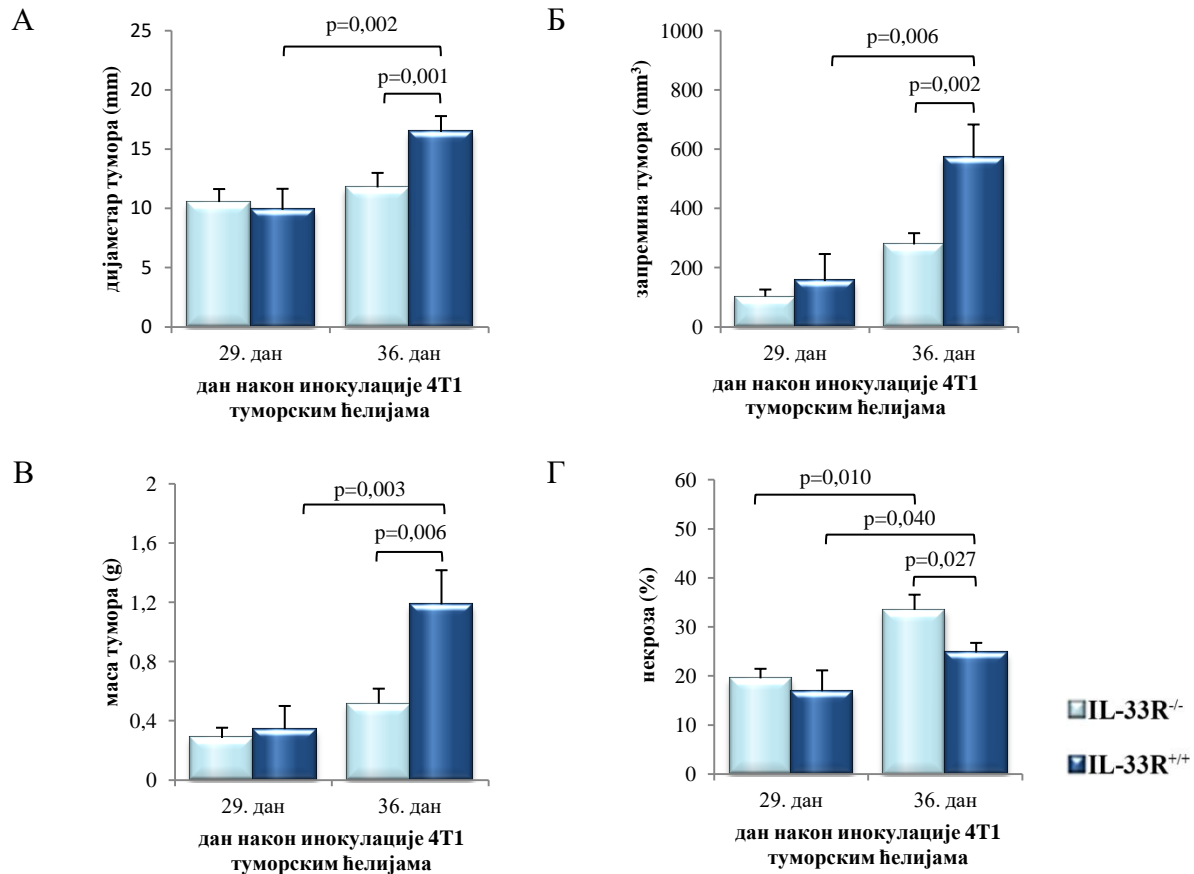
Запремина тумора након екстирпације, 36. дана експеримента, је већа у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева (571,05 ± 112,11 mm<sup>3</sup>) у односу на IL-33R<sup>-/-</sup> (278,30 ± 91,41 mm<sup>3</sup>) (Mann Whitney-јев тест, p=0,002) (Фигура 3Б). Код мишева жртвованих 29. дана није забележена разлика у запремини тумора IL-33R<sup>-/-</sup> (102,68 ± 23,45 mm<sup>3</sup>) и IL-33R<sup>+/+</sup> (154,56 ± 38,13 mm<sup>3</sup>) животиња (Mann Whitney-јев тест, p=0,558). Утврдили смо статистички значајан пораст у запремини примарног тумора у групи IL-33R<sup>+/+</sup> мишева од 29. до 36. дана експеримента (154,56 ± 38,13 vs. 571,05 ± 112,11 mm<sup>3</sup>) (Mann Whitney-јев тест, p=0,006), али не и у групи IL-33R<sup>-/-</sup> мишева (102,68 ± 23,45 vs. 278,30 ± 91,41 mm<sup>3</sup>) (Mann Whitney-јев тест, p=0,096) (Фигура 3Б).

Маса тумора након екстирпације, 36. дана експеримента, је већа у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева (1,19 ± 0,23 g) у односу на IL-33R<sup>-/-</sup> (0,52 ± 0,16 g) (Mann Whitney-јев тест, p=0,006) (Фигура 3В). Код мишева жртвованих 29. дана није забележена разлика у маси тумора IL-33R<sup>-/-</sup> (0,28 ± 0,007 g) и IL-33R<sup>+/+</sup> (0,034 ± 0,10 g) животиња (Mann Whitney-јев тест, p=0,962). Као и код других параметара величине, забележен је статистички значајан пораст у маси примарног тумора у групи IL-33R<sup>+/+</sup> мишева између 29. и 36. дана експеримента (0,34 ± 0,10 vs. 1,19 ± 0,23 g) (Mann Whitney-јев тест, p=0,003), али не и у групи IL-33R<sup>-/-</sup> мишева (0,28 ± 0,007 vs. 0,52 ± 0,16 g) (Mann Whitney-јев тест, p=0,204) (Фигура 3Б).

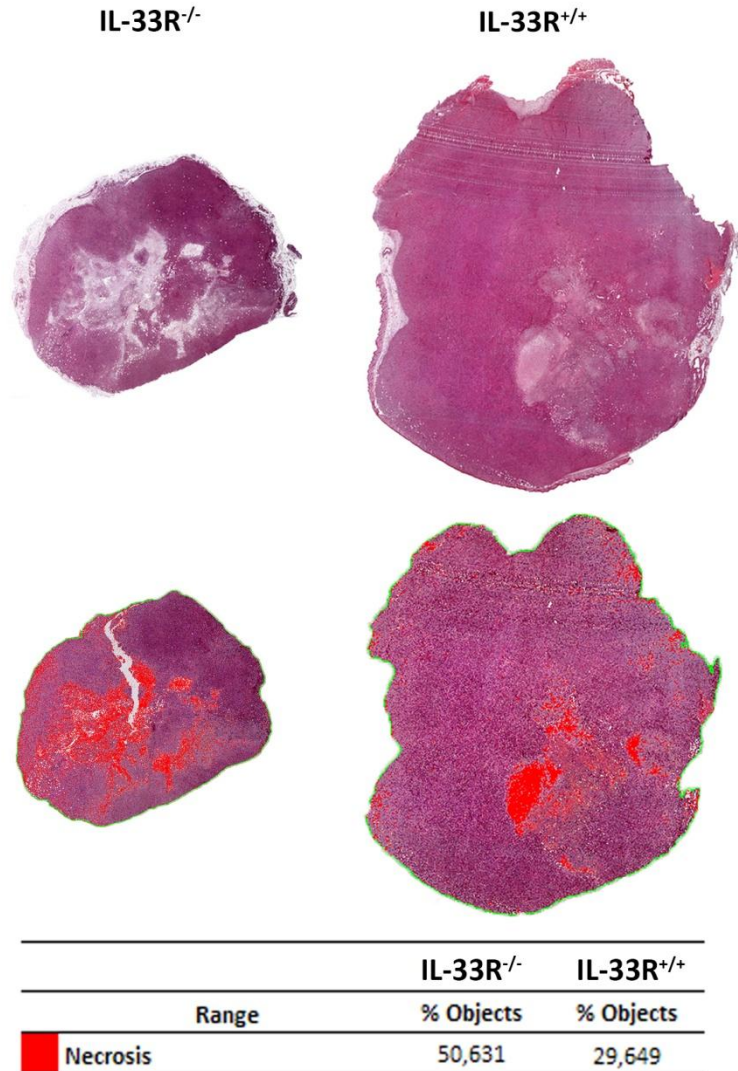
Присуство некрозе у примарном тумору је детектовано микроскопском анализом ткивних пресека примарног тумора, бојених хематоксилин-еозин методом, након жртвовања животиња 29. и 36. дана експеримента. Насупрот споријем расту примарних тумора у IL-33R<sup>-/-</sup> мишева, забележили смо веће поље некрозе у туморском ткиву (Фигура 3, Слика 4).

Применом Mann Whitney-јевог теста утврдили смо да постоји статистички значајна разлика у средњој вредности процентуалне заступљености некрозе у тумору, између IL-33R<sup>-/-</sup> (33,49 ± 1,96%) и IL-33R<sup>+/+</sup> мишева (24,81 ± 3,10%) (Mann Whitney-јев тест, p=0,027), жртвованих 36. али не и 29. дана (19,54 ± 4,26 ± 1,95 vs. 16,91%) (Mann Whitney-јев тест, p=0,579) (Фигура 3Г). Такође, утврдили смо статистички значајну разлику у некрози у групи IL-33R<sup>-/-</sup> између мишева који су жртвовани 29. дана (19,54 ± 4,26%) и 36. дана (33,49 ± 1,96%) (Mann Whitney-јев тест, p=0,010) (Фигура 3Г). Иста статистички значајна разлика је примећена и у групи IL-33R<sup>+/+</sup> мишева који су жртвовани 29. дана (16,91 ± 1,95%) и 36. дана (24,81 ± 3,10%) (Mann Whitney-јев тест, p=0,040) (Фигура 3Г). Међутим, разлика

између средњих вредности у процентуалној заступљености некрозе у туморском ткиву је била знатно већа у групи IL-33R<sup>-/-</sup> (13,95%) у односу на групу IL-33R<sup>+/+</sup> мишева (7,9%) (Фигура 3Г). Спорији раст тумора у IL-33R<sup>-/-</sup> мишева је праћен значајно већим степеном туморске некрозе у односу на туморе индуковане у IL-33R<sup>+/+</sup> животиња.

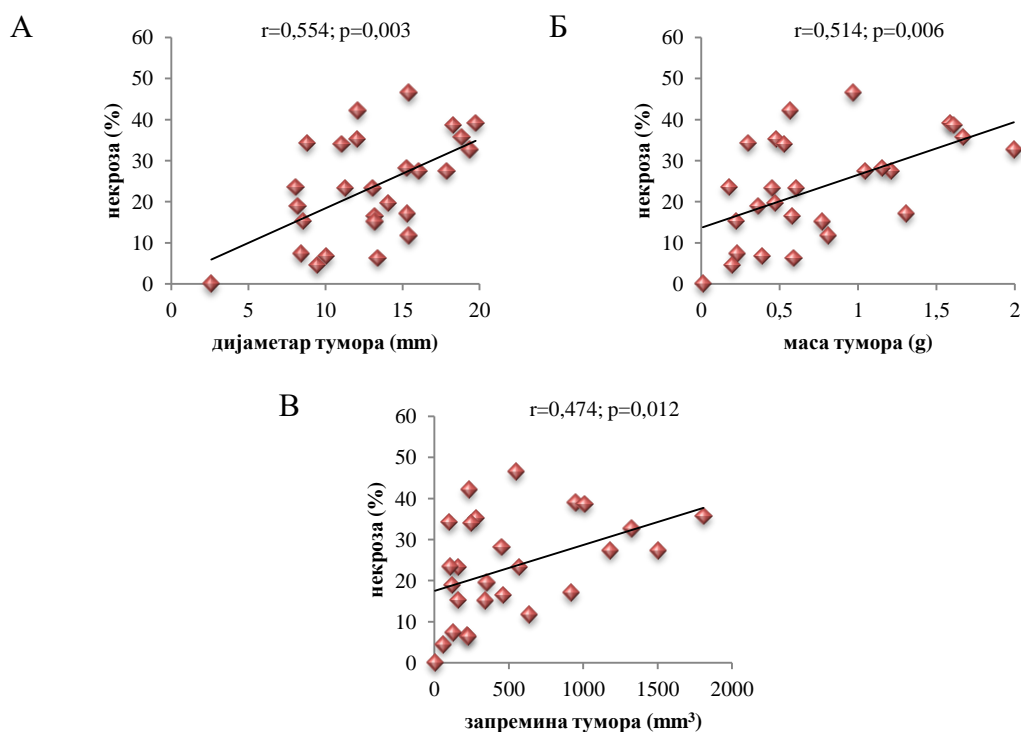


**Фигура 3.** IL-33<sup>-/-</sup> (n=24) и IL-33R<sup>+/+</sup> (n=24) мишеви су жртвовани 29. и 36. дана након инокулације тумора. **А-В.** Делеција гена за IL-33R успорава раст примарног тумора. Након екстирпације тумора, нонијусом је мерен највећи пречник тумора. Запремина тумора је одређивана применом формуле  $L \times W^2/2$ , где L представља највећи а W најмањи пречник тумора. Маса тумора је одређивана применом аналитичке ваге. **Г.** Делеција гена за IL-33R појачава некрозу у 4T1 индукованом тумору дојке. Некроза туморског ткива је анализирана применом софтвера Image Pro Plus (Image Pro Plus v.6.0.0.206, Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA) и квантификована као процентуални удео, у односу на целокупни пресек туморског ткива. Резултат је приказан као аритметичка средина ± SEM. Статистичка значајност је одређивана Mann Whitney-јевим тестом.



**Слика 4:** Одсуство гена за IL-33R је праћен мањим примарним тумором уз значајно повећање туморске некрозе. IL-33<sup>-/-</sup> (n=24) и IL-33R<sup>+/+</sup> (n=24) мишеви су жртвовани 29. и 36. дана након инокулације. Ткивни пресеци индукованих тумора дојке бојених Н&Е су фотографисани појединачним фотографијама у маниру „црва“ применом микроскопског увећања x200. На основу начињених фотографија, применом софтверског пакета Adobe Photoshop CS6, за сваки тумор посебно генерисан је мозаик. Фотографије добијене на овај начин представљале су целокупни пресек туморског ткива који је даље анализиран применом софтверског пакета Image Pro Plus (v. 6.0.0.206). У првом кораку одређивана је регија од интереса (ROI), тј туморско ткиво у односу на позадину. Некроза у примарном карциному дојке (црвени пиксели) је квантификована одабиром нијанси боја које одговарају ткиву захваћеном некрозом и приказана као процентуална вредност у односу на укупну површину туморског ткива (ROI).

Даљом статистичком анализом испитали смо повезаност између параметара величине тумора и процента некрозом захваћеног туморског ткива. Прво смо испитали повезаност некрозе и дијаметра тумора на целокупном узорку (у IL-33R<sup>-/-</sup> и IL-33R<sup>+/+</sup> мишева жртвованих 29. и 36. дана експеримента). Применом Spearman-овог коефицијента корелације утврдили смо јаку позитивну корелацију између пречника тумора и процента некрозе у карциномима дојке (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=0,554$ ;  $p=0,003$ ) (Фигура 4А).



**Фигура 4.** IL-33<sup>-/-</sup> (n=24) и IL-33R<sup>+/+</sup> (n=24) мишеви су жртвовани 29. и 36. дана након инокулације. Анализирана је повезаност некрозе са величином тумора на целом узорку (n=48). **А.-В. Некроза корелира са величином тумора у 4Т1 индукованом тумору дојке.** Након жртвовања и екстирпације тумора, нонијусом је мерен највећи пречник тумора. Маса тумора је одређивана применом аналитичке ваге а запремина применом формуле  $L \times W^2/2$ , где L представља највећи а W најмањи пречник тумора. Некроза туморског ткива је анализирана применом софтвера Image Pro Plus (Image Pro Plus v.6.0.0.206, Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA) и квантификована као процентуални удео, у односу на целокупни пресек туморског ткива. Статистичка значајност је одређивана применом Spearman-овог коефицијента корелације.

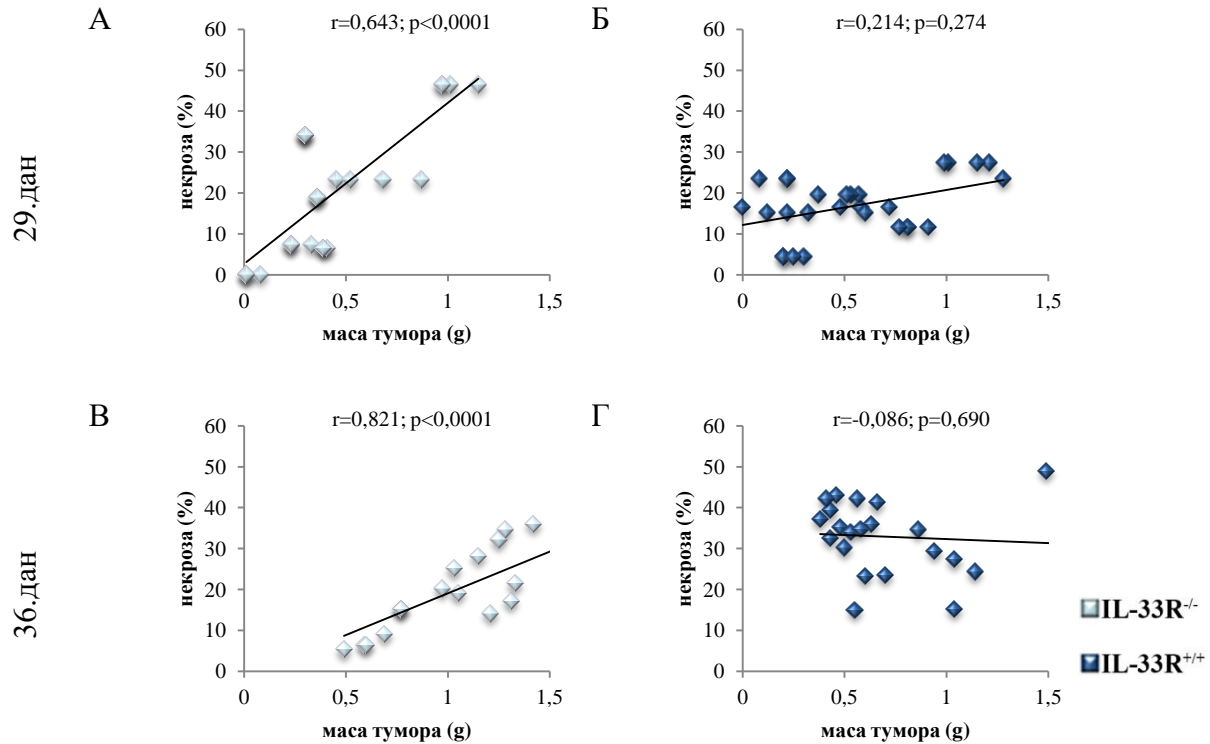
Анализа повезаности величине некрозе и масе тумора је показала јаку позитивну корелацију (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=0,514$ ;  $p=0,006$ ) (Фигура 4Б). Такође, применом Spearman-овог коефицијента корелације доказали смо и јаку позитивну корелацију између запремине тумора и некрозе (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=0,474$ ;  $p=0,012$ ) (Фигура 4В). Након што смо утврдили природу повезаности између величине тумора и некрозе, желели смо да испитамо природу ове везе у различитим групама мишева, жртвованих 29. и 36. дана експеримента. Као најобјективнији параметар величине тумора анализирали смо масу тумора.

Применом Spearman-овог коефицијента корелације утврдили смо статистички значајну, јаку, позитивну корелацију између испитиваних параметара у групи IL-33R<sup>-/-</sup> мишева, жртвованих 29. дана експеримента (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=0,643$ ;  $p<0,0001$ ) (Фигура 5А). У IL-33R<sup>+/+</sup> групи мишева ова повезаност није била статистички значајна (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=0,214$ ;  $p=0,274$ ) (Фигура 5Б).

Исту статистику применили смо и на мишеве који су жртвовани 36. дана експеримента. Испитујући природу везе између масе тумора и некрозе, применом Spearman-овог коефицијента корелације утврдили смо статистички значајну, јаку позитивну корелацију у групи IL-33R<sup>-/-</sup> (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=0,821$ ;  $p<0,0001$ ) (Фигура 5В) мишева али не и у групи IL-33R<sup>+/+</sup> мишева (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=-0,086$ ;  $p=0,690$ ) (Фигура 5Г). Идентични резултати су добијени и анализом односа осталих параметара величине примарног тумора (највећи пречник и запремина) и некрозе. Подаци нису приказани.



Утицај сигналног пута IL-33/IL-33R на развој некрозе код карцинома дојке



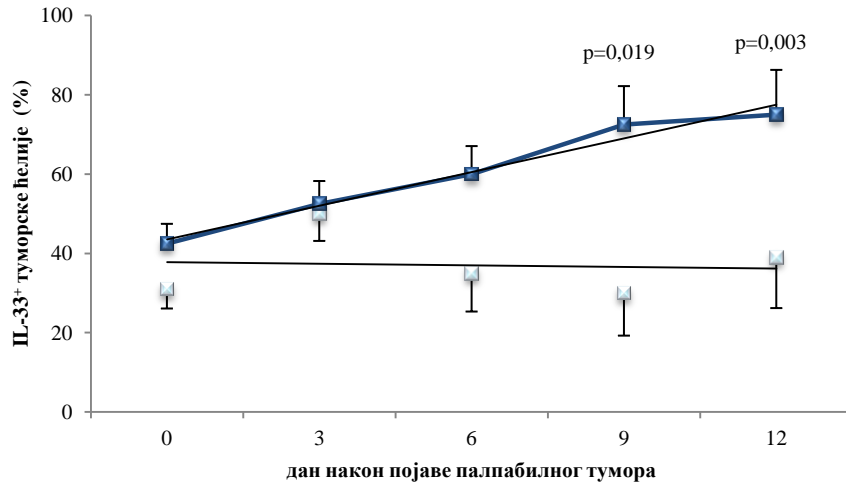
**Фигура 5.** IL-33<sup>-/-</sup> (n=24) и IL-33R<sup>+/+</sup> (n=24) мишеви су жртвовани 29. и 36. дана након инокуације. А.-Г. Величина тумора је у позитивној корелацији са некрозом у примарном 4Т1 тумору дојке у IL-33R<sup>-/-</sup> али не и у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева. Након жртвовања и екстирпације тумора, маса је одређивана применом аналитичке ваге. Некроза туморског ткива је анализирана применом софтвера Image Pro Plus (Image Pro Plus v.6.0.0.206, Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA) и квантификована као процентуални удео, у односу на целокупни пресек туморског ткива. Статистичка значајност је одређивана применом *Spearman*-овог коефицијента корелације.

## 4.2. Експресија IL-33 у туморским ћелијама је у позитивној корелацији са величином 4T1 тумора дојке у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева

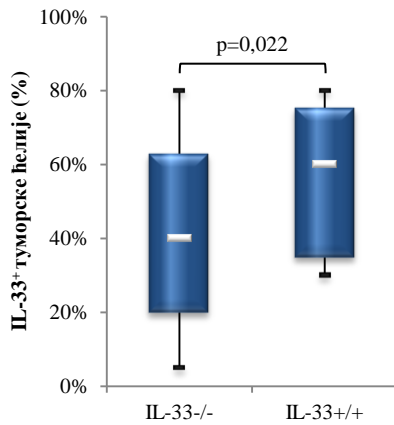
У циљу праћења динамике експресије IL-33 у туморском ткиву кроз време IL-33R<sup>+/+</sup> и IL-33R<sup>-/-</sup> мишева, мишеви су жртвовани сваког трећег дана након појаве палпабилног тумора. Експресија IL-33 је одређивана имунохистохемијским бојењем ткивних пресека смрзнутог туморског ткива. Експресија IL-33 показује временски зависно повећање у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева и значајно јачу експресију у односу на туморе IL-33R<sup>-/-</sup> животиња (Students' T тест,  $p=0,019$ ;  $p=0,003$ ). Насупрот овоме, у IL-33R<sup>-/-</sup> мишева нисмо забележили повећање експресије IL-33 током периода праћења од 12 дана, што је указало на механизам позитивне повратне спреге осовине IL-33/IL-33R (Фигура 6А). Поред овога, експресија IL-33 у туморским ћелијама је била значајно већа код IL-33R<sup>+/+</sup> мишева [60% (35; 75)] у односу на IL-33R<sup>-/-</sup> [40% (20; 62,5)] (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,022$ ) (Фигура 6Б, Слика 5). Желели смо да знамо након ког дана од појаве палпабилног тумора настаје значајна разлика у имунохистохемијској експресији IL-33 у туморским ћелијама 4T1 код IL-33R<sup>+/+</sup> мишева, у односу на IL-33R<sup>-/-</sup> мишеве. Формирали смо две групе које су укључивале мишеве жртвоване до седмог и од осмог дана по појави палпабилног тумора. Утврдили смо статистички значајну разлику између ове две групе мишева [45% (20; 70) vs 75% (65; 85)] (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,001$ ) (Фигура 6В).

Имунохистохемијском анализом смо показали да у групи IL-33R<sup>+/+</sup> мишева постоји јака позитивна корелација између величине тумора (пречник, запремина, маса) и експресије IL-33. Применом Spearman-овог коефицијента корелације утврдили смо средње јаку, позитивну корелацију између масе тумора и експресије IL-33 у туморским ћелијама 4T1 индукованог тумора дојке (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=0,462$ ;  $p=0,023$ ) (Фигура 7А). Идентични резултати су добијени и анализом повезаности експресије IL-33 и других параметара величине тумора (највећи пречник и запремина). Подаци нису приказани. Корелација није нађена у групи IL-33R<sup>-/-</sup> мишева (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=0,108$ ;  $p=0,599$ ) (Фигура 7Б).

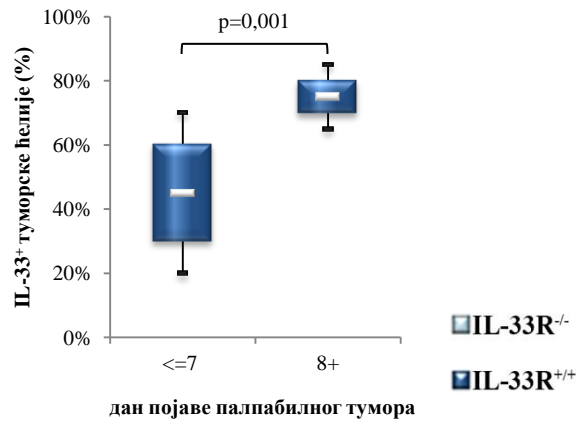
A



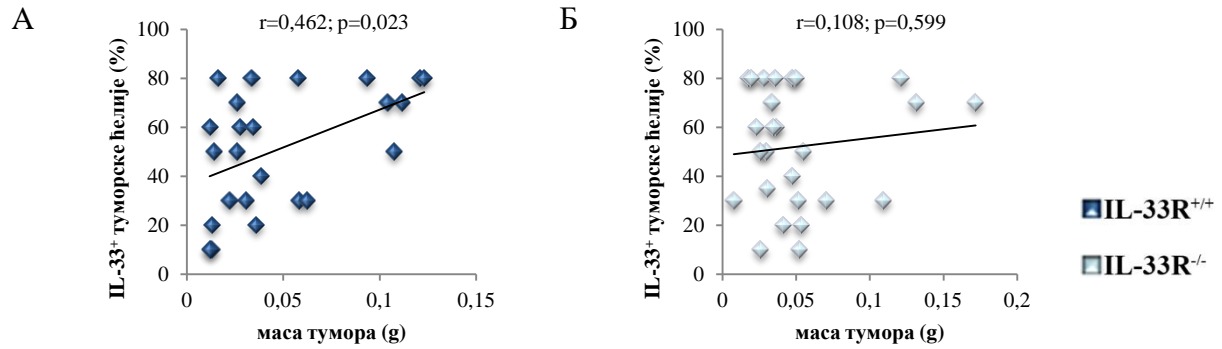
Б



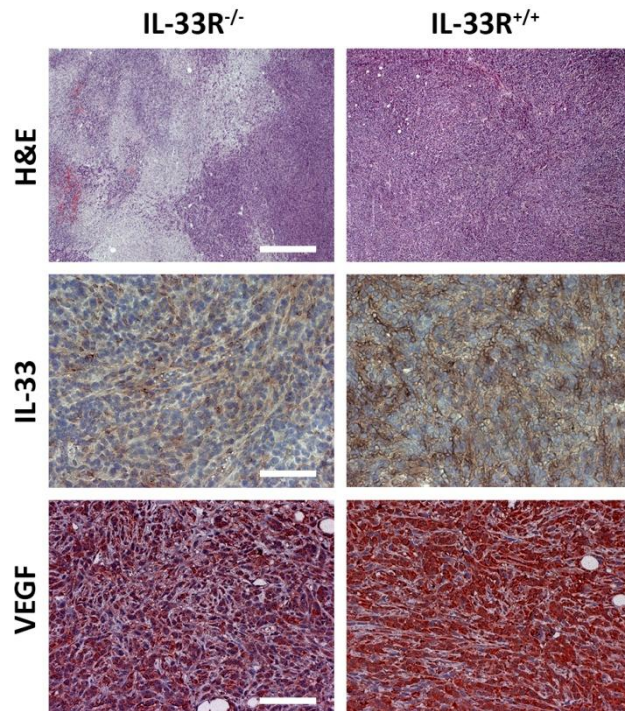
В



**Фигура 6.** Експресија IL-33 у туморском ткиву је анализирана у групама IL-33R<sup>+/+</sup> (n=30) и IL-33R<sup>-/-</sup> мишева (n=30), тако што су мишеви жртвовани на дан појаве палпабилног тумора а затим сваког трећег дана, током периода праћења од 12 дана. **А-В.** Експресија IL-33 у туморским ћелијама се повећава са растом тумора у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева и већа је у односу на IL-33R<sup>-/-</sup> мишеве. Имунохистохемијски, на ткивним пресецима туморског ткива је одређивана експресија IL-33 и квантификована као проценат позитивних у односу на укупан број евакуираних туморских ћелија. Резултат је приказан као аритметичка средина ± SEM или медијана (1. квантил; 3. квантил). Статистичка значајност је одређивана применом Students' T и Mann Whitney-јевог теста, у зависности од нормалности расподеле података.



**Фигура 7.** Експресија IL-33 у туморском ткиву је анализирана у групама IL-33R<sup>+/+</sup> (n=30) и IL-33R<sup>-/-</sup> мишева (n=30), тако што су мишеви жртвовани на дан појаве палпабилног тумора а затим сваког трећег дана, током периода праћења од 12 дана. **А.** Експресија IL-33 у туморским ћелијама 4T1 тумора дојке позитивно корелира са величином тумора, у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева. Након жртвовања и екстирпације, маса тумора је одређивана применом аналитичке ваге. Експресија IL-33 је процењивана имунохистохемијском методом, на ткивним пресецима туморског ткива и квантификована као проценат позитивних у односу на укупан број еваулираних туморских ћелија. **Б.** Величина тумора није у корелацији са експресијом IL-33 у ћелијама 4T1 тумора дојке, у IL-33R<sup>-/-</sup> мишева. Статистичка значајност је одређивана применом *Spearman*-овог коефицијента корелације.



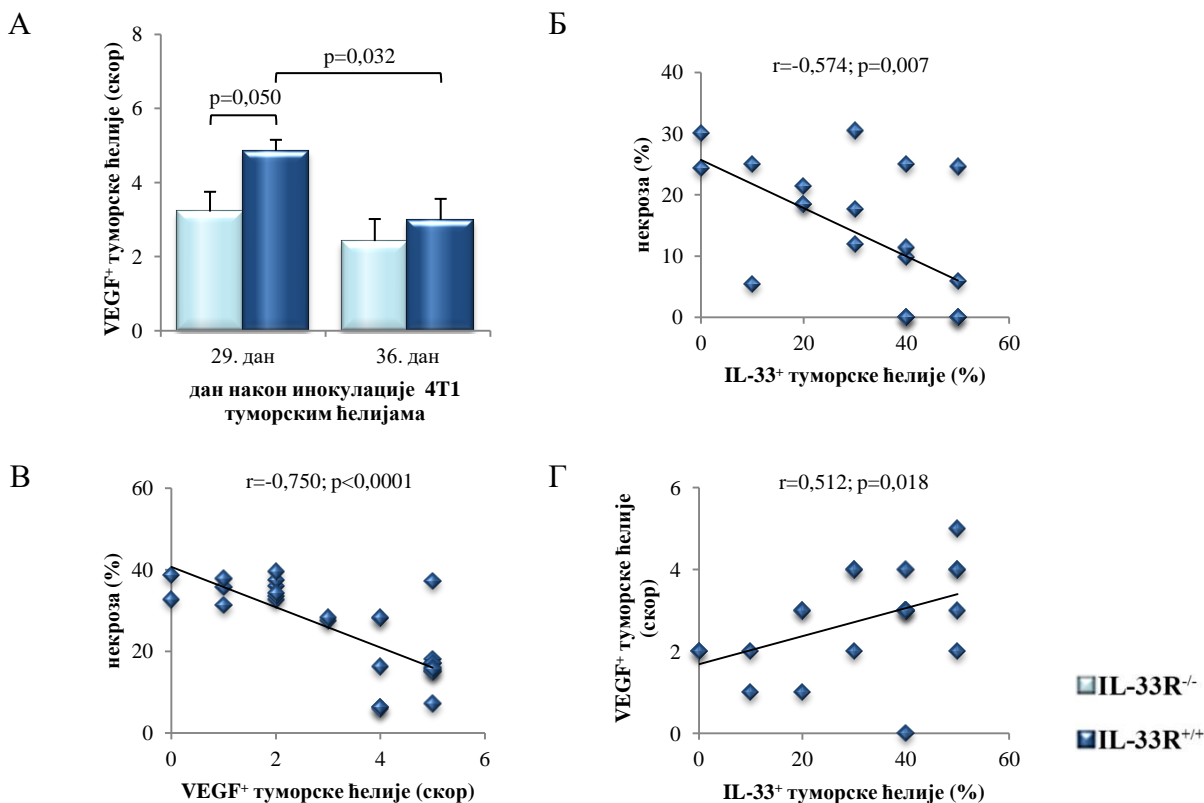
Слика 5. Експресија IL-33 и VEGF-а у туморским ћелијама 4Т1 индукованог карцинома дојке у IL-33R<sup>-/-</sup> и IL-33R<sup>+/+</sup> мишева. Некроза туморског ткива је анализирана применом софтвера Image Pro Plus (Image Pro Plus v.6.0.0.206, Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA) и квантификована као процентуални удео, у односу на целокупни пресек туморског ткива. Микроскопском анализом H&E бојених препарата (**горњи панел**) уочава се већи степен некрозе у туморима индукованим у IL-33R<sup>-/-</sup> мишева (оригинално увећање x100, референта линија 200 $\mu$ m). Експресија IL-33 је квантификована у туморским ћелијама и приказивана као проценат позитивних у односу на укупан број евакуираних ћелија. Цитоплазматско бојење VEGF-а је скоровано у интервалу од 0 до 5: 0=одсуство цитоплазматског бојења; 1= $\leq$ 1% позитивних ћелија; 2=1–10% позитивних ћелија; 3=10–50% позитивних ћелија; 4=50-90% позитивних ћелија и 5  $\geq$  90% позитивних ћелија. Процентуална заступљеност туморских ћелија позитивних на IL-33 (**средњи панел**) и VEGF (**доњи панел**) је знатно већи у туморима IL-33R<sup>+/+</sup> мишева (оригинално увећање x200, референта линија 100 $\mu$ m).

### 4.3. Експресија IL-33 и VEGF-а је у негативној корелацији са туморском некрозом

У наставку истраживања анализирали смо експресију VEGF-а у туморском ткиву. Експресија VEGF-а је процењивана на основу критеријума за скоровање који су предложили *Rydén* и сарадници (710) за интерпретацију овог белега у инвазивном карциному дојке. Очитавано је искључиво цитоплазматско бојење туморских ћелија и имунохистохемијски скор је одређиван на основу процента туморских ћелија које су биле позитивне на VEGF. Скала за оцењивање експресије се кретала у опсегу од 0 до 5: 0=одсуство имунохистохемијске реакције; 1= $\leq$ 1% позитивних ћелија; 2=1–10% позитивних ћелија; 3=10–50% позитивних ћелија; 4=50-90% позитивних ћелија и 5  $\geq$  90% позитивних ћелија.

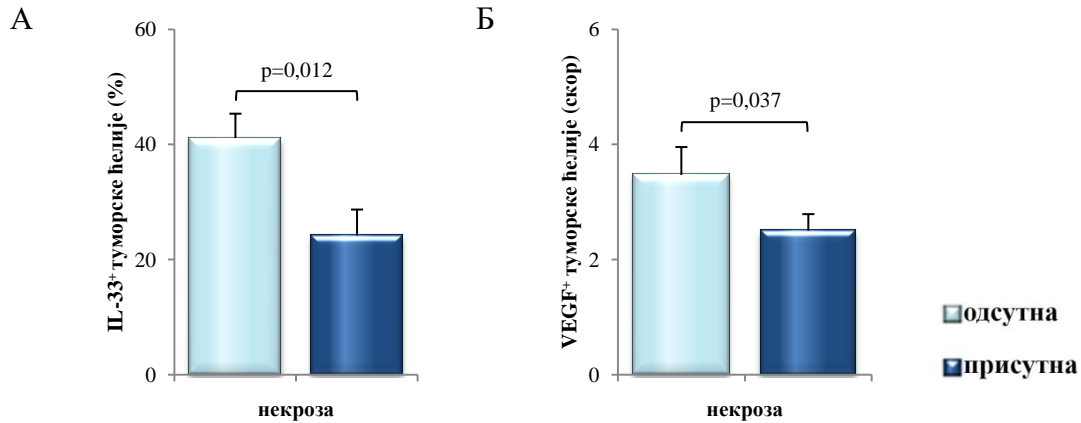
Делеција гена за IL-33R смањује експресију VEGF-а у туморским ћелијама. Експресија VEGF-а је статистички значајно већа у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева (4,86  $\pm$  0,60) у поређењу са IL-33R<sup>-/-</sup> (3,21 $\pm$ 0,53) а разлика постаје статистички значајна 29. дана након инокулације (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,050$ ) (Фигура 8А, Слика 5). У групи IL-33R<sup>+/+</sup> мишева се смањује кроз време, па је просечна вредност VEGF скорa била статистички значајно мања код мишева жртвованих 36. дана (2,99  $\pm$  0,57) у односу на 29. дан (4,86  $\pm$  0,60) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,032$ ). Овај тренд није забележен код IL-33R<sup>-/-</sup> мишева (Фигура 8А).

Када смо упоредили експресију IL-33 и поље некрозе у примарном тумору дојке, показали смо да је експресија IL-33 у негативној корелацији са туморском некрозом, 36. дана након инокулације тумора, у IL-33R<sup>+/+</sup> животиња (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=-0,574$ ;  $p=0,007$ ) (Фигура 8Б), док у групи IL-33R<sup>-/-</sup> мишева нисмо нашли корелацију ових параметара (резултати нису приказани). У складу са овим податком, VEGF скор је такође у негативној корелацији са туморском некрозом 36. дана након инокулације тумора у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=-0,750$ ;  $p<0,0001$ ) (Фигура 8В). Овај феномен није потврђен у групи IL-33R<sup>-/-</sup> мишева (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=0,348$ ;  $p=0,096$ ). Коначно, експресија IL-33 је у позитивној корелацији са VEGF скором у туморским ћелијама у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=0,512$ ;  $p=0,018$ ) (Фигура 8Г).



**Фигура 8.** IL-33<sup>-/-</sup> (n=24) и IL-33R<sup>+/+</sup> (n=24) мишеви су жртвовани 29. и 36. дана након инокуације. **А.** Експресија VEGF-а у туморским ћелијама 4Т1 карцинома дојке је значајно мања у IL-33R<sup>-/-</sup> мишева. Цитоплазматско бојење VEGF-а је скоровано у интервалу од 0 до 5: 0=одсуство цитоплазматског бојења; 1= $\leq$ 1% позитивних ћелија; 2=1–10% позитивних ћелија; 3=10–50% позитивних ћелија; 4=50–90% позитивних ћелија и 5  $\geq$  90% позитивних ћелија. Резултат је приказан као аритметичка средина  $\pm$  SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста. **Б и В.** Некроза је негативно повезана са експресијом проангиогених IL-33 и VEGF-а у туморским ћелијама IL-33R<sup>+/+</sup> мишева. Некроза је анализирана применом софтвера Image Pro Plus (Image Pro Plus v.6.0.0.206, Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA) и очитавана као проценат некротичног туморског ткива у односу на целокупни пресек туморског ткива. Експресија IL-33 је квантификована у туморским ћелијама и приказивана као проценат позитивних у односу на укупан број еваулираних ћелија. **Г.** Позитивна корелација IL-33 и VEGF-а у туморским ћелијама IL-33R<sup>+/+</sup> мишева. Статистичка значајност је анализирана применом Spearman-овог коефицијента корелације.

IL-33R<sup>+/+</sup> мишеве смо поделили на две групе: без и са детектованим некротичним пољима у туморском ткиву и анализирали смо експресију IL-33 и VEGF-а. Експресија IL-33 била је значајно већа у туморима без некротичних поља ( $41,11 \pm 4,23$  vs.  $24,17 \pm 4,52\%$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,012$ ) (Фигура 9А). И експресија VEGF-а је била значајно већа у туморима без детектабилне некрозе ( $3,47 \pm 0,48$  vs.  $2,50 \pm 0,29$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,037$ ) (Фигура 9Б).



**Фигура 9.** Након екстирпације и микроскопске анализе ткивних пресека туморског ткива узетог од IL-33R<sup>+/+</sup> мишева, тумори су подељени на групу са и без детектоване некрозе. **А. Већа експресија IL-33 у туморском ткиву без детектабилне некрозе IL-33R<sup>+/+</sup> мишева.** Експресија IL-33 је квантификована у туморским ћелијама и приказивана као проценат позитивних у односу на укупан број евауираних ћелија. **Б. Већа експресија VEGF-а у туморском ткиву без детектабилне некрозе у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева.** Цитоплазматско бојење VEGF-а је скоровано у интервалу од 0 до 5: 0=одсуство цитоплазматског бојења; 1= $\leq$ 1% позитивних ћелија; 2=1–10% позитивних ћелија; 3=10–50% позитивних ћелија; 4=50–90% позитивних ћелија и 5  $\geq$  90% позитивних ћелија. Приказане вредности су аритметичке средине  $\pm$  SEM, из два експеримента, са најмање 12 животиња по групи. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.



#### 4.4. Експресија IL33, IL-33R и VEGF-а је у негативној корелацији са некрозом у хуманом карциному дојке

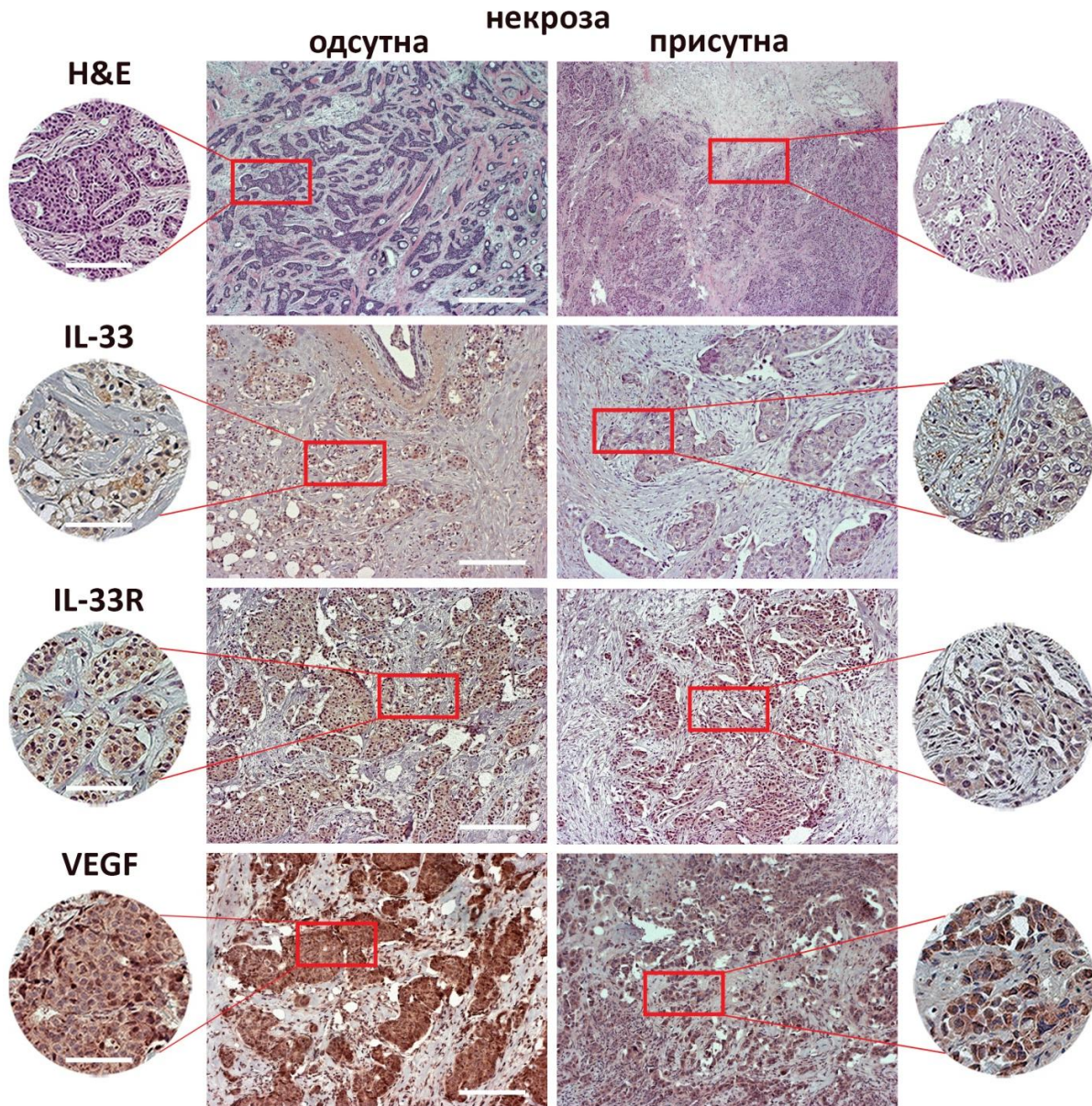
Са циљем утврђивања релевантности експерименталних података добијених на мишевима проучавали смо експресију IL-33, IL-33R, VEGF-а и MVD у туморским ћелијама 40 пацијенткиња код којих је дијагностикован инвазивни дуктални карцином дојке. Клиничкопатолошке карактеристике пацијенткиња су приказане у табели 15.

Како бисмо испитали разлику у експресији IL-33, IL-33R и VEGF-а у зависности од некрозе све пацијенткиње смо поделили на две групе у зависности од присуства (n=20) или одсуства (n=20) некротичних поља у ткиву карцинома дојке (712) (Слика 6). Између испитиваних група није било разлике у старости, величини и стадијуму тумора према АЈСС класификацији (Табела 15).

Анализирали смо експресију IL-33, IL-33R и VEGF у туморским ћелијама карцинома дојке у ове две групе пацијената. Репрезентативне слике имунохистохемијског бојења ткивних пресека карцинома дојке за ове маркере су приказане на слици 3.

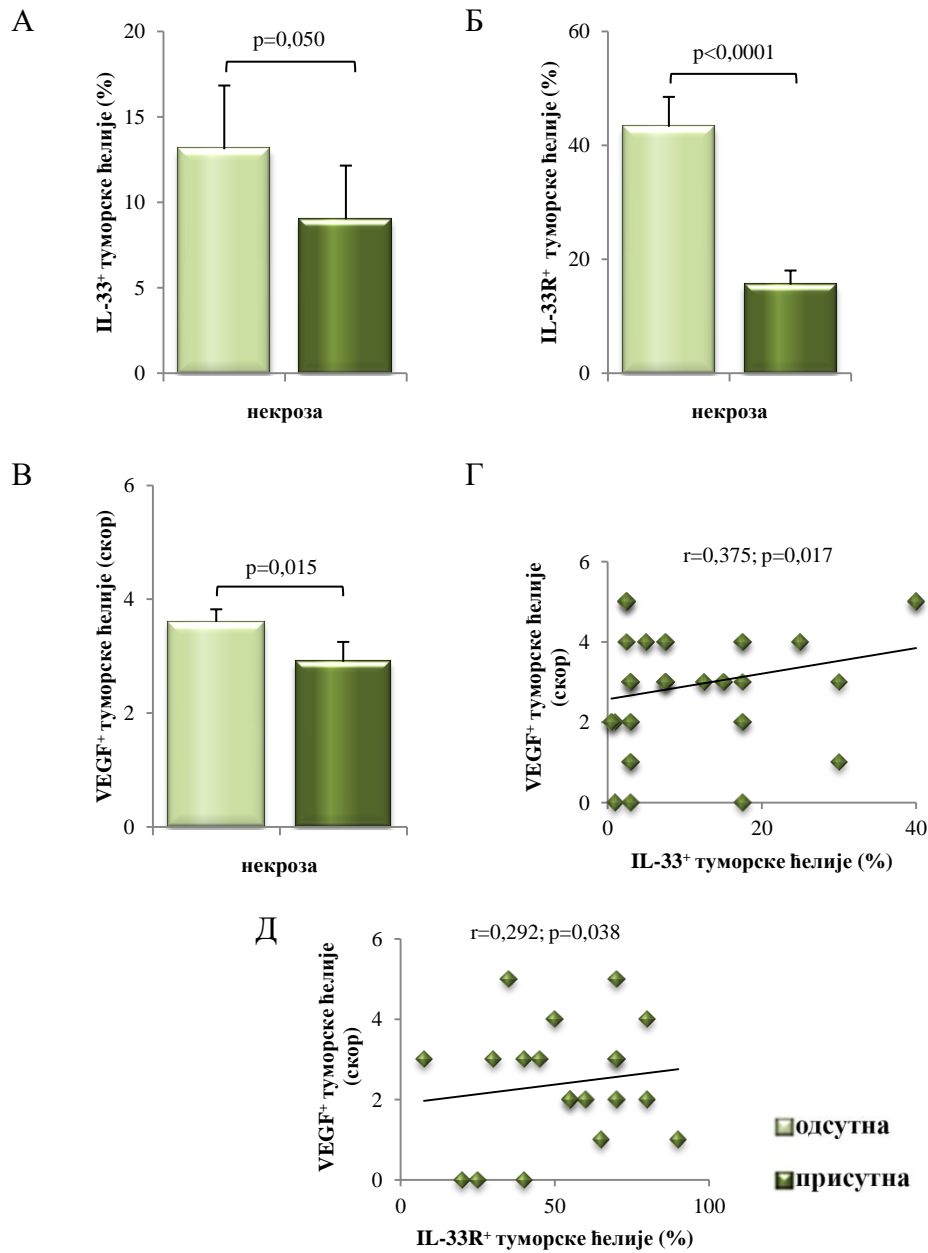
| ВАРИЈАБЛА   | Некроза     |             | p          |        |
|---|-------------|-------------|------------|--------|
|   | ОДСУТНА     | ПРИСУТНА    |            |        |
| <b>Анализирани тумори</b>                                 | 20 (50,0%)  | 20 (50,0%)  |            |        |
| <b>Старост</b>  | 56,7 ± 2,23 | 58,1 ± 2,56 | 0,704**    |        |
| <b>Дијаметар тумора</b>                                   | 27,7 ± 1,71 | 36,3 ± 3,07 | 0,126**    |        |
| <b>Клинички стадијум (АЈСС)</b>                           | <i>I+II</i> | 14 (58,3%)  | 10 (41,7%) | 0,333* |
|   | <i>III</i>  | 6 (37,5%)   | 10 (62,5%) |        |
| $\chi^2$ <i>тест</i> *<br><i>Mann Whitney-јев тест</i> ** |             |             |            |        |

**Табела 15.** Клиничкопатолошке карактеристике испитаника. Студија обухвата 40 пацијенткиња са инвазивним дукталним карциномом дојке, које су категорисане у групу без (n=20) и са (n=20) детектованом некрозом у туморском ткиву. Статистичка значајност је тестирана  $\chi^2$  и *Mann Whitney-јевим тестом*.



**Слика 6. Разлика у експресији IL-33, IL-33R и VEGF-а у зависности од присуства некротичних поља у ткиву карцинома дојке.** Испитаници су подељени на две групе у зависности од присуства (n=20) или одсуства (n=20) некротичних поља у ткиву карцинома дојке. Имунохистохемијска експресија IL-33 и IL-33R је независно квантификована у туморским и стромалним ћелијама и приказивана као проценат позитивних у односу на укупан број евалуираних ћелија. Цитоплазматско бојење VEGF-а је скоровано у интервалу од 0 до 5: 0=одсуство цитоплазматског бојења; 1= $\leq$ 1% позитивних ћелија; 2=1–10% позитивних ћелија; 3=10–50% позитивних ћелија; 4=50–90% позитивних ћелија и 5  $\geq$  90% позитивних ћелија. Репрезентативне микрофотографије ткивних пресека хуманог карцинома дојке, бојених стандардном H&E методом. Пацијенти су класификовани у две групе у зависности од присуства (n=20) или одсуства (n=20) некротичних поља (оригинално увећање x100, референтна линија 200 $\mu$ m; оригинално увећање x200, референтна линија 100 $\mu$ m) (**горњи панел**). Процент туморских ћелија позитивних на IL-33 (**горњи-средњи панел**), IL-33R (**доњи-средњи панел**) и VEGF (**доњи панел**) као и интензитет бојења је значајно већи у карциномима дојке у којима није детектована некроза (оригинално увећање x100, референтна линија 200 $\mu$ m; оригинално увећање x200, референтна линија 100 $\mu$ m).

Утицај сигналног пута IL-33/IL-33R на развој некрозе код карцинома дојке

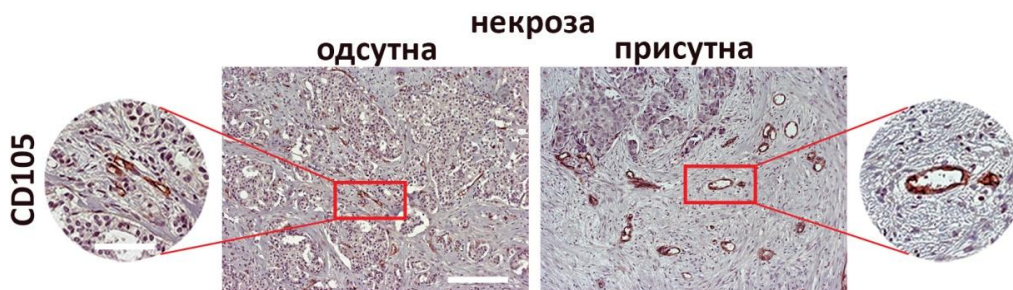


**Фигура 10.** Испитанице су подељене на две групе у зависности од присуства ( $n=20$ ) или одсуства ( $n=20$ ) некротичних поља у ткиву карцинома дојке. **А.-В.** Експресија IL-33, IL-33R и VEGF-а значајно је мања у туморским ћелијама хуманог карцинома дојке са детектованом некрозом. Имунохистохемијска експресија IL-33 и IL-33R је квантификована у туморским ћелијама и приказивана као проценат позитивних у односу на укупан број еваулираних ћелија. Цитоплазматско бојење VEGF-а је скоровано у интервалу од 0 до 5: 0=одсуство цитоплазматског бојења; 1= $\leq 1\%$  позитивних ћелија; 2=1–10% позитивних ћелија; 3=10–50% позитивних ћелија; 4=50-90% позитивних ћелија и 5  $\geq 90\%$  позитивних ћелија. Резултат је приказан као аритметичка средина  $\pm$  SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста. **Г, Д.** Експресија VEGF-а је у позитивној корелацији са експресијом IL-33 и IL-33R у туморским ћелијама хуманог карцинома дојке. Статистичка значајност је анализирана применом Spearman-овог коефицијента корелације.

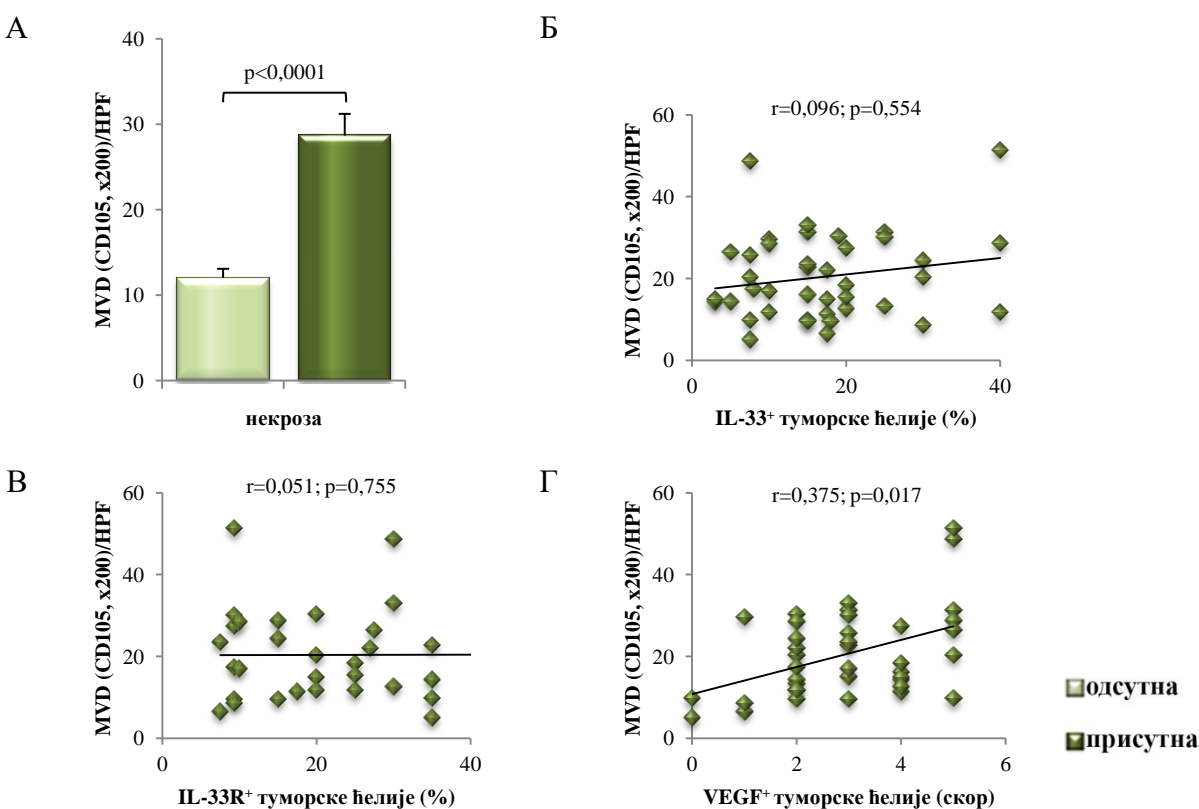
Применом Student-овог t теста утврдили смо да постоји статистички значајна разлика у експресији IL-33 и IL-33R у туморским ћелијама карцинома дојке у којима је детектована некроза. Средња вредност експресије IL-33 је била већа у групи тумора без некрозе ( $13,11 \pm 3,73\%$ ) у односу на групу тумора са некрозом ( $9,02 \pm 3,15\%$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,050$ ) (Фигура 10А, Слика 6). Такође, експресија IL-33R је била већа у истој групи тумора ( $43,25 \pm 5,24$  vs.  $15,55 \pm 2,47\%$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p<0,0001$ ) (Фигура 10Б, Слика 6). Слично томе, експресија VEGF-а у туморским ћелијама је била мања у туморима у којима је детектована некроза ( $3,61 \pm 0,22$  vs.  $2,88 \pm 0,35$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,015$ ) (Фигура 10В, Слика 6). Анализом односа експресије истих маркера (Spearman-овим коефицијентом корелације) утврдили смо позитивну корелацију имунохистохемијске експресије IL-33 (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=0,375$ ;  $p=0,017$ ), односно IL-33R (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=0,292$ ;  $p=0,038$ ) са експресијом VEGF-а у туморским ћелијама карцинома дојке (Фигура 10Г и Д).

#### **4.5. VEGF је у позитивној корелацији са MVD у перинекротичном рубу хуманог карцинома дојке**

Микроваскуларна густина (MVD) је анализирана имунохистохемијском методом, применом анти-CD105 антитела и употребом светлосног микроскопа (Axioskop 40, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany) (Слика 7). Појединачне ендотелне ћелије или кластери позитивни на CD105 детектовани су као крвни судови. Присуство крвних ћелија или фибрина без ендотелних ћелија није детектовано као микроваскуларни елемент као ни крвни судови са мишићним зидом. Сви ткивни исечци су првобитно анализирани на микроскопским увељачањима  $\times 40$  и  $\times 100$ . На овај начин су одређивана три „жаришта“ (енгл. „*hot spots*“) тј. поља са највећом микроваскуларном густином, а затим су ова поља фотографисана на  $\times 200$  увељачању применом дигиталне камере (AxioCam ICc1, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany). Независно, два истраживача су применом софтвера (AxioVision v.4.8.2.0, Carl Zeiss Microscopy GmbH, München, Germany) спровела анализу генерисаних фотографија и утврдили број микроваскуларних структура у претходно одабрана три „жаришта“. MVD (микроваскуларне структуре/HPF) је израчунавана према критеријумима које су поставили Weidner и сарадници (711) тј. као средња вредност појединачних MVD у три одабрана микроскопска фокуса.



Слика 7. Имунохистохемијска процена MVD. MVD је израчунавана као средња вредност појединачних MVD у три одабрана микроскопска фокуса. У туморима са присутном некрозом детектован је већи број новонасталих крвних судова (оригинално увећање  $\times 100$ , референтна линија  $200\mu\text{m}$ ; оригинално увећање  $\times 200$ , референтна линија  $100\mu\text{m}$ ).

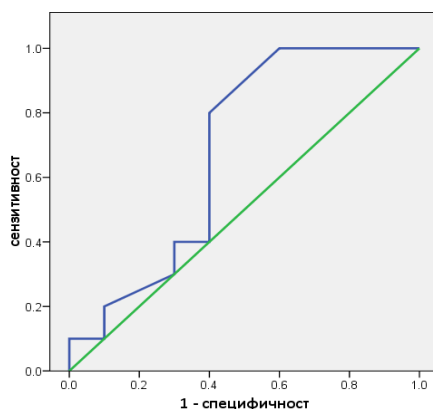


**Фигура 11.** Испитаници су подељени на две групе у зависности од присуства ( $n=20$ ) или одсуства ( $n=20$ ) некротичних поља у ткиву карцинома дојке. **А.** Туморска некроза је праћена већом MVD у хуманом карциному дојке. MVD је израчунавана на основу имунохистохемијског бојења на CD105, као средња вредност појединачних MVD у три одабрана микроскопска фокуса, на увећању  $\times 200$ . Резултат је приказан као аритметичка средина  $\pm$  SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста. **Б, В.** Експресија IL-33 и IL-33R није у корелацији са MVD у перинекротичној зони хуманог карцинома дојке. Имунохистохемијска експресија IL-33 и IL-33R је квантификована у туморским ћелијама и приказивана као проценат позитивних у односу на укупан број евалуираних ћелија. **Г.** Експресија VEGF-а корелира са MVD у перинекротичној зони хуманог карцинома дојке. Цитоплазматско бојење VEGF-а је скоровано у интервалу од 0 до 5: 0=одсуство цитоплазматског бојења; 1= $\leq 1\%$  позитивних ћелија; 2=1–10% позитивних ћелија; 3=10–50% позитивних ћелија; 4=50–90% позитивних ћелија и 5  $\geq 90\%$  позитивних ћелија. Статистичка значајност је анализирана применом Spearman-овог коефицијента корелације.

MVD је статистички значајно већа у туморима са детектабилном некрозом ( $28,67 \pm 2,54$ ) у поређењу са туморима у којима микроскопском анализом нисмо детектовали некротична поља ( $12,03 \pm 1,04$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p < 0,0001$ ) (Фигура 11А, Слика 7). Крвне судове, груписане у кластере, највећим бројем смо уочили у зони перинекротичног руба. Због дистрибуције новонасталих крвних судова, анализирали смо повезаност експресије IL-33, IL-33R и VEGF-а у овој зони са MVD. Нисмо утврдили статистички значајну корелацију између експресије IL-33 (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=0,096$ ;  $p=0,554$ ) и IL-33R (Spearman-ов коефицијент корелације,  $r=0,051$ ;  $p=0,755$ ) у перинекротичном рубу са MVD (Фигура 11Б и В). Међутим, статистички значајна корелација постоји између експресије VEGF-а у туморским ћелијама око зоне некрозе и MVD ( $r=0,375$ ;  $p=0,017$ ) (Фигура 11Г).

#### 4.6. Експресије IL-33 и IL-33R су маркери туморске некрозе. Некроза је индикатор преживљавања код пацијената са карциномом дојке

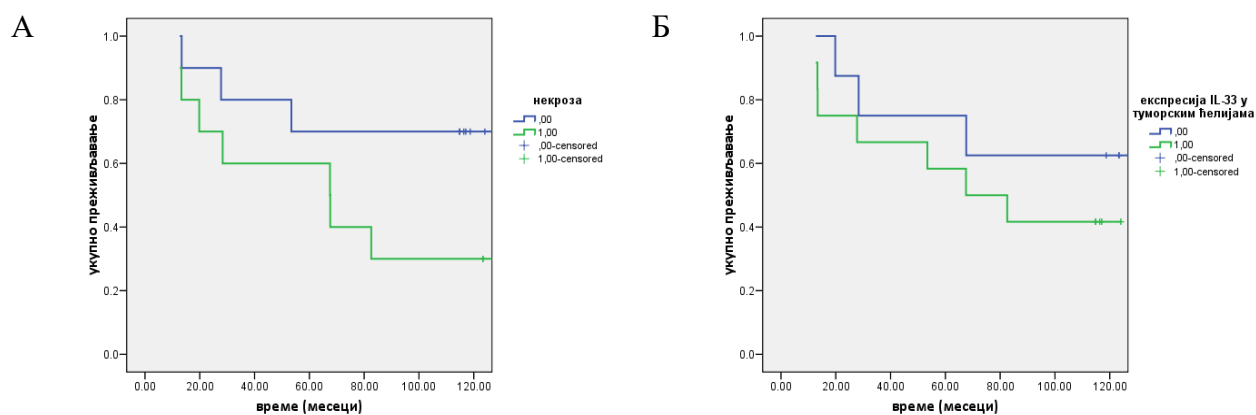
Као што је приказано на фигури 12, наше израчунавање и добијена ROC (енгл. *Receiver operating characteristic*) крива, указује да смањена експресија IL-33 може бити поуздан маркер некрозе (енгл. *Area under the Receiver Operating Characteristic*, AUROC=0,680;  $p=0,050$ ).



**Фигура 12.** Степен експресије IL-33 у туморским ћелијама указује на присуство некрозе у хуманом карциному дојке. Испитаници су подељени на две групе у зависности од присуства ( $n=20$ ) или одсуства ( $n=20$ ) некротичних поља у ткиву карцинома дојке. Имунохистохемијска експресија IL-33 је квантификована у туморским ћелијама и приказивана као проценат позитивних у односу на укупан број евалуираних ћелија. Статистичка значајност је утврђена применом ROC анализе.

Резултати јасно показују да оптимална гранична вредност у процентуалној заступљености IL-33 позитивних туморских ћелија износи 4% и да ова вредност омогућује јасно раздвајање пацијената са и без некрозе у инвазивном дукталном карциному дојке (сензитивност 80,0%, специфичност 60,0%). Статистичка анализа је потврдила да смањена експресија IL-33 у туморским ћелијама може да укаже на присуство некрозе у туморском ткиву.

Применом Kaplan Meier-ове криве и Mantel-Cox теста процењивали смо значај некрозе и експресије IL-33 на десетогодишње преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке. Десетогодишње преживљавање у групи тумора са некрозом је 30% у поређењу са групом тумора без детектабилне некрозе у којој преживљавање износи 70% (Mantel-Cox,  $p=0,020$ ) (Фигура 13А).

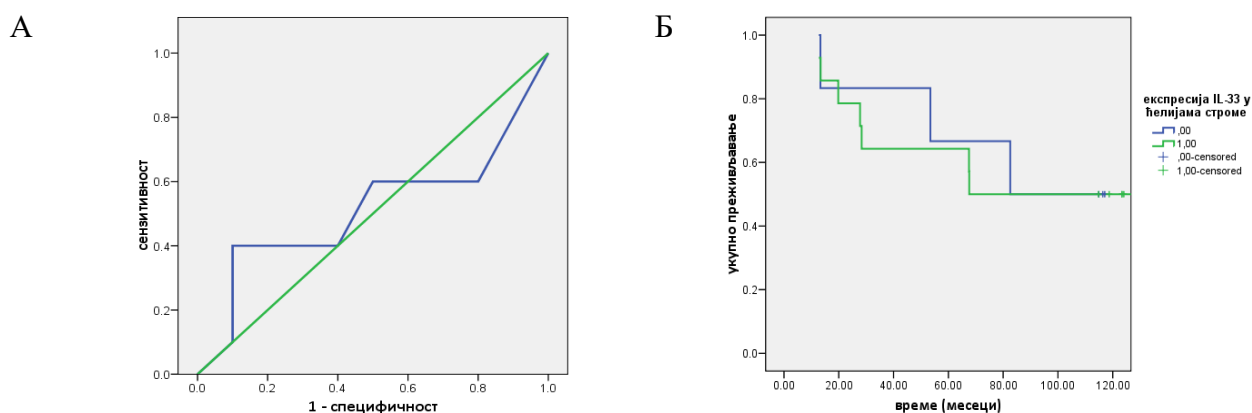


**Фигура 13. А. Присуство некрозе скраћује преживљавање код пацијената са карциномом дојке.** Испитаници су подељени на две групе у зависности од присуства ( $n=20$ ) или одсуства ( $n=20$ ) некротичних поља у ткиву карцинома дојке. **Б. Степен експресије IL-33 у туморским ћелијама не утиче на преживљавање пацијената са карциномом дојке.** Имунохистохемијска експресија IL-33 је квантификована у туморским ћелијама и приказивана као проценат позитивних у односу на укупан број евакуираних ћелија, након чега су тумори подељени на групу са ниском (<4% позитивних туморских ћелија) ( $n=16$ ) и високом експресијом ( $\geq 4\%$  позитивних туморских ћелија) ( $n=24$ ). Пацијенткиње су праћене у периоду од 10 година након операције. Статистичка значајност је анализирана применом Mantel Cox-овог теста и Kaplan Meier-ове криве.

За анализу утицаја експресије IL-33 на преживљавање, применили смо граничне вредности нашег израчунавања и карциноми дојке су подељени на групу са ниском (<4% позитивних туморских ћелија) и високом експресијом ( $\geq 4\%$  позитивних туморских ћелија). Наше израчунавање је показало да експресија IL-33 у туморским ћелијама статистички значајно не утиче на преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке иако

је у групи позитивних карцинома, десетогодишње преживљавање било краће у односу на негативне туморе (41,7% vs. 62,5%) (Mantel-Cox,  $p=0,174$ ) (Фигура 13Б).

Анализирана је експресија IL-33 у стромалним ћелијама, као маркера некрозе и преживљавања пацијента. Експресија IL-33 у стромалним ћелијама није поуздан маркер за процену некрозе у ткиву хуманог карцинома дојке (AUROC 0,515,  $p=0,871$ ) (Фигура 14А). Како на основу оваквог резултата нисмо успели да одредимо *cut off* вредност, стромалну експресију смо класификовали на две групе користећи препоруке за тестирање HER2 у карциному дојке. Поштујући ове критеријуме, тумори су класификовани на групу са ниском ( $\leq 10\%$  позитивних ћелија) и високом ( $>10\%$  позитивних ћелија) експресијом IL-33 у ћелијама строме.



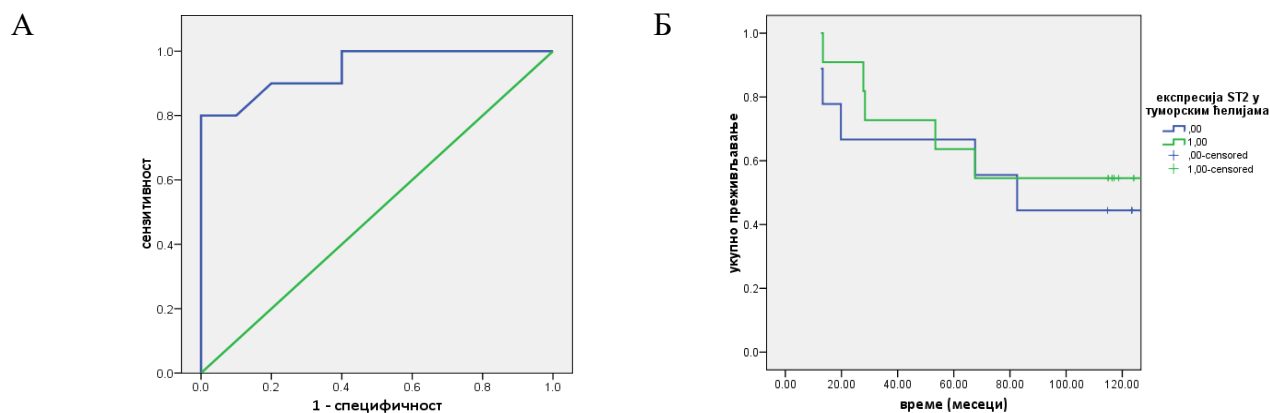
**Фигура 14. А. Степен експресије IL-33 у ћелијама туморске строме не указује на присуство некрозе у хуманом карциному дојке.** Испитаници су подељени на две групе у зависности од присуства ( $n=20$ ) или одсуства ( $n=20$ ) некротичних поља у ткиву карцинома дојке. Имунохистохемијска експресија IL-33 је квантификована у ћелијама туморске строме и приказивана као проценат позитивних у односу на укупан број евалуираних ћелија. Статистичка значајност је утврђена применом ROC анализе. **Б. Степен експресије IL-33 у ћелијама туморске строме не утиче на преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке.** На основу експресије IL-33 у ћелијама туморске строме, сви тумори су подељени на групу са ниском ( $<10\%$  позитивних ћелија строме) ( $n=12$ ) и високом експресијом ( $\geq 10\%$  позитивних ћелија строме) ( $n=28$ ). Пацијенткиње су праћене у периоду од 10 година након операције. Статистичка значајност је анализирана применом Mantel Cox-овог теста и Kaplan Meier-ове криве.

Анализирајући утицај стромалне експресије IL-33 на десетогодишње преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке, закључили смо да експресија IL-33 у ћелијама туморске строме није добар маркер преживљавања (Mantel Cox,  $p=0,849$ ) (Фигура 14Б). Десетогодишње преживљавање у обе групе пацијенткиња је износило око 50%.



Даљим израчунавањем ROC криве и процењујући експресију IL-33R у туморским ћелијама као маркера некрозе, утврдили смо да је експресија овог маркера уз „cut off“ од 22,5% одличан параметар за процену некрозе у туморском ткиву карцинома дојке, при чему ниска експресија означава већу вероватноћу да су у ткиву тумора присутна некротична поља (AUROC=0,945,  $p < 0,0001$ , сензитивност 90,0%, специфичност 80,0%) (Фигура 15А). За анализу утицаја експресије IL-33R у туморским ћелијама на преживљавање, карциноми дојке су подељени на групу са ниском (<22,5% позитивних ћелија) и високом експресијом ( $\geq 22,5\%$  позитивних ћелија).

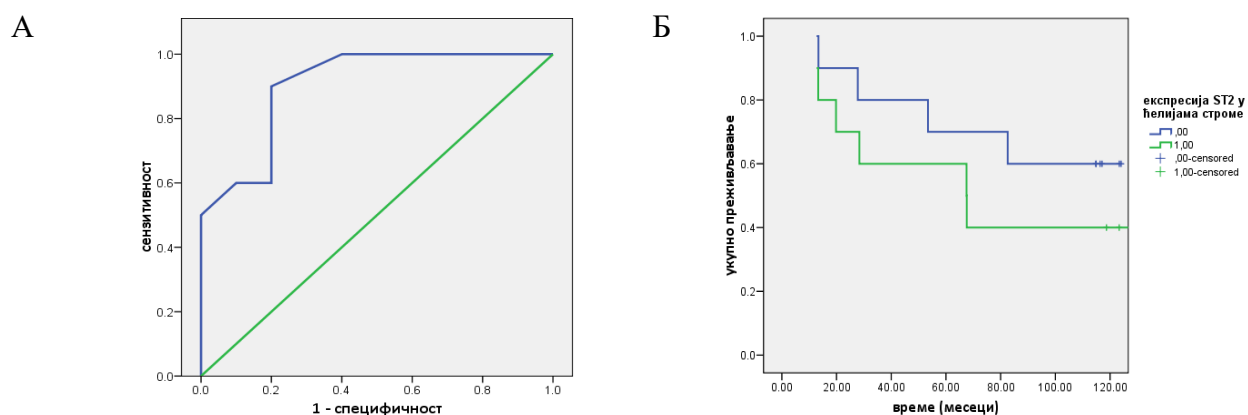
Применом Kaplan Meier-ове криве и Mantel Cox-овог теста процењивали смо значај експресије IL-33R у туморским ћелијама на десетогодишње преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке. Десетогодишње преживљавање у групи тумора са високом експресијом било је 54,5%, у поређењу са групом тумора у којој је детектован низак ниво експресије IL-33R и у којој је преживљавање било 44,5%. Ипак, није било статистички значајне разлике у преживљавању између ове две групе тумора (Mantel-Cox,  $p = 0,427$ ) (Фигура 15Б).



**Фигура 15. А. Степен експресије IL-33R у туморским ћелијама указује на присуство некрозе у хуманом карциному дојке.** Испитаници су подељени на две групе у зависности од присуства ( $n=20$ ) или одсуства ( $n=20$ ) некротичних поља у ткиву карцинома дојке. Имунохистохемијска експресија IL-33R је квантификована у туморским ћелијама и приказивана као проценат позитивних у односу на укупан број еваулираних ћелија. **Б. Степен експресије IL-33R у туморским ћелијама не утиче на преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке.** На основу експресије IL-33R у туморским ћелијама, сви тумори су подељени на групу са ниском (<22,5% позитивних туморских ћелија) ( $n=18$ ) и високом експресијом ( $\geq 22,5\%$  позитивних туморских ћелија) ( $n=22$ ). Пацијенткиње су праћене у периоду од 10 година након операције. Статистичка значајност је анализирана применом Mantel Cox-овог теста и Kaplan Meier-ове криве.

Експресија IL-33R у стромалним ћелијама се показала као поуздан маркер за процену присуства некрозе у ткиву хуманог карцинома дојке, при чему позитивност од  $\geq 13,75\%$  стромалних ћелија указује на постојање екстензивних некротичних поља у ткиву тумора (AUROC=0,905,  $p < 0,0001$ , сензитивност 90,0%, специфичност 80,0%) (Фигура 16А). На основу овако детерминисане граничне вредности, сви тумори су подељени на групу са ниском ( $< 13,75\%$  позитивних ћелија) и високом експресијом ( $\geq 13,75\%$  позитивних ћелија) IL-33R у ћелијама строме.

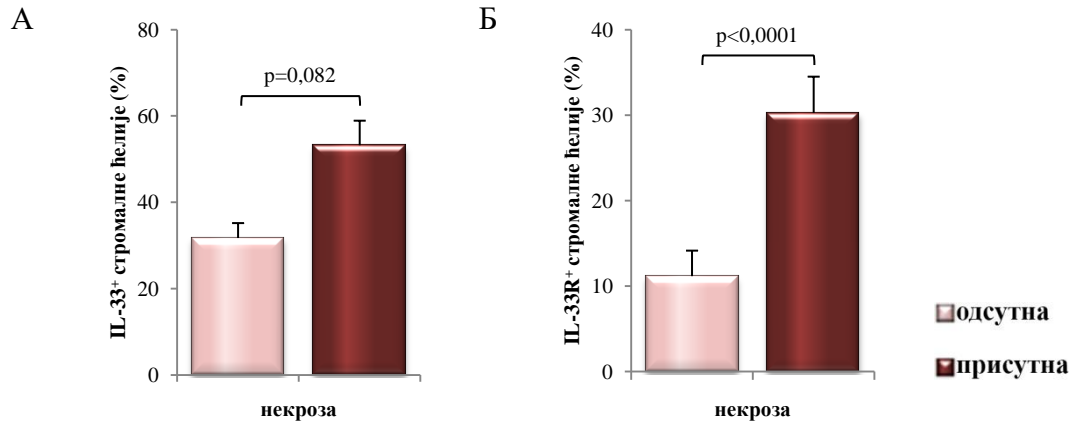
Поређећи преживљавање између ове две групе тумора у нашој студији, степен експресије IL-33R у ћелијама строме није утицао на преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке (Mantel Cox,  $p = 0,158$ ). Десетогодишње преживљавање у групи негативних тумора било је 60% наспрот 40% у групи позитивних тумора (Фигура 16Б).



**Фигура 16. А. Степен експресије IL-33R у ћелијама туморске строме указује на присуство некрозе у хуманом карциному дојке.** Испитаници су подељени на две групе у зависности од присуства ( $n=20$ ) или одсуства ( $n=20$ ) некротичних поља у ткиву карцинома дојке. Имунохистохемијска експресија IL-33R је квантификована у ћелијама туморске строме и приказивана као проценат позитивних у односу на укупан број евауираних ћелија. Статистичка значајност је утврђена применом ROC анализе. **Б. Степен експресије IL-33R у ћелијама туморске строме не утиче на преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке.** На основу експресије IL-33R у ћелијама строме, сви тумори су подељени на групу са ниском ( $< 13,75\%$  позитивних туморских ћелија) ( $n=20$ ) и високом експресијом ( $\geq 13,75\%$  позитивних туморских ћелија) ( $n=20$ ). Статистичка значајност је анализирана применом Mantel Cox-овог теста и Kaplan Meier-ове криве.

Применом Mann Whitney-јевог теста утврдили смо да је експресија IL-33 и IL-33R у ћелијама туморске строме већа у карцинома у којима смо детектовали поља некрозе. Иако је проценат стромалних ћелија које експримирају IL-33 већи у групи карцинома са детектабилним пољем некрозе ( $53,22 \pm 5,69\%$ ) у односу на групу без некрозе ( $31,76 \pm 3,46\%$ ), ова разлика није статистички значајна (Mann Whitney-јев тест,  $p = 0,082$ ) (Фигура

17A). Са друге стране, експресија IL-33R у стромалним ћелијама је већа у групи са некрозом и разлика је статистички значајна ( $11,14 \pm 2,99$  vs.  $30,27 \pm 4,24\%$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p < 0,0001$ ) (Фигура 17Б).

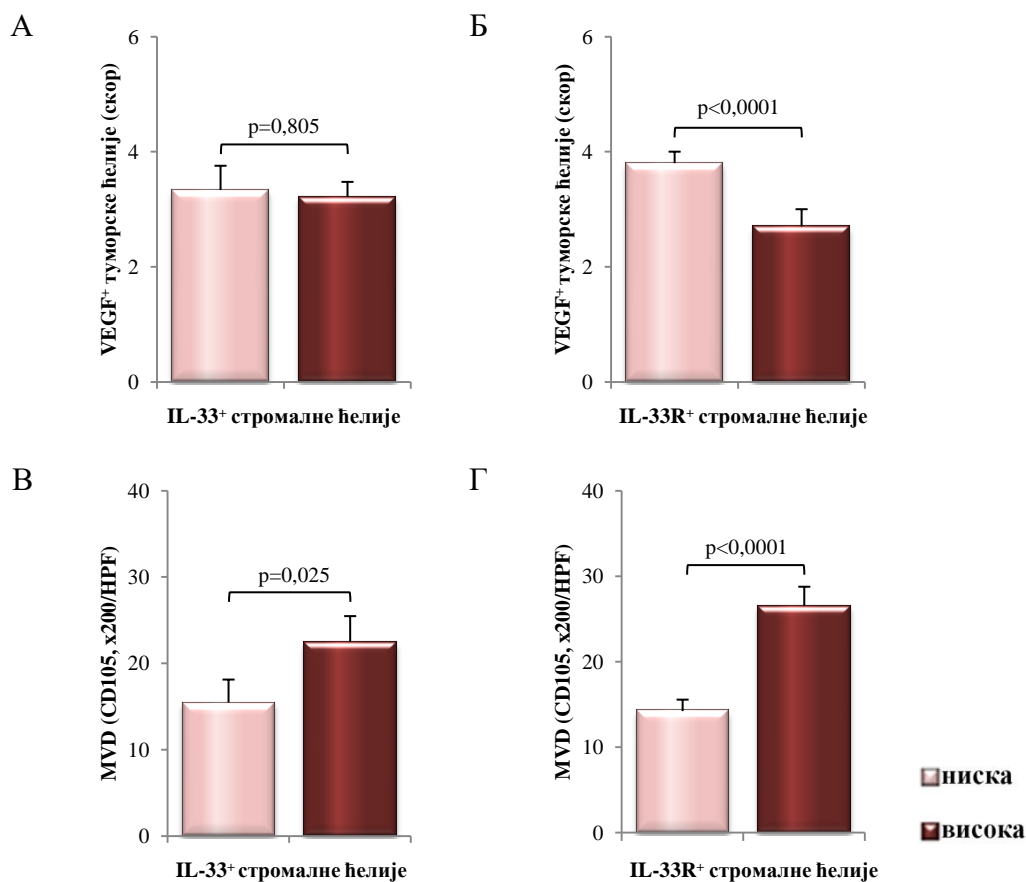


**Фигура 17.** Испитаници су подељени на две групе у зависности од присуства ( $n=20$ ) или одсуства ( $n=20$ ) некротичних поља у ткиву карцинома дојке. **А, Б. Некроза повећава експресију IL-33 и IL-33R у ћелијама туморске строме хуманог карцинома дојке.** Имунохистохемијска експресија IL-33 и IL-33R је независно квантификована у стромалним ћелијама и приказивана као проценат позитивних у односу на укупан број евалуираних ћелија. Резултат је приказан као аритметичка средина  $\pm$  SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

Како бисмо утврдили разлику у експресији VEGF-а и MVD у зависности од имунохистохемијске експресије IL-33 и IL-33R у ћелијама строме, све карциноме смо на основу позитивности поделили на две групе. На основу експресије IL-33 у ћелијама туморске строме, тумори су подељени на групу са ниском ( $<10\%$  позитивних ћелија строме) и високом експресијом IL-33R ( $\geq 10\%$  позитивних ћелија строме). Група са ниском експресијом IL-33R у ћелијама туморске строме је подразумевала  $<13,75\%$ , док су тумори са  $\geq 13,75\%$  позитивних ћелија категорисани у групу са високом експресијом овог маркера. Од раније је познато да осовина IL33/IL-33R стимулише ангиогенезу и да су тумор-инфилтришући леукоцити, као саставни део туморске строме, један од кључних елемената у том процесу. Из тог разлога смо анализирали експресију IL-33 и IL-33R и њихов ефекат на настанак нових крвних судова.

Експресија VEGF-а у туморским ћелијама се не разликује између група са ниском ( $3,33 \pm 0,42$ ) и високом ( $3,21 \pm 0,26$ ) експресијом IL-33 у стромалним ћелијама (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,805$ ) (Фигура 18А). Група карцинома која је имала високу стромалну експресију

IL-33R имала је нижу средњу вредност VEGF скова ( $2,74 \pm 0,32$ ) у поређењу са карциномима који су имали ниску ( $3,82 \pm 0,21$ ) стромалну IL-33R експресију (Mann Whitney-јев тест,  $p < 0,0001$ ) (Фигура 18Б).



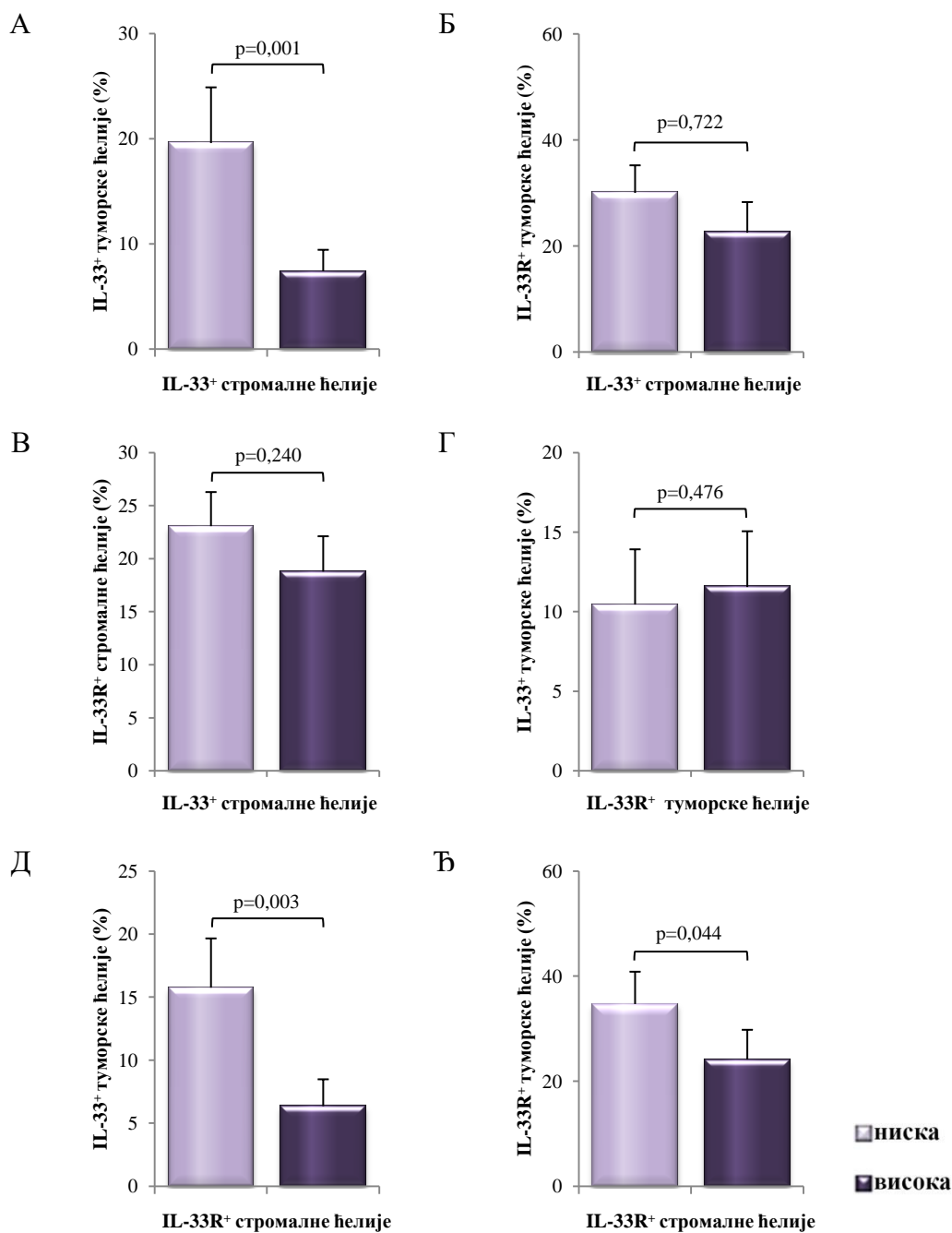
**Фигура 18.** На основу експресије IL-33 у ћелијама туморске строме, сви тумори су подељени на групу са ниском (<10% позитивних ћелија строме) ( $n=12$ ) и високом експресијом ( $\geq 10\%$  позитивних ћелија строме) ( $n=28$ ). У зависности од експресије IL-33R у ћелијама туморске строме, тумори су подељени на групу са ниском (<13,75% позитивних туморских ћелија) ( $n=20$ ) и високом експресијом ( $\geq 13,75\%$  позитивних туморских ћелија) ( $n=20$ ). **А.** Експресија IL-33 у ћелијама туморске строме не утиче на експресију VEGF-а у туморским ћелијама карцинома дојке. Цитоплазматско бојење VEGF-а је скоровано у интервалу од 0 до 5: 0=одсуство цитоплазматског бојења; 1= $\leq 1\%$  позитивних ћелија; 2=1–10% позитивних ћелија; 3=10–50% позитивних ћелија; 4=50–90% позитивних ћелија и 5  $\geq 90\%$  позитивних ћелија. **Б.** У туморима са ниском експресијом IL-33R у ћелијама туморске строме повећана је експресија VEGF-а у туморским ћелијама. **В, Г.** Експресија IL-33 и IL-33R у ћелијама туморске строме повећава број новонасталих крвних судова у ткиву карцинома дојке. MVD је израчунавана на основу имунохистохемијског бојења на CD105, као средња вредност појединачних MVD, у три одабрана микроскопска фокуса, на увећању x200. Резултати су приказани као аритметичка средина  $\pm$  SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

Насупрот експресији VEGF-а у туморским ћелијама, група тумора са високом експресијом IL-33 показује већу средњу вредност MVD ( $15,45 \pm 2,66$ ) у поређењу са групом карцинома која је имала ниску ( $22,46 \pm 3,01$ ) експресију IL-33 (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,025$ )

(Фигура 18В). Такође, овај феномен је у складу са поређењем MVD у групама карцинома са ниском ( $14,18 \pm 1,34$ ) и високом ( $26,47 \pm 2,25$ ) експресијом IL-33R (Mann Whitney-јев тест,  $p < 0,0001$ ) (Фигура 18Г).

#### **4.7. Експресије IL-33 и IL-33R у туморским и ћелијама туморске строме хуманог карцинома дојке**

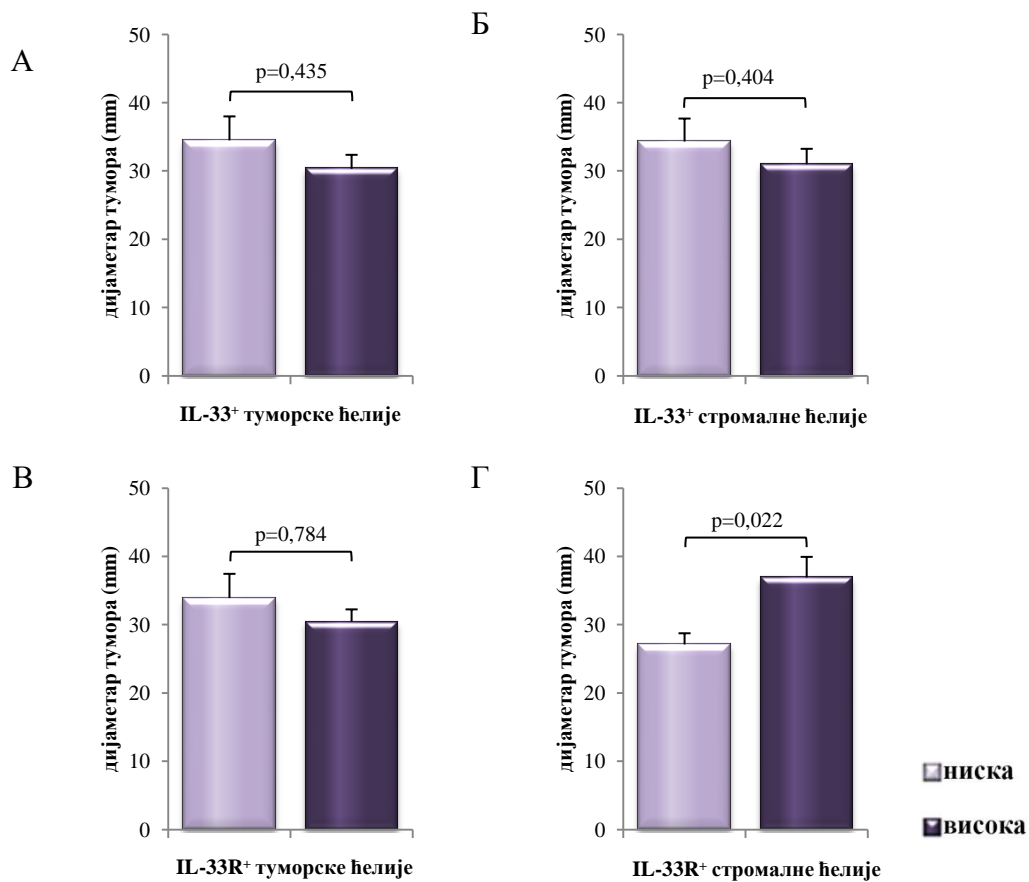
Како се IL-33 и IL-33R експримирају у ћелијама тумора и строме, испитивали смо однос између стромалне и туморске експресије ових белега. Упоредили смо експресију IL-33 у туморским у односу на експресију истог маркера у стромалним ћелијама и обрнуто. Експресија IL-33 у туморским ћелијама значајно је већа у туморима у којима је ниска експресија IL-33 у стромалним ћелијама ( $19,58 \pm 5,30$  vs.  $7,39 \pm 2,04\%$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p = 0,001$ ; Фигура 19А). Разлика у експресији IL-33R у туморским ћелијама није статистички значајна између карцинома са ниском ( $30,0 \pm 5,19\%$ ) и високом експресијом ( $22,50 \pm 5,76\%$ ) стромалног IL-33 (Mann Whitney-јев тест,  $p = 0,722$ ) (Фигура 19Б). Анализирали смо однос између експресије IL-33 и IL-33R у ћелијама строме. Карциноми са ниском стромалном експресијом IL-33 показали су већу средњу вредност процентуалне стромалне експресије IL-33R, али разлика није статистички значајна ( $23,05 \pm 3,22$  vs.  $18,77 \pm 3,33\%$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p = 0,240$ ) (Фигура 19В). Група карцинома са високом експресијом IL-33R у туморским ћелијама је имала већу средњу вредност процентуалне експресије IL-33 у туморским ћелијама, али разлика није статистички значајна ( $10,44 \pm 3,47$  vs.  $11,54 \pm 3,51\%$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p = 0,476$ ) (Фигура 19Г). Код карцинома са ниском стромалном експресијом IL-33R, забележили смо статистички значајну већу експресију IL-33 ( $15,75 \pm 3,91$  vs.  $6,35 \pm 2,13\%$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p = 0,003$ ) и IL-33R ( $34,68 \pm 6,16$  vs.  $24,12 \pm 5,67\%$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p = 0,044$ ) у туморским ћелијама, у односу на групу са високом експресијом IL-33R у ћелијама туморске строме (Фигура 19Д и Ђ).



**Фигура 19.** Имунохистохемијска експресија IL-33 и IL-33R је независно квантификована у туморским и стромалним ћелијама и приказивана као проценат позитивних у односу на укупан број евалуираних ћелија. На основу граничних вредности за експресију сваког маркера посебно у туморским и ћелијама строме, тумори су класификовани у групе са ниском и високом експресијом. А, Б. Експресија IL-33, али не и IL-33R у туморским ћелијама карцинома дојке је значајно мања код тумора са високим степеном експресије IL-33 у ћелијама строме. В. Експресија IL-33R у стромалним ћелијама се значајно не разликује у зависности од степена експресије IL-33 у ћелијама строме. Г. Експресија IL-33 у туморским ћелијама се значајно не разликује у зависности од степена експресије IL-33R у туморским ћелијама. Д, Ђ. Смањена експресија IL-33R у ћелијама строме, повећава процентуалну заступљеност IL-33 и IL-33R позитивних туморских ћелија у хуманом карциному дојке. Резултати су приказани као аритметичка средина ± SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

Пацијенте са тумором дојке смо поделили на групе на основу степена експресије IL-33 и IL-33R у туморским и ћелијама строме, а затим смо анализирали пречник тумора у новоформираним групама. Дијаметар тумора се није значајно разликовао између група пацијената са ниском ( $34,5 \pm 3,51$  mm) и високом експресијом туморског IL-33 ( $30,33 \pm 2,05$  mm) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,435$ ) (Фигура 20А). Такође, разлика у величини није значајна ни у групама са ниском ( $34,33 \pm 3,36$  mm) и високом експресијом IL-33 у стромалним ћелијама ( $31,0 \pm 2,26$  mm) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,404$ ) (Фигура 20Б). Ипак, средња вредност пречника у групама ниске експресије туморског и стромалног IL-33 је била у просеку већа.

Различити нивои експресија IL-33R у туморским ћелијама нису утицали на дијаметар тумора ( $33,89 \pm 3,55$  vs.  $30,45 \pm 1,78$  mm) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,784$ ) (Фигура 20В). Супротно овоме, пацијенткиње у чијим туморима је детектована висока експресија IL-33R у стромалним ћелијама у просеку су имале већи пречник тумора ( $36,90 \pm 3,02$  mm) у односу на пацијенткиње са туморима ниске стромалне експресије IL-33R ( $27,10 \pm 1,63$  mm) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,022$ ) (Фигура 20Г).



**Фигура 20.** Имунохистохемијска експресија IL-33 и IL-33R је независно квантификована у туморским и стромалним ћелијама као проценат позитивних у односу на укупан број еваулираних ћелија. На основу граничних вредности за експресију сваког маркера посебно у туморским и ћелијама строме, тумори су класификовани у групе са ниском и високом експресијом. **А-В.** Дијаметар тумора се значајно не разликује између група са ниском и високом експресијом IL-33 у туморским и ћелијама строме, као и IL-33R у туморским ћелијама. **Г.** Тумори са већим пречником показују висок степен експресије IL-33R у ћелијама туморске строме. Резултати су приказани као аритметичка средина ± SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.



#### 4.8. Некроза је параметар лоше прогнозе у хуманом карциному дојке

У наставку истраживања, анализирали смо експресију маркера ER, PR, HER2 и p53 у туморском ткиву у пацијената класификованих на две групе у зависности од присуства некрозе у туморском ткиву. Експресија маркера ER, PR, HER2 и p53 у туморским ћелијама одређивана је имунохистохемијском методом. Средња вредност скорa за експресију ER је статистички значајно већа у групи карцинома у којима нису детектована подручја некротичног ткива ( $7,1 \pm 0,18$ ) у односу на карциноме са некрозом ( $2,4 \pm 0,99$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p < 0,0001$ ) (Фигура 21А, Слика 8). Аналогно експресији ER, експресија PR је већа у групи карцинома без некрозе а разлика је високо статистички значајна ( $5,6 \pm 0,76$  vs.  $1,5 \pm 0,82$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p = 0,005$ ) (Фигура 21Б, Слика 8). Процентуална заступљеност HER2 позитивних карцинома дојке није се статистички значајно разликовала у групама карцинома, са и без некрозе ( $\chi^2$  тест,  $p = 0,236$ ) (Табела 16, Слика 8). Анализом експресије p53, утврдили смо статистички значајну разлику у средњој вредности Allred скорa између група карцинома. Значајно мањи скор, детектован је у групи без ( $2,1 \pm 0,82$ ) у односу на групу са присутним пољима некрозе ( $4,5 \pm 0,92$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p = 0,008$ ) (Фигура 21В, Слика 9).

Nottingham-ов прогностички индекс (енгл. *Nottingham prognostic index*, NPI) је један од параметара прогнозе болести након оперативног лечења карцинома дојке. Израчунава следећом формулом:

$$NPI = 0,2 \times \text{величина тумора(cm)} + \text{градус(1-3)} + \text{нодални статус (1-3)}$$

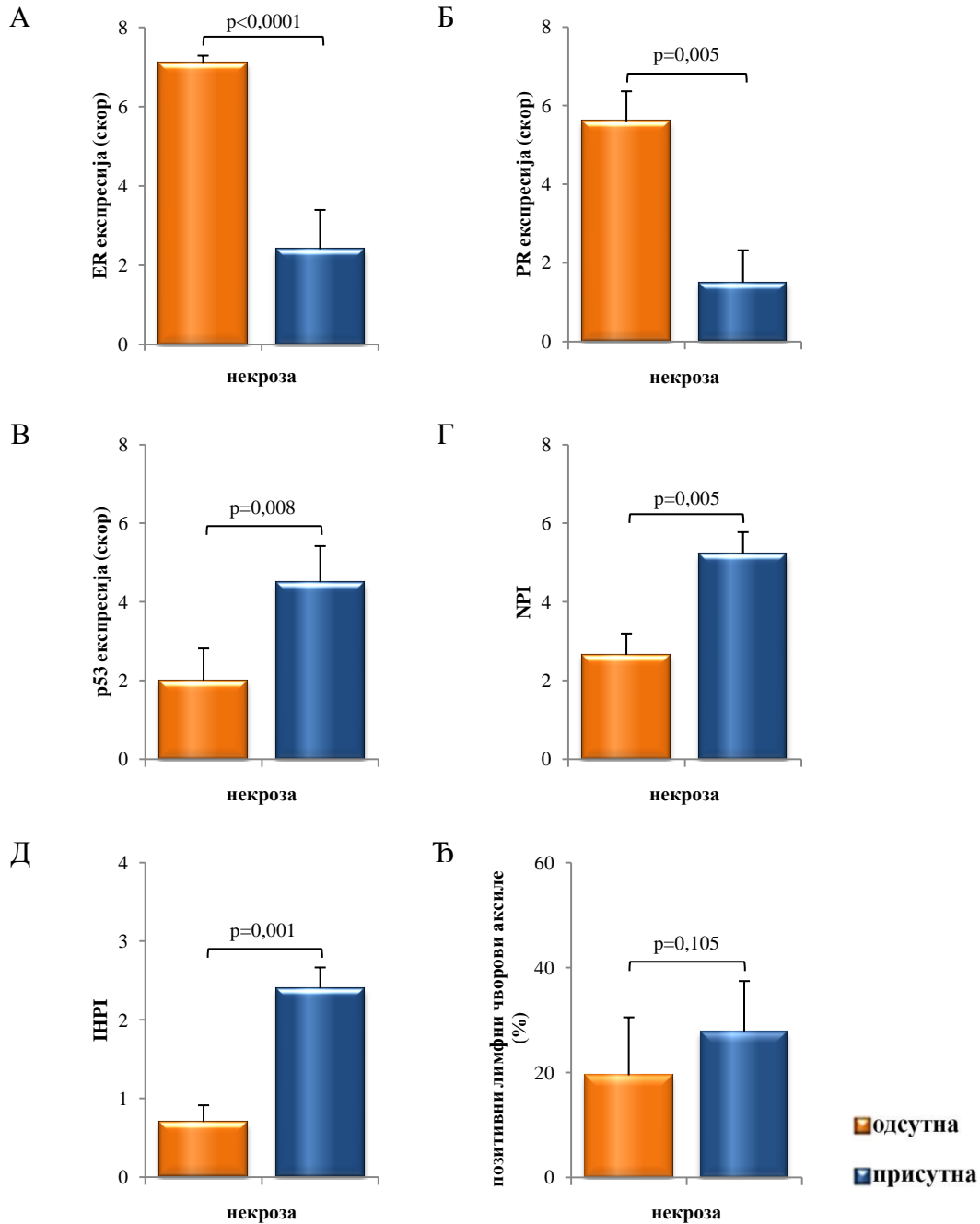
Имунохистохемијски прогностички индекс (енгл. *Immunohistochemical prognostic index*, ИИПИ) је настао у новије време, као резултат имунохистохемијске детекције различитих онкогена. Израчунава се сабирањем појединачних скорова за четири имунохистохемијска белега: p53 и HER2 позитивни тумори се оцењују са 1, а негативни са 0. Тумори са експресијом естрогених и прогестеронских рецептора добијају 0 бодова, а без ове експресије 1.

У групи карцинома са некротичним подручјима установили смо, статистички значајну, већу, средњу вредност NPI у поређењу са карциномима без некротичних поља ( $2,65 \pm 0,54$  vs.  $5,23 \pm 0,55$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p = 0,005$ ) (Фигура 21Г).

Група тумора у којој су детектована поља некрозе показала је, статистички значајну, већу, средњу вредност ИНРІ скора у поређењу са карциномима без некротичних поља ( $0,7 \pm 0,21$  vs.  $2,4 \pm 0,27$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,001$ ) (Фигура 21Д).

Код пацијената са карциномом дојке у којима су детектована поља некрозе, утврђен је већи проценат метастатски измењених лимфних чворова аксиле ( $27,64 \pm 6,71\%$ ) у односу на групу тумора у којима некроза није била присутна ( $19,45 \pm 7,59\%$ ), али разлика није статистички значајна (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,105$ ) (Фигура 21Ђ). Ипак, инвазија лимфних судова има већи удео у карциномима са некрозом у односу на туморе без детектабилних поља некрозе ( $\chi^2$  тест,  $p=0,236$ ) (Табела 16, Слика 10).

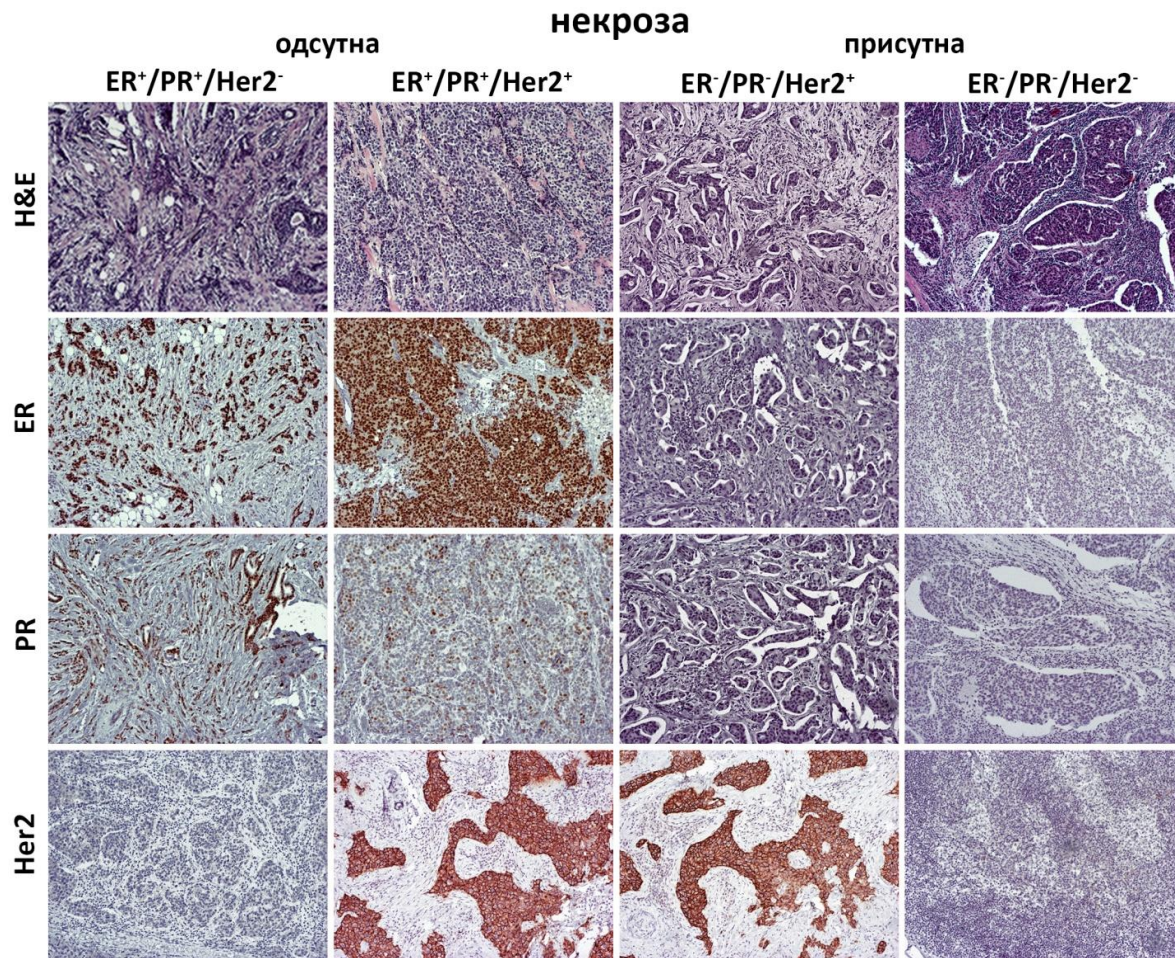
Повезаност некрозе са другим клиничкопатолошким параметрима приказана је у табели 16.



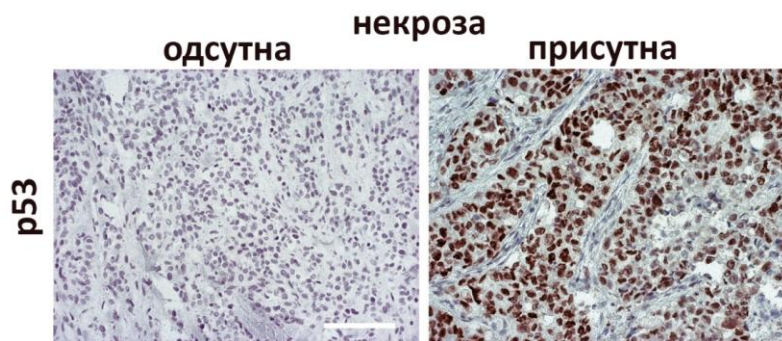
**Фигура 21.** Експресија маркера ER, PR и p53, вредности NPI и IHPI скорова, као и процентуална заступљеност метастатски измењених лимфних чворова аксиле карцинома дојке у односу на туморску некрозу. Испитаници су подељени на две групе у зависности од присуства (n=20) или одсуства (n=20) некротичних поља у ткиву карцинома дојке. А-Г. Експресије ER, PR и p53 белега су анализирани имунохистохемијском методом. Вредност NPI скорa је израчунавана према формули: 0,2 x величина тумора(cm) + градус(1-3) + нодални статус. IHPI скор је израчунаван сабирањем појединачних скорова за туморску позитивност на ER, PR, HER2 и p53 белега. Резултати су приказани као аритметичка средина ± SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

| Некроза                                 |                  |            |            |                   |
|---|------------------|------------|------------|-------------------|
| ВАРИЈАБЛА                               |                  | ОДСУТНА    | ПРИСУТНА   | p                 |
| <b>HER2</b>                             | <i>Негативни</i> | 18 (56,3%) | 14 (43,8%) | 0,236             |
|   | <i>Позитивни</i> | 2 (25,0%)  | 6 (75,0%)  |                   |
| <b>Хистолошки градус</b>                | <i>I+II</i>      | 20 (83,3%) | 4 (16,7%)  | <b>&lt;0,0001</b> |
|   | <i>III</i>       | 0 (0%)     | 16 (100%)  |                   |
| <b>Нуклеарни градус</b>                 | <i>I+II</i>      | 19 (82,6%) | 4 (17,4%)  | <b>&lt;0,0001</b> |
|   | <i>III</i>       | 1 (5,9%)   | 16 (94,1%) |                   |
| <b>Митотски индекс</b>                  | <i>I+II</i>      | 20 (55,6%) | 16 (44,4%) | 0,114             |
|   | <i>III</i>       | 0 (0%)     | 4 (100%)   |                   |
| <b>Инвазија крвних судова</b>           | <i>Негативни</i> | 14 (53,8%) | 12 (46,2%) | 0,740             |
|   | <i>Позитивни</i> | 6 (42,9%)  | 8 (57,1%)  |                   |
| <b>Инвазија лимфних судова</b>          | <i>Негативни</i> | 12 (75,0%) | 4 (25,0%)  | <b>0,024</b>      |
|   | <i>Позитивни</i> | 8 (33,3%)  | 16 (66,7%) |                   |
| <b>Перинеурална инвазија</b>            | <i>Негативни</i> | 6 (100%)   | 0 (0%)     | <b>0,027</b>      |
|   | <i>Позитивни</i> | 14 (41,2%) | 20 (58,8%) |                   |
| <b>Стромална мононукларна реакција</b>  | <i>I+II</i>      | 20 (58,8%) | 14 (41,2%) | <b>0,027</b>      |
|   | <i>III</i>       | 0 (0%)     | 6 (100%)   |                   |
| <b>Статус аксиларних лимфних нодуса</b> | <i>Негативни</i> | 14 (70,0%) | 6 (30,0%)  | <b>0,027</b>      |
|   | <i>Позитивни</i> | 6 (30,0%)  | 14 (70,0%) |                   |
| <i>χ<sup>2</sup> тест</i>               |                  |            |            |                   |

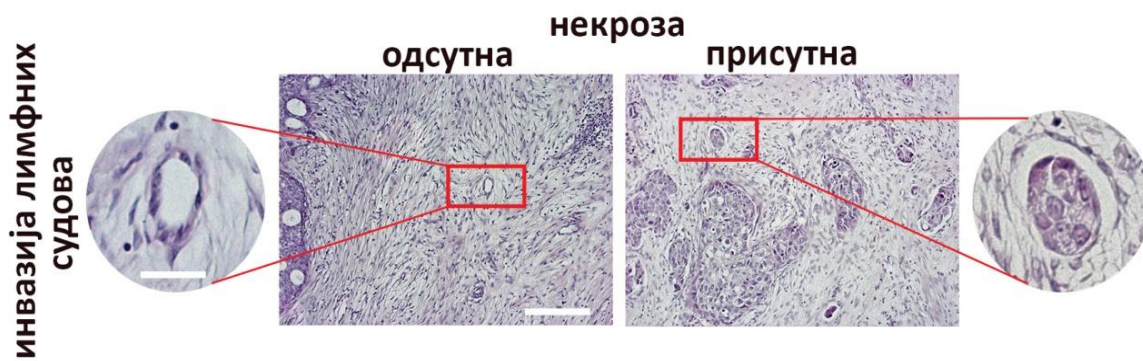
**Табела 16. Патохистолошки параметри тумора дојке у односу на присуство некрозе.** Студија обухвата 40 пацијенткиња са инвазивним дукталним карциномом дојке које су категорисане у групу без (n=20) и са (n=20) детектованом некрозом у туморском ткиву. Анализирани параметри су одређивани микроскопском анализом ткивних пресека бојених стандардном хематоксилин-еозин методом. Статистичка значајност је тестирана  $\chi^2$  тестом.



Слика 8. ER/PR/HER2 статус у зависности од присуства некрозе у ткиву хуманог карцинома дојке. Репрезентативне микрофотографије показују одсуство некрозе у туморима са високом експресијом ER и PR наспрот ER и PR негативним туморима. HER2 позитивност је присутна у туморима без обзира да ли су микроскопском анализом уочена поља некрозе (оригинално увећање x100, референтна линија 200µm).



Слика 9. Експресија p53 у зависности од присуства некрозе у ткиву хуманог карцинома дојке. Репрезентативне микрофотографије показују високу експресију p53 у тумору у коме су уочена поља некрозе наспрот p53 негативном карциному дојке (оригинално увећање x200, референтна линија x100 $\mu$ m).



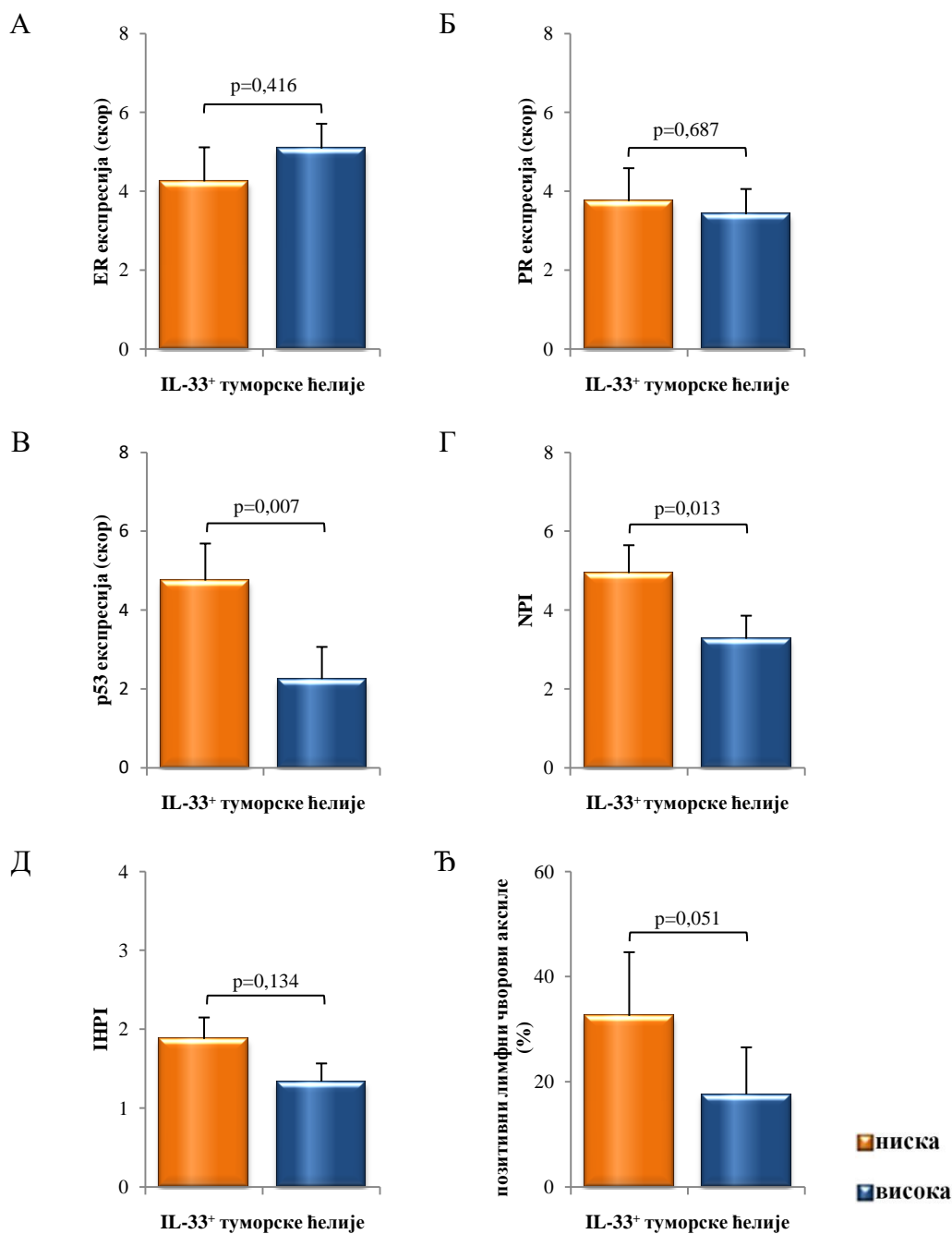
Слика 10. Инвазија лимфних судова у зависности од присуства некрозе у ткиву хуманог карцинома дојке. Репрезентативне микрофотографије показују туморске ћелије у лимфном суду карцинома у коме су уочена поља некрозе наспрот тумору без детектованих поља некрозе (оригинално увећање x100, референтна линија 200 $\mu$ m; оригинално увећање x200, референтна линија x100 $\mu$ m).

#### 4.9. Висока експресија IL-33 у туморским ћелијама карцинома дојке указује на биолошки мање агресивну форму тумора

Пацијенте са тумором дојке класификовали смо у две групе на основу степена експресије IL-33 у туморским ћелијама. Према граничној вредности нашег истраживања, групу тумора са ниском експресијом ( $n=16$ ) чине пацијенти са  $<4\%$  IL-33<sup>+</sup>, на супрот групи са високом експресијом ( $n=24$ ) у којима је детектовано  $\geq 4\%$  IL-33 позитивних туморских ћелија. У овако формираним групама анализирали смо клиничко-патолошке параметре. Средња вредност скова за експресију ER није статистички значајно измењена у групи карцинома са повећаном ( $5,08 \pm 0,63$ ) у односу на карциноме са ниском експресијом IL-33 ( $4,25 \pm 0,86$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,416$ ) (Фигура 22А). Такође, разлика у средњој вредности скова за експресију PR није статистички значајна између ове две групе ( $3,75 \pm 0,83$  vs.  $3,42 \pm 0,64$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,687$ ) (Фигура 22Б). Анализом експресије HER2, нисмо утврдили статистички значајну разлику у процентуалној заступљености позитивних карцинома у зависности од степена експресије IL-33 у туморским ћелијама ( $\chi^2$  тест,  $p=0,809$ ) (Табела 17). У групи карцинома са ниском експресијом IL-33 средња вредност Allred скова за p53 била је статистички значајно већа ( $4,75 \pm 0,94$ ) у односу на карциноме са повећаном експресијом IL-33 у туморским ћелијама ( $2,25 \pm 0,82$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,007$ ) (Фигура 22В).

Већа вредност, NPI скова забележена је у групи карцинома са ниском експресијом туморског IL-33 ( $4,94 \pm 0,71$  vs.  $3,27 \pm 0,71$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,013$ ) (Фигура 22Г) док се вредност ИНPI није значајно разликовала између испитиваних група ( $1,87 \pm 0,27$  vs.  $1,33 \pm 0,23$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,134$ ) (Фигура 22Д).

Код пацијената са високом експресијом IL-33 у ћелијама тумора, утврђен је мањи проценат метастатски измењених лимфних чворова аксиле ( $17,58 \pm 8,94\%$ ) у односу на групу тумора у којима је детектован низак ниво експресије IL-33 ( $32,50 \pm 12,12\%$ ). Разлика је на граници статистичке значајности (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,051$ ) (Фигура 22Ђ). Повезаност експресије IL-33 са стандардним патохистолошким параметрима смо анализирали применом  $\chi^2$  и Mann Whitney-јевог теста и резултати су приказани у табели 17.



**Фигура 22.** Висока експресија p53 и NPI скора код пацијената са ниском експресијом IL-33 у туморским ћелијама. Имунохистохемијска експресија IL-33 је квантификована у туморским ћелијама као проценат позитивних у односу на укупан број евалуираних ћелија. На основу експресије IL-33 у туморским ћелијама, тумори су подељени на групу са ниском (<4% позитивних туморских ћелија) (n=16) и високом експресијом (≥4% позитивних туморских ћелија) (n=24). А.- Г. Експресије ER, PR и p53 белега су анализирани имунохистохемијском методом. Вредност NPI скора је израчунавана према формули: 0,2 x величина тумора(cm) + градус(1-3) + нодални статус. NPI скор је израчунаван сабирањем појединачних скорова за туморску позитивност на ER, PR, HER2 и p53 белега. Резултати су приказани као аритметичка средина ± SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.



| Експресија IL-33 у туморским ћелијама   |                  |            |            |              |
|---|------------------|------------|------------|--------------|
| ВАРИЈАБЛА                               |                  | НИСКА      | ВИСОКА     | p            |
| <b>HER2</b>                             | <i>Негативни</i> | 12 (37,5%) | 20 (62,5%) | 0,809        |
|   | <i>Позитивни</i> | 4 (50,0%)  | 4 (50,0%)  |              |
| <b>Хистолошки градус</b>                | <i>I+II</i>      | 6 (25,0%)  | 18 (75,0%) | <b>0,041</b> |
|   | <i>III</i>       | 10 (62,5%) | 6 (37,5%)  |              |
| <b>Нуклеарни градус</b>                 | <i>I+II</i>      | 6 (26,1%)  | 17 (73,9%) | 0,078        |
|   | <i>III</i>       | 10 (58,8%) | 7 (41,2%)  |              |
| <b>Митотски индекс</b>                  | <i>I+II</i>      | 12 (33,3%) | 24 (67,7%) | <b>0,041</b> |
|   | <i>III</i>       | 4 (100%)   | 0 (0%)     |              |
| <b>Инвазија крвних судова</b>           | <i>Негативни</i> | 8 (30,8%)  | 18 (69,2%) | 0,199        |
|   | <i>Позитивни</i> | 8 (57,1%)  | 6 (42,9%)  |              |
| <b>Инвазија лимфних судова</b>          | <i>Негативни</i> | 6 (37,5%)  | 10 (62,5%) | 0,792        |
|   | <i>Позитивни</i> | 10 (41,7%) | 14 (58,3%) |              |
| <b>Перинеурална инвазија</b>            | <i>Негативни</i> | 0 (0%)     | 6 (100%)   | 0,086        |
|   | <i>Позитивни</i> | 16 (47,1%) | 18 (52,9%) |              |
| <b>Стромална мононукларна реакција</b>  | <i>I+II</i>      | 12 (35,3%) | 22 (64,7%) | 0,320        |
|   | <i>III</i>       | 4 (66,7%)  | 2 (33,3%)  |              |
| <b>Статус аксиларних лимфних нодуса</b> | <i>Негативни</i> | 4 (20,0%)  | 16 (80,0%) | <b>0,024</b> |
|   | <i>Позитивни</i> | 12 (60,0%) | 8 (40,0%)  |              |
| <i>χ<sup>2</sup> тест</i>               |                  |            |            |              |

Табела 17. Заступљеност патохистолошко-патолошких параметара у ткиву хуманог карцинома дојке у односу на експресију IL-33 у туморским ћелијама. Студија обухвата 40 пацијенткиња са инвазивним дукталним карциномом дојке које су категорисане у групу са ниском (n=16) и високом експресијом (n=24) IL-33 у туморским ћелијама. Анализирани параметри су одређивани микроскопском анализом ткивних пресека бојених стандардном хематоксилин-еозин методом. Статистичка значајност је тестирана  $\chi^2$  тестом.

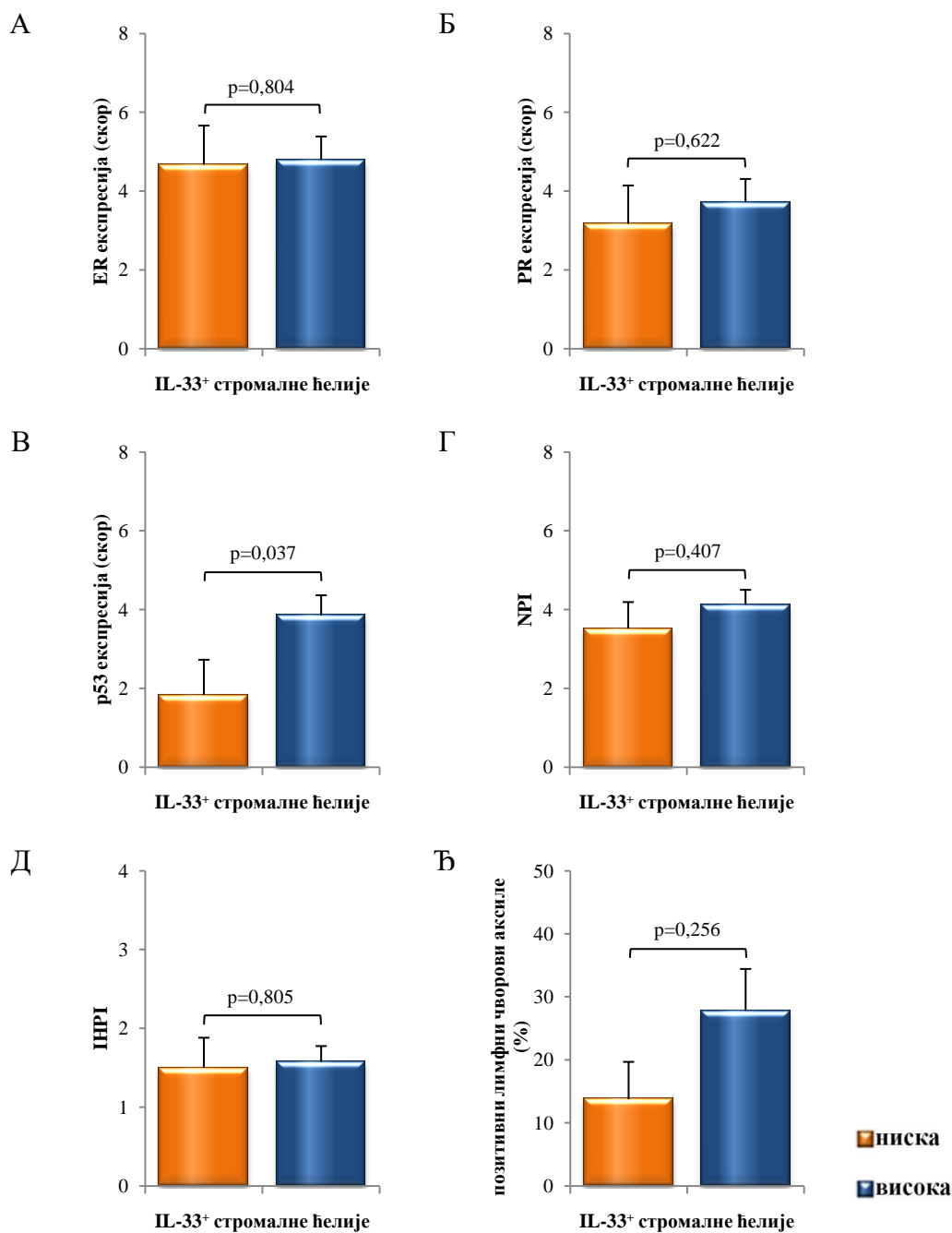
#### 4.10. Висока експресија IL-33 у стромалним ћелијама карцинома дојке праћена је појачаном експресијом p53 у туморским ћелијама

Пацијенте са тумором дојке класификовали смо у две групе на основу степена експресије IL-33 у ћелијама туморске строме. Група тумора са ниском експресијом ( $n=12$ ) је подразумевала  $<10\%$  IL-33<sup>+</sup> стромалних ћелија, насупротив групи са високом експресијом ( $n=28$ ) у којима је детектовано  $\geq 10\%$  IL-33 позитивних ћелија туморске строме. Средње вредности скорова за експресију ER нису се статистички значајно разликовале између група са ниском ( $4,66 \pm 0,99$ ) и повећаном експресијом стромалног IL-33 ( $4,78 \pm 0,60$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,804$ ) (Фигура 23А). Такође, разлика у средњој вредности скорва за експресију PR, иако већа у групи карцинома са високом експресијом IL-33, није се статистички значајно разликовала између ове две групе ( $3,17 \pm 0,97$  vs.  $3,71 \pm 0,59$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,622$ ) (Фигура 23Б). Анализом експресије HER2, нисмо утврдили разлику у процентуалној заступљености позитивних карцинома у зависности од степена експресије IL-33 у стромалним ћелијама ( $\chi^2$  тест,  $p=0,343$ ) (Табела 18). У групи карцинома са високом експресијом IL-33 средња вредност Allred скорва за p53 била је статистички значајно већа ( $3,86 \pm 0,51$ ) у односу на карциноме са ниском експресијом IL-33 у стромалним ћелијама ( $1,83 \pm 0,89$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,037$ ) (Фигура 23В).

Поређењем средњих вредности NPI нисмо забележили статистички значајну разлику између испитиваних група карцинома ( $3,52 \pm 0,67$  vs.  $4,12 \pm 0,38$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,407$ ) (Фигура 23Г). Такође, средње вредности INPI се нису разликовале између група са ниском ( $1,50 \pm 0,38$ ) и високом стромалном експресијом IL-33 ( $1,57 \pm 0,20$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,805$ ) (Фигура 23Д).

Код пацијената са високом експресијом IL-33 у ћелијама туморске строме, је забележен већи, али не и статистички значајан, проценат метастатски измењених лимфних чворова аксиле ( $27,76 \pm 6,65\%$ ) у односу на групу тумора у којима је детектован низак ниво експресије IL-33 ( $13,73 \pm 5,93\%$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,256$ ) (Фигура 23Ђ).

Повезаност експресије IL-33 у стромалним ћелијама са стандардним патохистолошким параметрима смо анализирали применом  $\chi^2$  и резултати су приказани у табели 18.



**Фигура 23. Висока експресија p53 у тумору дојке са високом експресијом IL-33 у ћелијама строме.** Имунохистохемијска експресија IL-33 је квантификована у ћелијама туморске строме као проценат позитивних у односу на укупан број еваулираних ћелија. На основу експресије IL-33 у ћелијама туморске строме, сви тумори су подељени на групу са ниском (<10% позитивних ћелија строме) (n=12) и високом експресијом (≥10% позитивних ћелија строме) (n=28). А.–Г. Експресије ER, PR и p53 белега су анализирани имунохистохемијском методом. Вредност NPI скова је израчунавана према формули: 0,2 x величина тумора(cm) + градус(1-3) + нодални статус. ИНПI скор је израчунаван сабирањем појединачних скорова за туморску позитивност на ER, PR, HER2 и p53 белега. Резултати су приказани као аритметичка средина ± SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

| Експресија IL-33 у ћелијама строме      |                  |            |            |       |
|---|------------------|------------|------------|-------|
| ВАРИЈАБЛА                               |                  | НИСКА      | ВИСОКА     | p     |
| <b>HER2</b>                             | <i>Негативни</i> | 8 (25,0%)  | 24 (75,0%) | 0,343 |
|   | <i>Позитивни</i> | 4 (50,0%)  | 4 (50,0%)  |       |
| <b>Хистолошки градус</b>                | <i>I+II</i>      | 8 (33,3%)  | 16 (66,7%) | 0,833 |
|   | <i>III</i>       | 4 (25,0%)  | 12 (75,0%) |       |
| <b>Нуклеарни градус</b>                 | <i>I+II</i>      | 8 (34,8%)  | 15 (65,2%) | 0,675 |
|   | <i>III</i>       | 4 (23,5%)  | 13 (76,5%) |       |
| <b>Митотски индекс</b>                  | <i>I+II</i>      | 12 (33,3%) | 24 (67,7%) | 0,421 |
|   | <i>III</i>       | 0 (0%)     | 4 (100%)   |       |
| <b>Инвазија крвних судова</b>           | <i>Негативни</i> | 8 (30,8%)  | 18 (69,2%) | 0,885 |
|   | <i>Позитивни</i> | 4 (28,6%)  | 10 (71,4%) |       |
| <b>Инвазија лимфних судова</b>          | <i>Негативни</i> | 4 (25,0%)  | 12 (75,0%) | 0,833 |
|   | <i>Позитивни</i> | 8 (33,3%)  | 16 (66,7%) |       |
| <b>Перинеурална инвазија</b>            | <i>Негативни</i> | 4 (66,7%)  | 2 (33,3%)  | 0,100 |
|   | <i>Позитивни</i> | 8 (23,5%)  | 26 (76,5%) |       |
| <b>Стромална мононукларна реакција</b>  | <i>I+II</i>      | 12 (35,3%) | 22 (64,7%) | 0,209 |
|   | <i>III</i>       | 0 (0%)     | 6 (100%)   |       |
| <b>Статус аксиларних лимфних нодуса</b> | <i>Негативни</i> | 8 (40,0%)  | 12 (60,0%) | 0,301 |
|   | <i>Позитивни</i> | 4 (20,0%)  | 16 (80,0%) |       |
| $\chi^2$ тест                           |                  |            |            |       |

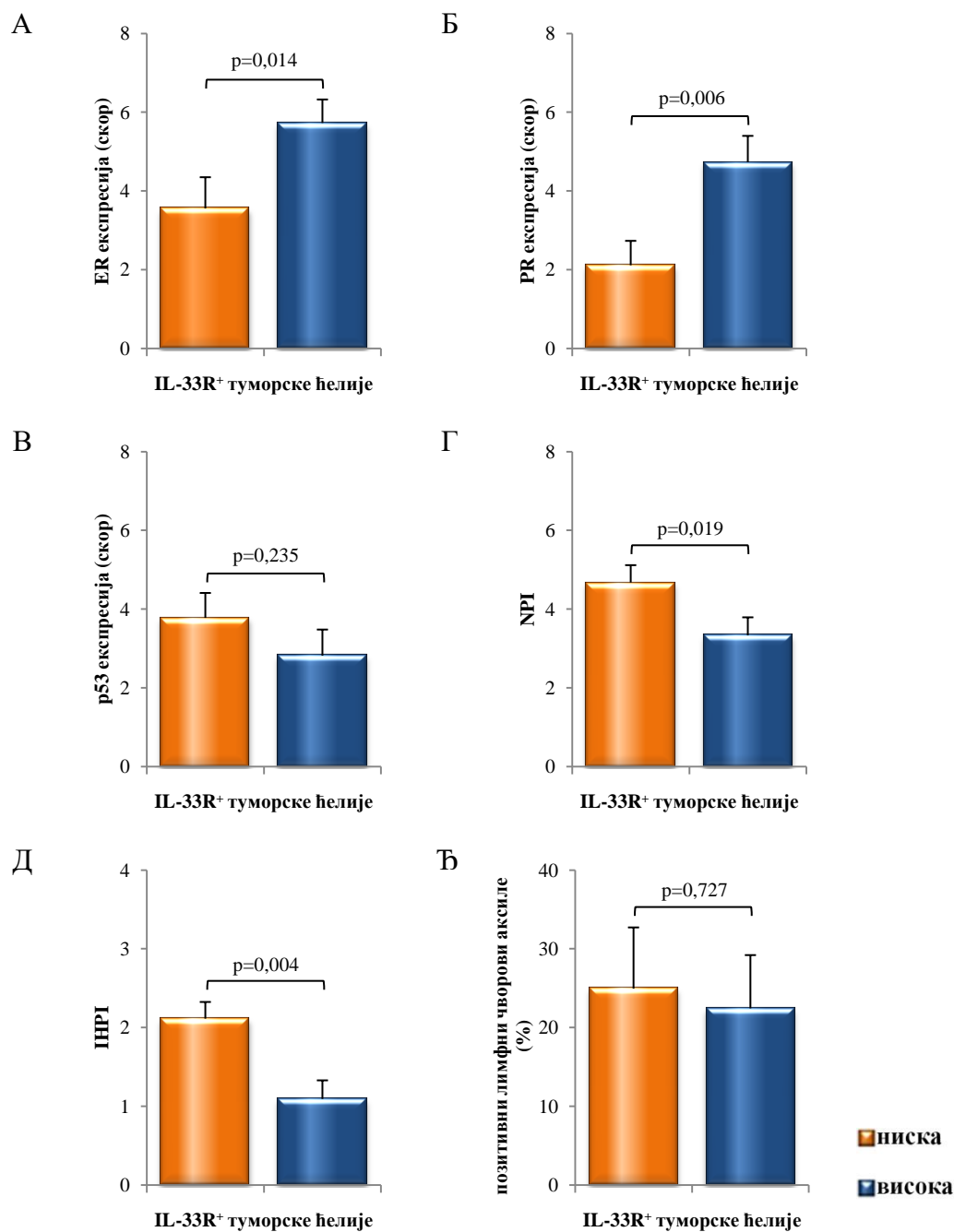
Табела 18. Заступљеност стандардних патохистолошких параметара карцинома дојке у зависности од експресије IL-33 у ћелијама строме. Студија обухвата 40 пацијенткиња са инвазивним дукталним карциномом дојке које су категорисане у групу са ниском (n=12) и високом експресијом (n=28) IL-33 у ћелијама строме. Анализирани параметри су одређивани микроскопском анализом ткивних пресека бојених стандардном хематоксилин-еозин методом. Статистичка значајност је тестирана  $\chi^2$  тестом.

#### 4.11. Висока експресија IL-33R у туморским ћелијама карцинома дојке указује на биолошки мање агресивну форму тумора

Пацијенте са тумором дојке класификовали смо у две групе на основу степена експресије IL-33R у туморским ћелијама. Према граничној вредности нашег истраживања, групу тумора са ниском експресијом ( $n=16$ ) чинили су они са  $<22,5\%$  IL-33R<sup>+</sup> туморских ћелија, насупротив групи са високом експресијом ( $n=24$ ) у којима је детектовано  $\geq 22,5\%$  позитивних туморских ћелија. Експресија ER је значајно већа у групи карцинома са повећаном ( $5,72 \pm 0,60$ ) у односу на карциноме са ниском експресијом IL-33R у туморским ћелијама ( $3,56 \pm 0,79$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,014$ ) (Фигура 24А). Такође, експресија PR је значајно већа у групи карцинома са високом експресијом туморског IL-33R ( $2,11 \pm 0,62$  vs.  $4,73 \pm 0,67$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,006$ ) (Фигура 24Б). Анализом експресије HER2, нисмо утврдили статистички значајну разлику у процентуалној заступљености HER2 позитивних карцинома, у зависности од степена експресије IL-33R ( $\chi^2$  тест,  $p=0,131$ ). У групи карцинома са ниском експресијом IL-33R у туморским ћелијама, средња вредност Allred скора за p53 није била статистички значајно већа ( $3,77 \pm 0,63$ ) у односу на карциноме са повећаном експресијом IL-33R у туморским ћелијама ( $2,82 \pm 0,66$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,235$ ) (Фигура 24В).

Статистички значајно већа вредност NPI је забележена у групи карцинома са ниском експресијом туморског IL-33R ( $4,68 \pm 0,44$  vs.  $3,34 \pm 0,46$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,019$ ) (Фигура 24Г). У складу са овим налазом, средња вредност INPI је била већа у истој групи карцинома ( $2,11 \pm 0,21$ ), у поређењу са групом карцинома у чијим ћелијама је детектована висока експресија туморског IL-33R ( $3,34 \pm 0,46$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,004$ ) (Фигура 24Д).

Процент метастатски измењених лимфних чворова аксиле се није значајно разликовао између група тумора са високом ( $22,42 \pm 6,77\%$ ) и ниском ( $24,93 \pm 7,77\%$ ) експресијом IL-33R у туморским ћелијама (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,727$ ) (Фигура 24Ђ). Повезаност експресије IL-33R у туморским ћелијама, са стандардним патохистолошким параметрима, смо анализирали применом  $\chi^2$  теста и резултати су приказани у табели 19.



**Фигура 24. Висока експресија ER и PR, као и мање вредности NPI и I-NPI у карциному дојке са високом експресијом IL-33R у туморским ћелијама.** Имунохистохемијска експресија IL-33R је квантификована у туморским ћелијама као проценат позитивних у односу на укупан број евалуираних ћелија. На основу експресије IL-33R у туморским ћелијама, сви тумори су подељени на групу са ниском (<22,5% позитивних туморских ћелија) (n=18) и високом експресијом (≥22,5% позитивних туморских ћелија) (n=22). А.-Г. Експресије ER, PR и p53 белега су анализирани имунохистохемијском методом. Вредност NPI скова је израчунавана према формули: 0,2 x величина тумора(cm) + градус(1-3) + нодални статус. I-NPI скор је израчунаван сабирањем појединачних скова за туморску позитивност на ER, PR, HER2 и p53 белеге. Резултати су приказани као аритметичка средина ± SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

| Експресија IL-33R у туморским ћелијама              |                  |              |              |              |
|---|------------------|--------------|--------------|--------------|
| ВАРИЈАБЛА   |                  | НИСКА        | ВИСОКА       | p            |
| <b>HER2</b>   | <i>Негативни</i> | 12 (37,5%)   | 20 (62,5%)   | 0,131        |
|   | <i>Позитивни</i> | 6 (75,0%)    | 2 (25,0%)    |              |
| <b>Хистолошки градус</b>                            | <i>I+II</i>      | 6 (25,0%)    | 18 (75,0%)   | <b>0,005</b> |
|   | <i>III</i>       | 12 (75,0%)   | 4 (25,0%)    |              |
| <b>Нуклеарни градус</b>                             | <i>I+II</i>      | 5 (21,7%)    | 18 (78,3%)   | <b>0,002</b> |
|   | <i>III</i>       | 13 (76,5%)   | 4 (23,5%)    |              |
| <b>Митотски индекс</b>                              | <i>I+II</i>      | 16 (44,4%)   | 20 (55,6%)   | 0,832        |
|   | <i>III</i>       | 2 (50,0%)    | 2 (50,0%)    |              |
| <b>Инвазија крвних судова</b>                       | <i>Негативни</i> | 12 (46,2%)   | 14 (53,8%)   | 0,842        |
|   | <i>Позитивни</i> | 6 (42,9%)    | 8 (57,1%)    |              |
| <b>Инвазија лимфних судова</b>                      | <i>Негативни</i> | 6 (37,5)     | 10 (62,5%)   | 0,650        |
|   | <i>Позитивни</i> | 12 (50,0%)   | 12 (50,0%)   |              |
| <b>Перинеурална инвазија</b>                        | <i>Негативни</i> | 0 (0%)       | 6 (100%)     | <b>0,050</b> |
|   | <i>Позитивни</i> | 18 (52,9%)   | 6 (47,1%)    |              |
| <b>Стромална мононукларна реакција</b>              | <i>I+II</i>      | 16 (47,1%)   | 18 (52,9%)   | 0,859        |
|   | <i>III</i>       | 2 (33,3%)    | 4 (66,7%)    |              |
| <b>Статус аксиларних лимфних нодуса</b>             | <i>Негативни</i> | 8 (40,0%)    | 12 (60,0%)   | 0,751        |
|   | <i>Позитивни</i> | 10 (50,0%)   | 10 (50,0%)   |              |
| <b>Процент позитивних аксиларних лимфних нодуса</b> |                  | 24,93 ± 7,77 | 22,42 ± 6,77 | 0,727        |
| $\chi^2$ тест                                       |                  |              |              |              |

Табела 19. Заступљеност стандардних патохистолошких параметара карцинома дојке у односу на експресију IL-33R у туморским ћелијама. Студија обухвата 40 пацијенткиња са инвазивним дукталним карциномом дојке које су категорисане у групу са ниском (n=18) и високом експресијом (n=22) IL-33R у туморским ћелијама. Анализирани параметри су одређивани микроскопском анализом ткивних пресека бојених стандардном хематоксилин-еозин методом. Статистичка значајност је тестирана  $\chi^2$  тестом.

#### 4.12. Висока експресија IL-33R у ћелијама строме указује на биолошки агресивну форму карцинома дојке

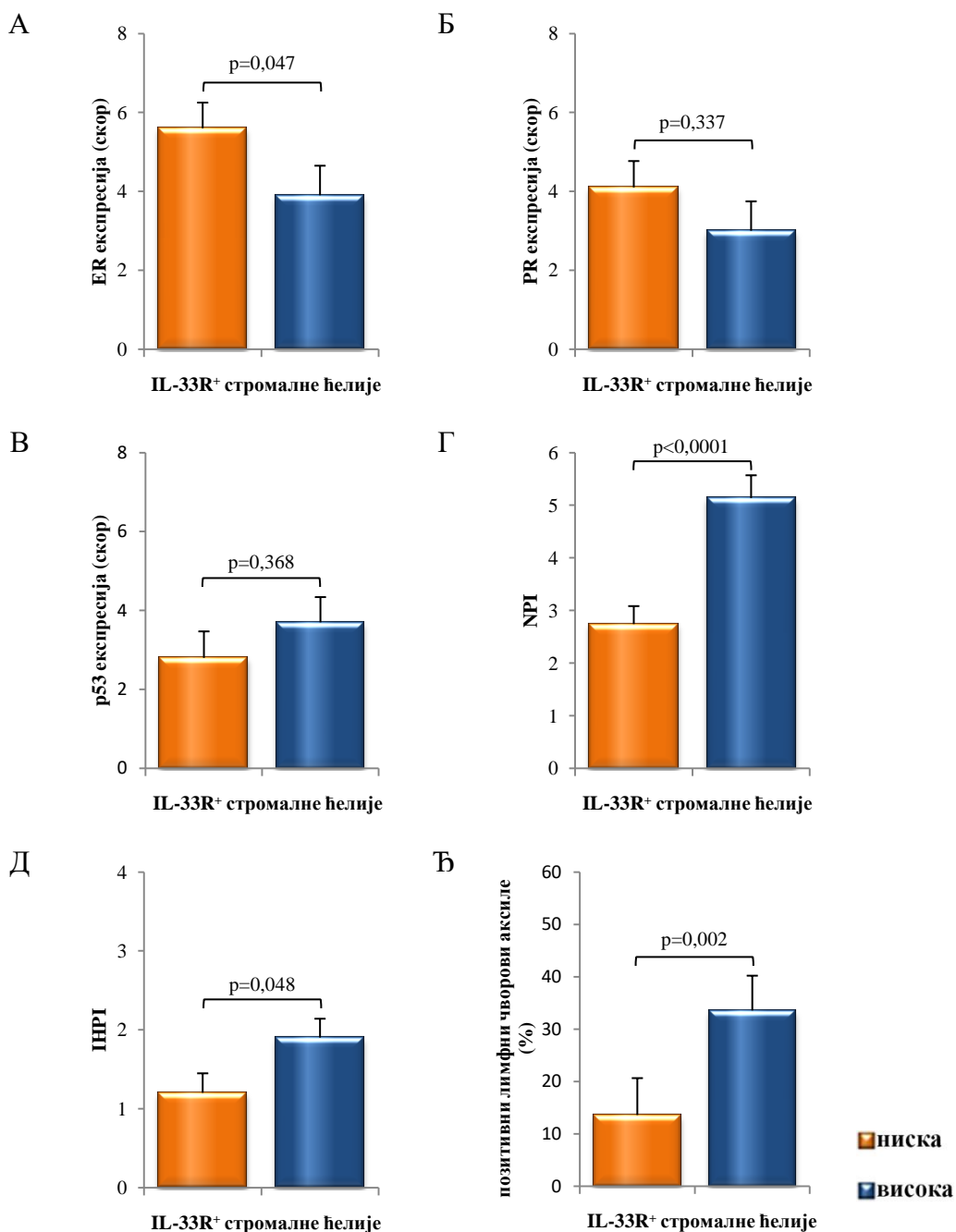
Пацијенте са тумором дојке класификовали смо у две групе на основу степена експресије IL-33R у ћелијама туморске строме. Према граничној вредности нашег истраживања, група тумора са ниском експресијом ( $n=20$ ) је подразумевала ткива са  $<13,75\%$  IL-33R<sup>+</sup> стромалних ћелија, на супрот групи са високом експресијом ( $n=20$ ) у којима је детектовано  $\geq 13,75\%$  IL-33R позитивних ћелија строме. Експресија ER је била статистички значајно већа у групи карцинома са ниском ( $5,6 \pm 3,9$ ) у односу на карциноме са високом експресијом IL-33R у ћелијама строме ( $3,9 \pm 0,75$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,047$ ) (Фигура 25А). Разлика у средњој вредности скорa за експресију PR није се статистички значајно разликовала између ове две групе ( $4,1 \pm 0,67$  vs.  $3,0 \pm 0,75$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,337$ ) (Фигура 25Б). Анализом експресије HER2, нисмо утврдили статистички значајну разлику у процентуалној заступљености позитивних карцинома, у зависности од степена експресије IL-33R у стромалним ћелијама ( $\chi^2$  тест,  $p=0,236$ ). Средња вредност Allred скорa за p53 није се значајно разликовала између карцинома са ниском ( $2,8 \pm 0,67$ ) и високом експресијом IL-33R у стромалним ћелијама ( $3,7 \pm 0,64$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,368$ ) (Фигура 25В).

Статистички значајно већа вредност NPI је забележена у групи карцинома са високом експресијом стромалног IL-33R ( $2,74 \pm 0,34$  vs.  $5,14 \pm 0,43$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p<0,0001$ ) (Фигура 25Г). Средња вредност INPI је била статистички значајно већа у групи карцинома са високом ( $1,9 \pm 0,24$ ), у поређењу са групом карцинома у чијим ћелијама је детектована ниска експресија стромалног IL-33R ( $1,2 \pm 0,25$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=0,048$ ) (Фигура 25Д).

Код пацијената са високом експресијом IL-33R у ћелијама туморске строме, забележен је значајно већи, проценат метастатски измењених лимфних чворова аксиле ( $33,53 \pm 6,66\%$ ) у односу на групу тумора у којима је детектован низак ниво експресије IL-33R ( $13,57 \pm 7,05\%$ ) (Mann Whitney-јев тест,  $p=$ ) (Фигура 25Ђ).

Повезаност експресије IL-33R у ћелијама строме са стандардним патохистолошким параметрима смо анализирали применом  $\chi^2$  теста и резултати су приказани у табели 20.





**Фигура 25. Мања вредност ER и веће вредности NPI и IHPN у туморском ткиву пацијената са високом експресијом IL-33R у ћелијама туморске строме.** Имунохистохемијска експресија IL-33R је квантификована у ћелијама туморске строме као проценат позитивних у односу на укупан број евалуираних ћелија. На основу експресије IL-33R у ћелијама строме, сви тумори су подељени на групу са ниском (<13,75% позитивних туморских ћелија) (n=20) и високом експресијом (≥13,75% позитивних туморских ћелија) (n=20). **А.-Г.** Експресије ER, PR и p53 белега су анализирани имунохистохемијском методом. Вредност NPI скова је израчунавана према формули: 0,2 x величина тумора(cm) + градус(1-3) + нодални статус. IHPN скор је израчунаван сабирањем појединачних скова за туморску позитивност на ER, PR, HER2 и p53 белеге. Резултати су приказани као аритметичка средина ± SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

| Експресија IL-33R у ћелијама строме     |                  |            |            |              |
|---|------------------|------------|------------|--------------|
| ВАРИЈАБЛА                               |                  | НИСКА      | ВИСОКА     | p            |
| <b>HER2</b>                             | <i>Негативни</i> | 18 (56,3%) | 14 (43,8%) | 0,236        |
|   | <i>Позитивни</i> | 2 (25,0%)  | 6 (75,0%)  |              |
| <b>Хистолошки градус</b>                | <i>I+II</i>      | 16 (66,7%) | 8 (33,3%)  | <b>0,024</b> |
|   | <i>III</i>       | 4 (25,0%)  | 12 (75,0%) |              |
| <b>Нуклеарни градус</b>                 | <i>I+II</i>      | 15 (65,2%) | 8 (34,8%)  | 0,055        |
|   | <i>III</i>       | 5 (29,4%)  | 12 (70,6%) |              |
| <b>Митотски индекс</b>                  | <i>I+II</i>      | 20 (55,6%) | 16 (44,4)  | 0,114        |
|   | <i>III</i>       | 0 (0%)     | 4 (100%)   |              |
| <b>Инвазија крвних судова</b>           | <i>Негативни</i> | 16 (61,5%) | 10 (38,5%) | 0,097        |
|   | <i>Позитивни</i> | 4 (28,6%)  | 10 (71,4%) |              |
| <b>Инвазија лимфних судова</b>          | <i>Негативни</i> | 12 (75,0%) | 4 (25,0%)  | <b>0,024</b> |
|   | <i>Позитивни</i> | 8 (33,3%)  | 16 (66,7%) |              |
| <b>Перинеурална инвазија</b>            | <i>Негативни</i> | 6 (100%)   | 0 (0%)     | <b>0,027</b> |
|   | <i>Позитивни</i> | 14 (41,2%) | 20 (58,8%) |              |
| <b>Стромална мононукларна реакција</b>  | <i>I+II</i>      | 20 (58,8%) | 14 (41,2%) | <b>0,027</b> |
|   | <i>III</i>       | 0 (0%)     | 6 (100%)   |              |
| <b>Статус аксиларних лимфних нодуса</b> | <i>Негативни</i> | 16 (80,0%) | 4 (20,0%)  | <b>0,001</b> |
|   | <i>Позитивни</i> | 4 (20,0%)  | 16 (80,0%) |              |
| <i>χ<sup>2</sup> тест</i>               |                  |            |            |              |

Табела 20. Заступљеност стандардних патохистолошких параметара карцинома дојке у односу на експресију IL-33R у ћелијама строме. Студија обухвата 40 пацијенткиња са инвазивним дукталним карциномом дојке које су категорисане у групу са ниском (n=20) и високом експресијом (n=20) IL-33R у ћелијама строме. Анализирани параметри су одређивани микроскопском анализом ткивних пресека бојених стандардном хематоксилин-еозин методом. Статистичка значајност је тестирана  $\chi^2$  и *Mann Whitney*-јевим тестом.

## ДИСКУСИЈА

У до сада објављеној и нама доступној литератури није испитана улога сигналног пута IL-33/IL-33R у развоју некрозе у тумору. Наша студија по први пут показује да делеција гена за IL-33R значајно убрзава развој некрозе у ткиву примарног карцинома дојке. Присуство IL-33R праћено је смањеном некрозом и убрзаним растом тумора. Уз то, наша студија је показала истовремено присуство и природу повезаности експресије IL-33 и IL-33R у туморским и ћелијама строге карцинома дојке.

Први део истраживања базиран је на испитивању да ли недостатак сигналног пута IL-33/IL-33R утиче на биологију тумора и генезу некрозе у анималном моделу 4T1 карцинома дојке. Показали смо да је делеција гена за IL-33R повезана са споријим растом примарног тумора, промоцијом некрозе и смањеном експресијом проангиогених IL-33 и VEGF-a (енгл. *Vascular endothelial growth factor*) у туморским ћелијама.

Други део истраживања је усмерен на анализу експресије IL-33 и IL-33R у туморским и ћелијама строге хуманог тумора дојке, у зависности од присуства некрозе као и њихову повезаност са експресијом VEGF-a и MVD (енгл. *Microvessel density*). Овај део истраживања је потврдио налазе на експерименталном моделу и показао повећану експресију IL-33, IL-33R и VEGF-a у туморима без детектибилних поља некрозе, позитивну корелацију експресије IL-33 и VEGF-a, као и инверзну корелацију експресије IL-33 и IL-33R у туморским и ћелијама строге у хуманом карциному дојке.

У трећем делу наше студије анализирали смо повезаност некрозе, као и експресије IL-33 и IL-33R са стандардним клиничкопатолошким параметрима у хуманом карциному дојке. Добијени подаци указују да је смањена експресија IL-33, IL-33R и VEGF-a повезана са повољнијим исходом болести.

## 5.1 *In vivo* ефекат одсуства рецептора за IL-33 на настанак некрозе у тумору дојке

### 5.1.1. Делетија гена за IL-33R појачава некрозу и успорава раст мишијег тумора дојке.

Процентуалну заступљеност некрозе у туморском ткиву смо квантификовали применом програмског пакета *Image Pro Plus* (*Image Pro Plus v.6.0.0.206*, Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA). Коришћењем посебно креираног алгоритма, у овом програму могуће је прецизно обележавање и мерење површина чиме се смањује могућност прављења грешке, што повећава валидност резултата. Генерисани подаци су приказани процентуално, као удео ткива захваћен некрозом у односу на целокупни ткивни пресек. Према подацима у доступној литератури, наша студија је прва у којој је овај софтвер коришћен на овај начин. Стандардно, примена *Image Pro Plus* пакета је усмерена на анализе материјала и прорачуне у инжењерингу. Како до данас не постоји стандардизован и генерално прихваћен метод за хистоморфометрију и аутоматску и/или полуаутоматску имунохистохемијску квантификацију, овај метод би по својој прецизности и лакоћи коришћења могао да замени друге, знатно скупље програмске пакете.

Многи фактори утичу на исход болести код оболелих од карцинома дојке, укључујући проангиогене и имуно-регулаторне медијаторе (713). У нашој студији, користећи мишеве дефицијентне за IL-33R на BALB/c подлози, показали смо да делетија гена за овај рецептор промовише некрозу у туморском ткиву (Фигура 3Г). Овакви налази указују на нов механизам којим IL-33 утиче на прогресију тумора. Раније студије су показале да осовина IL-33/IL-33R супримира урођени антитуморски имунски одговор и промовише неоангиогенезу (708) (200). Добијени резултати показују појачану туморску некрозу у примарном тумору дојке IL-33R<sup>-/-</sup> мишева (Фигура 3Г и Слика 4) што је повезано са смањеном експресијом проангиогених фактора попут IL-33 и VEGF-а (Фигура 6Б и 8А). Поред тога, присуство некрозе у туморима дојке индукованим у нашим експериментима је повезано и са споријим растом тумора код IL-33R<sup>-/-</sup> мишева (Фигура 1, 2 и 3). Значај некрозе у расту тумора и настанку метастаза је још увек предмет испитивања (714,715). Познато је да појава некрозе у примарном тумору дојке представља саставни део биологије тумора и у већем броју истраживања је повезивана са неповољним исходом болести (212,509,529,712). Карактеристична је за мали број инвазивних дукталних

карцинома дојке без специфичности, туморе високог градуса као и друге хистолошке подтипове карцинома дојке (716). Студије које су се бавиле проучавањем и поређењем клиничкопатолошких карактеристика карцинома дојке су указале на биолошки и прогностички значај централне ацелуларне зоне, оивичене некротичним или фиброзним ткивом, због чега су ове туморе издвојиле у посебну подгрупу (717-725). Изучавајући прогностички значај некрозе у инвазивном дукталном карциному дојке потврђено је да ови тумори показују повећан метастаски потенцијал као и ризик за настајање удаљених метастаза у плућима и мозгу (716). Код пацијената са некрозом у туморском ткиву, забележено је скраћено укупно преживљавање у поређењу са пацијентима код којих су дијагностиковани инвазивни дуктални карциноми, без обзира на хистолошки градус (716). Досадашње студије су користиле различите критеријуме за класификовање карцинома у групу тумора са екстензивном некрозом, попут: присуства некрозе у више од 30% туморског ткива (720), присуство некрозе у више од 70% попречног пресека туморског ткива (721) или детектовање некротичних подручја микроскопском анализом ткивног пресека тумора на малом микроскопском увећању (722). Највећи број карцинома у којима су детектована поља некрозе се на основу молекуларне класификације сврставају у групу *basal like* карцинома дојке (418,725,726) и повезани су са активацијом онкогена Ras и лошом прогнозом болести (725). Од раније је познато да тумори са екстензивном некрозом показују значајно бржи раст, одсуство експресије хормонских рецептора и високу пролиферативну активност (717,721-724,727). Независно од хистолошког градуса коме припадају, тумори са присутном некрозом корелирају са скраћеним преживљавањем оболелих (716).

Други аутори су показали да некроза може настати као резултат доброг терапијског одговора на примену различитих видова онколошког лечења (508,518-523,529,728). Бројне клиничке студије су показале да је некроза чешћа од апоптозе као одговор на примењену антитуморску терапију као и да степен некрозе корелира са терапијским одговором (729,730). На основу налаза у којима је забележено да некроза представља повољан терапијски одговор на примену „стандардних“ хемотерапеутика, америчка Управа за храну и лекове (енгл. *Food and Drug Administration, FDA*) је последњих година одобрила употребу антитуморског агенса под именом *Topotecan*. За овај препарат је показано да изазива туморску некрозу повећавајући експресију протеина из групе главног

хистокомпатибилног комплекса класе I (енгл. *Major histocompatibility complex*, MHC1) и последично појачаног ослобађања цитокина, што резултира стимулацијом имунског одговора и смрћу туморских ћелија (731). Од раније је познато да „стандардни“ терапеутик, *Doxorubicin*, у условима *in vitro* индукује апоптозу (732) као и некрозу (733). Појава некрозе као одговор на терапију базирану на примени антрациклина је потврђена микроскопском анализом ткивних узорака туморског ткива након примене терапије *Doxorubicin*-ом и *Docetaxel*-ом (734). Терапијски одговор у виду појачавања туморске некрозе може објаснити ефикасност хемиотерапије код карцинома код којих су присутне мутације p53 и ослабљен апоптотски потенцијал (735). Поред тога, студије су показале да радиотерапија проузрокује туморску некрозу и активира антитуморски имунски одговор (731).

Наши резултати указују на потенцијално нов механизам којим је IL-33 укључен у процес карциногенезе. У студији је показано да делеција гена за IL-33R промовише некрозу у карциному дојке индукованом у мишева. Појачана некроза у IL-33R<sup>-/-</sup> мишева настаје као последица смањене експресије снажних проангиогених фактора IL-33 и VEGF-a, што је праћено споријим растом примарног тумора.

### 5.1.2. Експресија IL-33 у туморским ћелијама позитивно корелира са растом тумора у IL-33R<sup>+/+</sup> али не и у IL-33R<sup>-/-</sup> мишева

Након апликације туморских ћелија 4T1 у IL-33R<sup>+/+</sup> и IL-33R<sup>-/-</sup> мишева, свакодневном палпацијом је праћена појава палпабилног тумора. Као и у претходним експериментима у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева је забележен бржи раст тумора, услед чега су палпабилни тумори у овој групи раније детектовани. Мишеви обе групе су жртвовани почев од дана појаве палпабилног тумора, а затим у једнаким временским интервалима од три дана, током наредних 12 дана. Имунохистохемијска анализа експресије IL-33 у туморима IL-33R<sup>+/+</sup> и IL-33R<sup>-/-</sup> мишева је показала да експресија IL-33 расте током периода праћења у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева, док је у групи IL-33R<sup>-/-</sup> релативно константна почев од нултог па до 12. дана. Поредили смо разлику у експресији IL-33 у туморима IL-33R<sup>+/+</sup> и IL-33R<sup>-/-</sup> мишева, без обзира на дан када су жртвовани. Анализом смо потврдили претходни резултат и закључили да присуство IL-33R појачава експресију IL-33 у туморским ћелијама (Фигура

6A), што говори у прилог позитивној повратној спрези IL-33/IL-33R осовине. Да бисмо испитали када настаје значајна разлика у експресији IL-33 у туморима IL-33R<sup>+/+</sup> мишева, поделили смо их на групу која је жртвована до седмог и од осмог дана након појаве палпабилног тумора. Наша анализа је показала да тумори екстирпирани у IL-33R<sup>+/+</sup> животиња након осмог дана од појаве палпабилног тумора, показују значајно већу експресију IL-33 у туморским ћелијама у односу на мишчеве жртвоване до седмог дана.

Сумарно, експресија IL-33 је значајно већа у туморима IL-33<sup>+/+</sup> мишева, што потврђује позитивну повратну спрегу IL-33 и IL-33R у туморском ткиву.

Анализирајући хумане карциноме дојке *Liu* и сарадници (170) су утврдили да тумори већег пречника показују повећану цитоплазматску експресију IL-33. Иако разлика није била статистички значајна, резултат је делимично у складу са нашим резултатом добијеним у строго контролисаним експерименталним условима на IL-33<sup>+/+</sup> мишевима. Испитујући експресију IL-33 у туморима дојке индукованим ћелијском линијом 4T1, *Gao* и сарадници (193) су потврдили присуство јаке интрацелуларне експресије IL-33. Као додатак ранијим истраживањима, наши резултати показују да експресија IL-33 расте са прогресијом примарног тумора што представља саставни део механизма којим тумори у одређеним условима обезбеђују преживљавање. Биолошки агресивне форме карцинома попут тумора високог градуса или тумори у којима су присутна поља некрозе показују смањену експресију интрацелуларног IL-33. Сви налази заједно указују да туморске ћелије током раста појачано продукују IL-33 који се ослобађа у стању хроничне хипоксије и некрозе. Секретован из некротичних и/или живих ћелија, IL-33 алармира ћелије тумора, строме, перитуморског ткива и имунског система чиме стимулише механизме који обезбеђују преживљавање туморских ћелија. Наши резултати указују да се продукција IL-33 у ћелијама тумора делимично одвија активацијом IL-33R. Све ове студије указују на различите ефекте интрацелуларног и секретованог IL-33.

### 5.1.3. Експресија IL-33 и VEGF-а у туморским ћелијама негативно корелира са степеном некрозе тумора

Примарни тумори добијени у IL-33R<sup>-/-</sup> мишева показали су нижи степен експресије VEGF-а у туморским ћелијама што указује на повезаност активације сигналног пута IL-33/IL-33R и експресије VEGF-а (Фигура 8А и Слика 5). Такође, експресија IL-33 и VEGF-а у туморским ћелијама анималног карцинома дојке је међусобно у позитивној корелацији (Фигура 8Г и 10Г). Сумирањем резултата на туморима добијеним у мишева, закључили смо да инхибиција сигналног пута IL-33/IL-33R појачава некрозу, а да је један од разлога смањена продукција VEGF-а у туморским ћелијама.

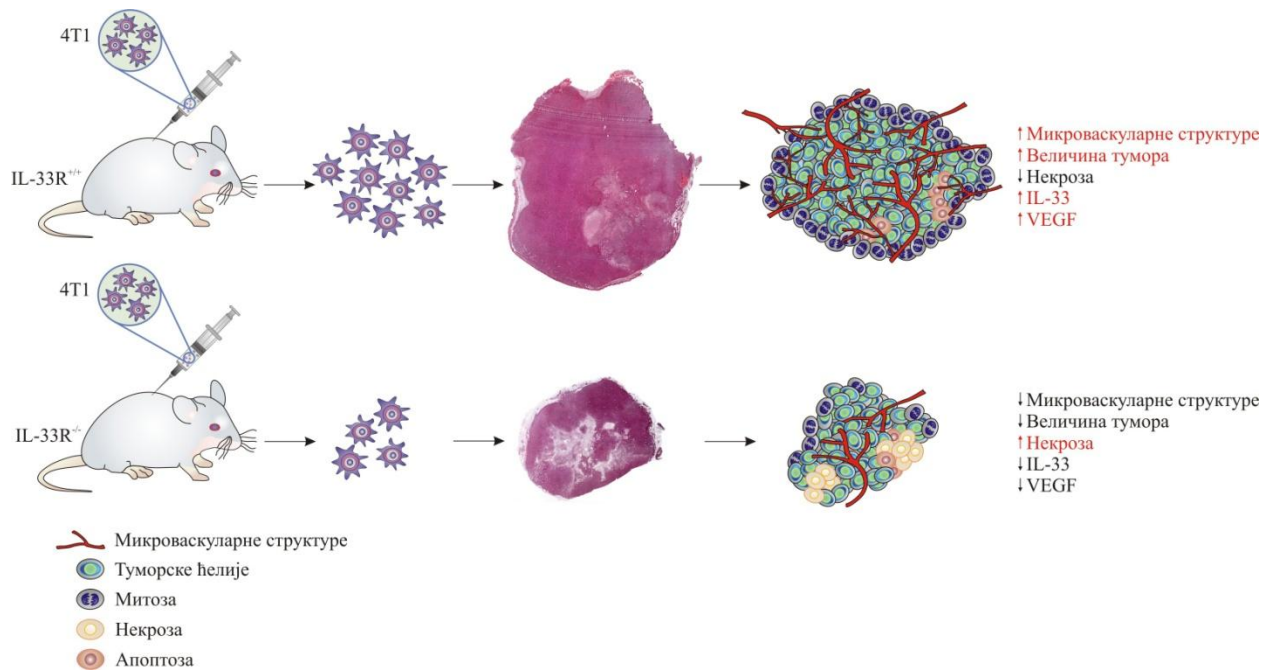
Наши резултати показују да атенуација IL-33 може имати терапијски потенцијал не само стимулацијом урођеног антитуморског имунског одговора, што је показано ранијим истраживањима, већ и промовисањем некрозе која је повезана са смањеном експресијом VEGF-а, снажног проангиогеног фактора раста (736,737). Слични резултати су добијени на мишјем моделу метастатског карцинома дојке у којем је комбиновани терапијски приступ блокадом VEGFR2 и HER2 био праћен аваскуларним ефектом и повећањем некрозе унутар метастатских лезија уз смањену MVD у односу на контролну групу мишева (738). Додатно, присуство туморске некрозе може да појача антитуморски имунски одговор (531,712), тако што некротичне ћелије фацилитирају сазревање ћелија које презентују антигене Т лимфоцитима, што последично индукује потентнији антитуморски имунски одговор (739). Иmunски одговор је профилисан молекулима које ослобађају некротичне ћелије као и врстом присутних ћелија унутар и око туморског ткива (неутрофили, макрофаги, лимфоцити итд.) (508). Ранија истраживања су показала да ћелије захваћене некрозом имају значајно већи потенцијал у индукцији антитуморског имунског одговора у односу на апоптотичне ћелије (739). Ћелије захваћене апоптозом промовишу секрецију цитокина из APC који инхибирају тип 1 имунски одговор (740). Насупрот томе, некротичне туморске ћелије потенцирају сазревање дендритских ћелија и оптималну презентацију туморских антигена (739). Физиолошки значај овог механизма се огледа током бактеријских и вирусних инфекција, као и траума када јаки стимулуси који настају услед некрозе мобилишу ћелије имунског система и то превасходно дендритске ћелије, моноците и неутрофиле (508). Сходно томе, промоција некрозе у тумору дебелог



црева у условима *in vivo* значајно ублажава прогресију болести и то деплецијом цитохрома-с који је важна компонента апоптозе (741). Прогресија и метастазирање тумора зависе од имунског одговора, што је потврђено студијама у којима су коришћене имунодефицијентне животиње (533). Апликација туморских ћелија са деплецијом цитохрома-с у ових животиња показала је идентичну брзину раста као и код контролне групе (533). Ћелије захваћене некрозом ослобађају велики број сигналних молекула попут протеина високе мобилности групе В1 (енгл. *High mobility group box 1*, HMGB1), протеина топлотног шока 70 (енгл. *Heat shock protein 70*, Hsp70), калретикулина и мокраћне киселине (533). Када доспеју у екстрацелуларни простор, ови молекули активирају APC укључујући и дендритске ћелије (533). Протеин HMGB1 је снажан проинфламацијски фактор који се ослобађа из некротичних ћелија, док је током апоптозе снажно везан за хроматин (742). Може се везати за TLR4 или за рецепторе крајњих производа гликације (енгл. *Receptor for advanced glycation end products*, RAGE) (508). Осим тога, HMGB1 има снажно адјувантно дејство заједно са протеинима топлотног шока и мокраћном киселином ослобођеним из некротичних ћелија. Важна улога у инфламацији се приписује Hsp70 (743). Повишен ниво овог протеина у некротичним, неопластичним, ћелијама значајно повећава имуногеност, промовисањем тип 1 одговора и сазревањем APC (739). Стога, Hsp70 није само маркер некрозе већ и специфичан сигнал за имунски систем (744). Макрофаги и дендритске ћелије активирани молекулима ослобођеним из некротичних ћелија, смањено секретују анти-инфламацијске цитокине (IL-10, TGF- $\beta$ ), док ослобађају проинфламацијске медијаторе (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP-2, IL-8) и хемокине (508). Услед изложености факторима који су ослобођени из некротичних ћелија, дендритске ћелије сазревају и експримирају карактеристичне маркере (CD40, CD80, CD86), костимулаторне молекуле (B7.1, B7.2) и стимулишу пролиферацију Т лимфоцита (508). *Proskuryakov* и сарадници (508) су у својој студији показали да имунизација експерименталних животиња дендритским ћелијама уз апликацију некротичних туморских ћелија успорава туморски раст.

Наши резултати указују да делеција гена за IL-33R као и смањена експресија IL-33, поред улоге у антитуморском имунском одговор, што је познато од раније, истовремено промовишу развој некрозе. Некроза је вероватно последица смањене експресије VEGF-а. Некроза може да фацитира анти-туморски имунски одговор што је још један од

потенцијалних механизма који „стоје“ иза споријег раста тумора у IL-33R<sup>-/-</sup> мишева, а које одликује веће поље некрозе (Слика 11).



**Слика 11. Значај активације IL-33/IL-33R сигналног пута у биологији туморске некрозе, ангиогенезе и расту тумора.** Тумор дојке индукован линијом 4Т1 у IL-33R<sup>-/-</sup> мишева карактерише спорији раст уз већи степен туморске некрозе, на супрот тумору у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева. Експресија IL-33 и VEGF је нижа у ћелијама тумора индукованих у IL-33R<sup>-/-</sup> мишева. Смањена експресија проангиогених IL-33 и VEGF је праћена слабијом васкуларизацијом тумора. Налази указују да активација сигнализације IL-33/IL33R, инхибира некрозу а промовише ангиогенезу и раст тумора.

## **5.2. Улога експресије IL-33 и IL-33R у настанку некрозе и ангиогенезе у хуманом карциному дојке. Повезаност са клиничкопатолошким параметрима**

### **5.2.1. Експресија IL-33, IL-33R и VEGF-а је негативно повезана са присуством некрозе у хуманом карциному дојке**

Резултати добијени у експерименталном моделу 4T1 карцинома дојке тестирани су на туморском ткиву пацијената. Анализирано је укупно 40 пацијенткиња са карциномом дојке које су у зависности од присуства некрозе у туморском ткиву класификоване на две групе (са и без некрозе). У анализираним групама није било значајне разлике у старосној доби, величини тумора и стадијуму болести према AJCC (енгл. *American Joint Committee on Cancer*) критеријумима (Табела 15). Анализом смо утврдили да је величина некрозе у примарном тумору дојке негативно повезана са експресијом IL-33, IL-33R и VEGF-а у туморским ћелијама. Експресија IL-33, IL-33R и VEGF-а у туморским ћелијама била је значајно нижа у туморима са детектабилним пољем некрозе у поређењу са туморима без видљивог поља некрозе (Фигура 10А-В). Такође, експресија IL-33 и IL-33R је позитивно повезана са експресијом VEGF-а у туморским ћелијама (Фигура 10Г и Д).

Слично VEGF-у, IL-33 олакшава пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија као и пропустљивост крвних судова у условима *in vitro*. Ову улогу, према досадашњим студијама IL-33, вероватно обавља независно од VEGF-а (104). Одсуство проангиогених фактора попут IL-33 и VEGF-а води у хроничну исхемију и хипоксију, што последично може резултовати туморском некрозом (105,106,712). До данас, истраживања нису показала који од ова два проангиогена фактора има већи значај у развоју локалне туморске неоангиогенезе.

Експресије IL-33 и VEGF-а су у позитивној корелацији у туморским ћелијама хуманог и анималног карцинома дојке (Фигура 8Г и 10Г). Такође, у нашем истраживању смо показали да присуство IL-33R појачава експресију IL-33 (Фигура 6А). На крају у примарним туморима добијеним у IL-33R<sup>-/-</sup> мишева утврдили смо нижи степен експресије

VEGF-a у туморским ћелијама што је указало на повезаност активације сигналног пута IL-33/IL-33R и експресије VEGF-a (Фигура 8А и Слика 5).

Иако је претходно показано да проангиогену улогу IL-33 остварује независно од VEGF-a (104), *Theoharides* и сарадници (105) су у својој студији показали да IL-33 директно олакшава секрецију и експресију VEGF-a у мастоцитима. Раније објављене студије су показале да IL-33 игра важну улогу у формирању капилара и крвних судова (104,745). IL-33 значајно повећава продукцију и присуство u-PA на површини хуманих ендотелних ћелија, потенцирајући његову ангиогену улогу (106). Инхибиција сигналног пута IL-33/IL-33R, коришћењем IL-33R дефицијентних мишева смањује продукцију u-PA у ендотелним ћелијама, што указује да IL-33 овај ефекат остварује везивањем за IL-33R (106). *Stojkovic* и сарадници (106) су по први пут показали да је овај процес u-PA завистан и да изостаје након блокаде његовог рецептора. Блокада u-PA указује да IL-33 ангиогену активност остварује управо преко овог молекула, а независно од ткивног активатора плазминогена (енгл. *Tissue plasminogen activator*, t-PA) као и комплекса матрикс-металопротеиназа (енгл. *Matrix metalloproteinases*, MMP) и ткивних инхибитора металопротеиназа (енгл. *Tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMP) (106). Поред u-PA, IL-33 као IL-1 и TNF (107,108) повећава ниво инхибитора активатора плазминогена (енгл. *Plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1) у ендотелним ћелијама. IL-33 и u-PA су присутни у ендотелним ћелијама атеросклеротских плакова и нивои mRNA за IL-33, sST2 и IL-33R корелирају са mRNA за u-PA (106). Проучавањем хуманог атеросклеротског ткива, иста студија је показала корелацију у експресији u-PA и IL-33, што указује да у хроничном запаљењу попут атеросклеротских лезија, IL-33 може бити укључен у покретање u-PA посредоване неоваскуларизације (106). Раније студије су показале да IL-33 индукује инфламацију ендотелних ћелија (109). Према томе, IL-33 се ослобађа након оштећења ткива и укључен је у u-PA посредовану ангиогенезу која је раније повезивана са процесом инфламације (110). *Theoharides* и сарадници су показали да IL-33 појачава секрецију VEGF-a из ћелија леукемије и нормалних мастоцита повећањем акумулације супстанце P (енгл. *Substance P*, SP) (105). SP је снажан медијатор запаљења (111) који дејство остварује, делимично, након активације мастоцита (113). Укључена је у патогенезу псоријазе (115,116) која се карактерише повећаном васкуларизацијом епидерма, хиперпролиферацијом кератиноцита и снажном запаљењском реакцијом (117). SP позитивна нервна влакна су гушћа у

псоријатичним лезијама уз повећан број мастоцита (118-121). IL-33, као и IL-1, индукује секрецију VEGF-a у мастоцитима и појачава ефекат SP (105,122). Претходно је показано да IL-1 индукује секрецију VEGF-a у леукоцитима (123). Резултати *Theoharides*-а и сарадника (105) потенцирају значај интеракције између SP, IL-33 и мастоцита у процесу ангиогенезе. Делујући заједно са IgE, IL-33 ослобођен из епителних и ендотелних ћелија активира мастоците у здравој кожи (32,124). Активирани мастоцити ослобађају хистамин и интерлеукине и последично стимулишу синтезу и ослобађање SP из неурона (105). Поред тога, у псоријазу потенцијални извор IL-33 могу да буду леукоцити, пролиферишући кератиноцити, као и ендотелне ћелије новонасталих крвних судова (105). На овај начин IL-33 индукује ослобађање VEGF-a преко SP, чиме се повећава васкуларна пропустљивост и убрзава процес запаљења (105). Раније студије су показале да IL-33 индукује секрецију SP која повећава концентрацију калцијума у цитосолу LAD2 ћелија (125). Овако повишена концентрација калцијума у цитосолу је довољна за синергистичко ослобађање VEGF-a (105).

Слично налазима из ових студија, могуће је да блокада сигналног пута IL-33/IL-33R смањује експресију VEGF-a у туморским ћелијама, супримира неоангиогенезу и последично поспешује настанак и развој некрозе у туморском ткиву.

### **5.2.2. Експресија VEGF-a у туморским ћелијама позитивно корелира са MVD у перинекротичном рубу хуманог карцинома дојке**

Супротно очекивању, у туморима у којима је детектована некроза забележена је већа MVD (Фигура 11А и Слика 7). Ипак, приметили смо да је највећи број новонасталих крвних судова детектован у перинекротичном рубу туморског ткива. Студије су показале да VEGF игра главну улогу у ангиогенези већине хуманих карцинома (593). Везујући се за свој рецептор, VEGF повећава васкуларну пропустљивост, пролиферацију и преживљавање ендотелних ћелија и потпомаже формирање лумена новонасталих крвних судова. Ослобађа се као одговор на хипоксију и ниску концентрацију кисеоника. Иако је експресија VEGF-a карактеристична углавном за ендотелне ћелије, овај фактор експримирају и неке ћелије имунског система попут макрофага као и самих ћелија тумора. VEGF се експримира у ћелијама тумора плућа, мозга, гастроинтестиналног и урогениталног тракта као и у карциному дојке *in situ* и инвазивном карциному (593). У

неким студијама, експресија VEGF-а је повезана са MVD и прогнозом потенцирајући значај VEGF-а у хуманим малигним болестима (648,651). Висока густина новонасталих крвних судова не мора нужно да буде повезана са појачаним приливом крви унутар тумора, јер су новонастали крвни судови незрели или још чешће оштећеног структурног интегритета (746). Овакви крвни судови пуцају и нису у стању да одрже артеријски притисак унутар тумора, што за последицу има појаву локализованог крварења унутар туморске масе (746). Анастомозе које настају између ових новонасталих крвних судова индукују маневрисање у протоку крви али услед ослабљеног протока нису у стању да обаве адекватно снабдевање туморске масе крвљу (747).

У нашој студији нисмо утврдили повезаност између IL-33, IL-33R и MVD, док је експресија VEGF-а у туморским ћелијама перинекротичног руба у позитивној корелацији са MVD (Фигура 11). Од раније је познато да IL-33 ослобађају оштећене и ћелије захваћене некрозом (748,749). На основу ових закључака и сличних студија, сматрамо да IL-33 ослобођен из ћелија захваћених некрозом поспешује експресију VEGF-а у туморским ћелијама перинекротичног руба и појачава неоангиогенезу, што се манифестује већим MVD у перинекротичној зони хуманог карцинома дојке. Овај резултат указује на додатни механизам којим је сигнални пут IL-33/IL-33R укључен у раст и прогресију тумора. Секретован из живих и/или ослобођен из некротичних ћелија, IL-33 се везује за свој рецептор на ендотелним ћелијама и промовише ангиогенезу и продукцију VEGF-а. Делеција гена за IL-33R или његова блокада, супримира активност сигналног пута IL-33/IL-33R што може имати терапијски значај. Такође, наша студија заснована на експерименталним подацима не искључује механизам којим IL-33 своју проангиогену улогу оставарује независно од VEGF-а.

### 5.2.3. IL-33 је члан IL-1 фамилије цитокина који испољавају снажан ефекат на туморску ангиогенезу

И други чланови IL-1 породице цитокина играју значајну улогу у туморској ангиогенези (748,750,751). Проангиогени ефекат IL-1 $\beta$  укључује директан ефекат IL-1 на пролиферацију и секреторну функцију ендотелних ћелија али и посредовану IL-1 индукујућим ангиогеним факторима, попут базног фактора раста фибробласта (енгл. *Basic fibroblast growth factor*, bFGF) и VEGF-a, које секретују малигне и стромалне ћелије, аутокриним и паракриним механизмом (751). Локална секреција IL-1 $\beta$  проузрокује васкуларизацију тумора са великим и разгранатим крвним судовима што указује на његов снажан проангиогени ефекат, *in vivo* (751). Апликација антагонисте рецептора за IL-1 (енгл. *Interleukin-1 receptor antagonist*, IL-1Ra), инхибира активност овог цитокина и значајно редукује формирање крвних судова у фиброваскуларној строми тумора (752).

Недовољна оксигенација туморског ткива изазива некрозу туморских ћелија и представља иницијални догађај за следствену запаљењску реакцију. Инфилтришући макрофаги на некрозу одговарају продукцијом цитокина и других медијатора са значајним проангиогеним ефектом. *Carmi* и сарадници (751) су показали да ангиогенеза посредована запаљењским одговором може бити покренута директном секрецијом VEGF-a или путем инфламације индуковане IL-1, током које се производе довољне количине VEGF за формирање крвних судова. Овај ефекат може бити проузрокован алтернативном диференцијацијом макрофага у M2 правцу који је карактеристичан за зарастање рана и раст тумора (259,753-762). Макрофаги стимулирани хипоксијом, секретују проангиогене и ангиостатске посреднике. VEGF, IL-1, IL-6 и хемокини попут MIP-1 (енгл. *Macrophage inflammatory protein-1*) и RANTES (енгл. *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*) су проангиогени медијатори, док IP-10, IL-12 и IL-10 имају антиинфламацијско и ангиостатско дејство (751). IL-1 $\beta$  који секретују макрофаги игра суштинску улогу у покретању и развоју ангиогенезе ангажовањем и активацијом других ћелија имунског система и секрецијом цитокина и хемокина. IL-1 $\beta$  и VEGF играју доминантну улогу у инфламацијом посредованој ангиогенези. IL-1 $\alpha$  је важан фактор у ангиогенези услед хипоксије када је секреција IL-1 $\beta$  још увек на субоптималном нивоу (751). Прекомерна секреција IL-1 $\beta$  је праћена растом тумора и корелира са инвазивношћу

и метастазирањем (763). Поред овога, IL-1 $\beta$  индукује експресију хипоксијом индукованог фактора-1 $\alpha$  (енгл. *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*, HIF-1 $\alpha$ ) који је означен као доминантан транскрипциони фактор за VEGF (764). Из тог разлога, студије су истакле значај примене IL-1Ra као инхибитора IL-1 $\beta$  или IL-1 $\alpha$  који је одобрен за ублажавање запаљењске реакције код пацијената са реуматоидним артритисом (748). Са друге стране, његова примена у онкологији може представљати одговарајућу терапијску стратегију у инхибицији туморске ангиогенезе (748).

По својој функцији IL-33 је сличан IL-1. И IL-1 $\beta$  и IL-33 играју снажну проангиогену улогу и контролишу продукцију VEGF-а (175,748,750,751). IL-1 $\beta$  појачава експресију VEGF-а везујући се за његове рецепторе на ендотелним ћелијама, а затим делујући заједно са VEGF-ом поспешује неоангиогенезу у туморском ткиву (748,750,751). Неутрализација сигналног пута IL-1 $\beta$  успорава туморски раст и неоангиогенезу (748,750,751). Како и IL-1 и IL-33 користе исту рецепторску субјединицу (енгл. *Interleukin-1 receptor accessory protein*, IL-1RAcP, IL-1R3) за везивање и следствену сигнализацију. Може се претпоставити да блокада овог рецептора применом анти-IL-1R3 антитела, редукује ангиогенезу и појачава некрозу у карциному дојке због губитка васкуларног снабдевања. Оваква претпоставка је у складу са студијама које су показале високу експресију IL-1R3 у акутној мијелоидној леукемији (749). Наша студија је указала на могући нов механизам којим је сигнални пут IL-33/IL-33R укључен у прогресију тумора.



#### 5.2.4. Инверзна експресија IL-33 и IL-33R у туморским и ћелијама туморске строме

Раније студије су показале да су поред туморских и ћелија имунског система, примарни извор IL-33 епителне ћелије, миофибробласти, фибробласти, адипоцити, глаткомишићне и ендотелне ћелије (17,32) док се IL-33R експримира на ћелијама имунског система, миофибробластима, епителним и ендотелним ћелијама (169). У овој студији анализирали смо експресију IL-33 и IL-33R у туморским и стромалним ћелијама. Упоредили смо експресију наведених белега у односу на врсту ћелија (тумор vs. строма) и у односу на присуство некрозе у тумору. Експресија IL-33 и IL-33R у туморским ћелијама је у инверзној корелацији са експресијом у стромалним ћелијама (Фигура 19). Наше истраживање је показало да тумори у којима су детектована поља некрозе показују већу експресију испитиваних белега у ћелијама строме у односу на туморе у којима некроза није детектована (Фигура 17). Овај налаз је у супротности са експресијом истих маркера у туморским ћелијама (Фигура 10А и 10Б). У прилог овакве тезе иде раније описана функција IL-33 као „алармина“ чија је улога у међусобној комуникацији и обавештавању различитих популација ћелија о оштећењу или смрти ћелија.

Наше истраживање је показало да је експресија IL-33 у туморским ћелијама значајно већа у туморима у којима је ниска експресија IL-33 у стромалним ћелијама (Фигура 19А), док се експресија IL-33R у туморским ћелијама није разликовала у односу на степен експресије IL-33R у ћелијама туморске строме (Фигура 19Б). Поред тога, анализиран је однос између експресије IL-33 и IL-33R у ћелијама строме. Ниска експресија IL-33 у ћелијама туморске строме праћена је већом средњом вредности експресије IL-33R у истим ћелијама (Фигура 19В), као и између високе експресије IL-33R и IL-33 у туморским ћелијама (Фигура 19Г). Насупрот томе, карциноми са ниском стромалном експресијом IL-33R имали су значајно већу експресију IL-33 и IL-33R у туморским ћелијама у односу на групу са високом експресијом IL-33R у ћелијама туморске строме (Фигура 19Д и Ђ).

Резултати студија који показују да је током прогресије болести реципрочна експресија IL-33 у туморским ћелијама (173,176) и ћелијама строме (177,178,181), говоре у прилог хипотезе да хиперекспресија IL-33 у туморским ћелијама промовише Th1 анти-туморски имунски одговор, док стромални IL-33 индукује развој Th2 одговора и имунске толеранције (173).

IL-33 пореклом туморских ћелија је вероватно производ туморске некрозе, која индукује ослобађање многих потентних про-инфламацијских фактора поред IL-33. У овом контексту, провлађује заштитна функција IL-33. Тумори у којима некроза није детектована показују већу експресију IL-33 у туморским ћелијама. Ови тумори имају и бољу прогнозу.

Насупрот томе, стромалне ћелије (имунског система и фибробласти) које продукују IL-33 у туморима истовремено производе низ анти-инфламацијских медијатора, стварајући про-туморску микросредину. У оваквим условима, тумор брже расте а бржи раст тумора карактерише централно некротско поље. Ови тумори имају и лошију прогнозу.

### **5.2.5. Експресије IL-33 и IL-33R су биомаркери туморске некрозе. Некроза је индикатор преживљавања у пацијената са карциномом дојке**

Разматрали смо значај експресије IL-33 и IL-33R у туморским и ћелијама строме, као потенцијалних параметара на основу којих је могуће идентификовати групе тумора са различитим биолошким понашањем и прогнозом. Резултати публикованих студија у погледу директне и индиректне повезаности експресије и серумске концентрације IL-33 и IL-33R са преживљавањем оболелих од карцинома различитих локализација су опречни. Анализа преживљавања у зависности од присуства некрозе у туморском ткиву потврдила је овај параметар као негативан фактор у прогнози болести оболелих од карцинома дојке (765). Поред тога, испитивали смо могућност предвиђања појаве некрозе у туморском ткиву као стандардног негативног прогностичког параметра, на основу експресије IL-33 и IL-33R у туморским и ћелијама туморске строме. Потенцијални значај оваквих налаза односи се на микроскопску анализу ситног биоптичког материјала у ком често нису видљива поља некрозе.

Истакли смо могућу улогу експресије IL-33 као биомаркера за разликовање хуманог карцинома дојке у коме су присутна некротична поља и показали да смањена експресија IL-33 указује на присуство некрозе у тумору (Фигура 12). Анализом и поређењем десетогодишњег преживљавања између група тумора са и без некрозе потврдили смо значај некрозе као параметра који значајно утиче на преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке (Фигура 13А). Иако значајно указује на постојање некрозе у туморима дојке, степен експресије IL-33 значајно не корелира са укупним преживљавањем оболелих

(Фигура 13Б). Експресија IL-33 у ћелијама туморске строме не представља поуздан маркер за постојање некрозе у туморском ткиву и не корелира са десетогодишњим преживљавањем (Фигура 14А и Б).

Резултати ове студије указују на могућу улогу експресије IL-33R у туморским и ћелијама строме као биомаркера за разликовање карцинома у којима су детектабилна поља некрозе. На присуство некрозе у ткиву тумора може да укаже смањена експресија IL-33R у туморским али и повећана експресија IL-33R у ћелијама строме тумора (Фигура 15А и 16А). Иако представљају поуздане белеге за процену некрозе у ткиву карцинома дојке, ниједан од ових параметара није показао значајни утицај и разлику у десетогодишњем преживљавању у зависности од нивоа експресије у туморским и ћелијама туморске строме (Фигура 15Б и 16Б).

Експресија испитиваних ткивних биомаркера може да буде корисна у процени биолошког понашања карцинома дојке. Према нашим резултатима, од свих анализираних ткивних маркера експресија IL-33R у туморским ћелијама се показала као најспецифичнији и најсензитивнији биомаркер за дискриминацију карцинома у којима је присутна односно одсутна некроза (Фигура 15А).

### 5.2.6. Некроза је повезана са патохистолошким особинама биолошки агресивне форме карцинома дојке

У даљем истраживању испитивали смо повезаност некрозе са вредностима стандардних патохистолошких и прогностичких параметара (експресије ER, PR, HER2 и p53, NPI, ИПИ, хистолошког и нуклеарног градуса, митотског индекса, инвазије крвних и лимфних судова, перинеуралне инвазије, стромалне моноклеарне реакције, статуса као и процента метастатски измењених лимфних чворова аксиле). У зависности од присуства некрозе у примарном тумору, сви испитаници су подељени на групу пацијената у чијим туморима су микроскопским прегледом детектована поља некрозе (n=20) и групу без некрозе (n=20).

У туморима са присутном некрозом забележена је статистички значајно нижа експресија ER и PR док је нуклеарна експресија протеина p53 била већа (Фигура 21А, Б и В и Слика 8, 9). Ови подаци су у складу са подацима из литературе који показују да пацијенти са смањеном експресијом ER и PR као и појачаном експресијом p53 протеина спадају у прогностички неповољну групу пацијената и показују статистички значајно краће преживљавање (765-767). Некроза је традиционално посматрана као прогностички неповољан параметар. У нашој студији, поред наведене везе са експресијом ових белега показано је и статистички значајно краће десетогодишње преживљавање у групи пацијената у чијим туморима дојке су детектована поља некрозе (Фигура 13А). У складу са овим анализама вредности NPI (енгл. *Nottingham prognostic index*) и ИПИ (енгл. *Immunohistochemical prognostic index*) су такође биле веће у групи тумора са присутном некрозом (Фигура 21Г и Д). Веће вредности оба прогностичка индекса су повезана са лошом прогнозом болести. Од стандардних патохистолошких параметара некроза је чешће заступљена у групама тумора са високим хистолошким и нуклеарним градусом, са перинеуралном и инвазијом лимфних судова, са стромалном моноклеарном реакцијом јаког степена и у групи пацијената код којих су након операције детектовани позитивни лимфни чворови аксиле (Табела 16). Процент позитивних лимфних чворова, степен експресије HER2 (енгл. *Human epidermal growth factor receptor-2*), митотски индекс, као и инвазија крвних судова нису били повезани и нису се разликовали између групе тумора

класификованих на основу присуства тј одсуства некрозе (Фигура 21Ћ, Табела 16 и Слика 8).

### **5.2.7. Експресија IL-33 у туморским ћелијама је повезана са патохистолошким карактеристикама биолошки мање агресивне форме карцинома дојке**

Како бисмо утврдили повезаност између експресије IL-33 у туморским ћелијама са стандардним патохистолошким параметрима испитанице смо поделили на две групе. Групу са ниском експресијом IL-33 у туморским ћелијама чинили су тумори у којима је детектовано  $\leq 4\%$  IL-33 позитивних ћелија док су у групу са високом експресијом класификоване испитанице у чијим туморима је утврђено  $>4\%$  IL-33 позитивних ћелија. Од 40 анализираних дукталних карцинома дојке код 16 (40%) тумора је детектована ниска насупрот 24 (60%) узорка туморског ткива са високом, цитоплазматском, експресијом IL-33 у туморским ћелијама.

Средња вредност скорова за експресију ER и PR је била већа у групи тумора са високом експресијом IL-33 у туморским ћелијама иако разлика није статистички значајна (Фигура 22А и Б). Овај налаз је у складу са студијом *Liu* и сарадника (170) који су проучавали значај серумске концентрације и експресије IL-33 у туморским ћелијама пацијената са карциномом дојке. У овој студији, серумска концентрација IL-33 је била већа у групи ER позитивних карцинома дојке указујући на значај сигналног пута IL-33/IL-33R у хормонској сигнализацији. Повећана концентрација овог цитокина је забележена и код пацијената у чијим туморима је детектована прекомерна експресија HER2. Супротно овоме, локална експресија IL-33 у ћелијама карцинома дојке је била виша у групи ER негативних карцинома дојке иако разлика није достигла статистичку значајност, уз значајно повећану локалну експресију IL-33 у групи HER2 позитивних тумора. Овакви резултати указују на различиту локалну улогу IL-33 у зависности од хормонског статуса и резистенцију на ендокрину и терапију *Herceptinom*, код пацијената са ER/HER2 позитивним карциномом дојке (170). У истој студији није потврђена значајна веза између статуса PR и локалне експресије и системске концентрације IL-33 код пацијената са карциномом дојке. У туморима високог градуса експресија IL-33 је била мања у односу на туморе ниског градуса. Поред овога, *Liu* и сарадници (170) су показали да су системска

концентрација и локална експресија IL-33 већи у групи пацијената са ниском експресијом Ki-67, указујући на негативну повезаност између пролиферације туморских ћелија и локалне експресије и системске концентрације IL-33.

Експресија p53 као и NPI је била већа код тумора са ниском експресијом IL-33 (Фигура 22B). Овакав резултат је у складу са налазима ранијих студија које су показале да је мутација гена за p53 у карциному дојке праћена бржим растом тумора и присуством некрозе у туморском ткиву (765). Претпостављамо да смањена експресија IL-33 у туморским ћелијама настаје као последица некрозе и његовог ослобађања из живих ћелија перинекротичне зоне. Овај механизам следствено поспешује ангиогенезу и смањује исхемију, а последично и некрозу унутар туморског ткива. Повећана експресија IL-33 је утврђена у групама тумора ниског градуса, смањене митотске активности као и код тумора без метастатски измењених аксиларних лимфних чворова (Табела 17). Ранија истраживања у којима је на анималном моделу карцинома дојке мерена пролиферативна активност туморских ћелија помоћу Ki-67 маркера показала су да примена рекомбинантног IL-33 повећава процентуалну заступљеност Ki-67 позитивних туморских ћелија (200). IL-33 не поспешује пролиферацију туморских ћелија 4T1 у условима *in vitro*, чиме је искључен директни ефекат IL-33 на туморске ћелије (200). На основу ове студије и истраживања других аутора, закључујемо да интрацелуларни IL-33 значајно смањује пролиферативну активност малигних ћелија док је његова системска улога супротна (170). Сумирајући наше резултате може се рећи да туморске ћелије представљају значајан извор овог цитокина. Поред наведеног, експресија IL-33 у туморским ћелијама није показала повезаност са експресијом HER2 у ћелијама тумора, нуклеарним градусом, инвазијом крвних и лимфних судова, перинеуралном инвазијом, стромалном мононуклеарном реакцијом као и процентом метастатски измењених аксиларних лимфних чворова (Табела 17).

### 5.2.8. Експресија IL-33 у ћелијама строме је повезана са патохистолошким карактеристикама биолошки агресивне форме карцинома дојке

Обзиром да поред туморских, IL-33 могу да експримирају и ћелије строме (17,32), испитивали смо повезаност експресије IL-33 у ћелијама туморске строме са стандардним патохистолошким и прогностичким параметрима. Испитанице су класификоване у групу са ниском ( $\leq 10\%$  позитивних ћелија) и високом ( $> 10\%$  позитивних ћелија) експресијом IL-33 у ћелијама туморске строме. Укупно је анализирано 40 ткивних узорака карцинома код којих је у 12 (30%) утврђена ниска а код 28 (70%) висока експресија IL-33 у ћелијама строме.

IL-33 може да функционише у аутокрином маниру у ендотелним и епителним ћелијама које представљају значајан извор IL-33 (768). Иако начин секреције IL-33 није у потпуности разјашњен новија истраживања су дала значајан допринос у разумевању овог механизма. Продукција IL-33 у епителним ћелијама је изучавана у многим експерименталним моделима. Као одговор на алергијску реакцију проузроковану грињама ћелије респираторног епитела, након активације TLR4 рецептора, ослобађају IL-1 $\alpha$  који даље индукује ослобађање IL-33 у аутокрином маниру (769). Слично, код неких гљивичних инфекција, ћелије респираторног епитела ослобађају IL-33 индукцијом АТФ-а и последичном активацијом пуринергичких рецептора (770). На крају, епителне ћелије гастроинтестиналног тракта ослобађају IL-33 у одговору на инфекције хелминтима (771). Поред почетног препознавања „опасних“ сигнала и продукције раних, ендогених, молекула који су означени као молекулски обрасци повезани са оштећењем ћелија (енгл. *Damage-associated molecular patterns*, DAMP), епителне ћелије имају различите механизме за појачавање инфламације (772,773). Поред тога IL-33 промовише ангиогенезу појачавањем пролиферације и миграције ендотелних ћелија као и васкуларне пропустљивости (104). У одговору на стимулацију IL-33, ендотелне ћелије секретују медијаторе запаљења (127) што је одлика и епителних ћелија (127,774). Током запаљењске реакције, епителне ћелије гастроинтестиналног тракта продукују IL-25, IL-33 и тимусни стромални лимфопоетин (енгл. *Thymic stromal lymphopoietin*, TSLP) (775). Овај процес захтева присуство мастоцита (775). У хепатитису индукованом конкавалином А, НКТ ћелије активирају хепатоците и преко TRAIL рецептора (енгл. *TNF-related apoptosis-*

*inducing ligand*, TRAIL) стимулишу продукцију IL-33 (776,777). Према овој студији, IL-33 игра значајну протективну улогу у анималном моделу хепатитиса (777,776). У складу са овом експерименталном студијом, *in vivo* апликација IL-33 је показала да овај цитокин игра важну улогу у смањењу исхемије јетре и спречавању некрозе хепатоцита и то без продукције проинфламацијских медијатора из Купферових ћелија и/или хепатоцита (778).

Од свих испитиваних параметара, тумори у којима је забележен висок степен експресије IL-33 у ћелијама строме једино су имали већу експресију p53 у туморским ћелијама (Фигура 23В). На основу овог резултата сматрамо да је смањени апоптотски потенцијал туморских ћелија карцинома дојке праћен појачаном локалном секрецијом IL-33 у стромалним ћелијама карцинома. Могуће објашњење овог феномена је да смањена апоптоза и појачана некроза стимулишу ћелије строме да секретују проангогени IL-33 и на тај начин смање исхемију и спрече даљи развој некрозе у туморском ткиву. Код пацијената са III стадијумом колоректалног карцинома утврђен је нижи степен IL-33 mRNA код којих је детектована p53 мутација у односу на оне код којих је присутна *Wild* форма p53 (188). Анализом степена експресије IL-33 у ћелијама строме тумора дојке нисмо утврдили повезаност са другим стандардним имунохистохемијским и патохистолошким параметрима (Табела 18).



### 5.2.9. Експресија IL-33R у туморским ћелијама је повезана са патохистолошким карактеристикама биолошки мање агресивне форме карцинома дојке

Досадашње студије су се бавиле проучавањем повезаности серумског sST2 са стандарним патохистолошким и имунохистохемијским параметрима. Показале су да је концентрација sST2 већа код ER позитивних пацијената у односу на контролну групу коју су чиниле здраве испитанице (181,203). Иста студија је показала да је концентрација sST2 код пацијенткиња са ER позитивним карциномом дојке значајно већа у односу на пацијенткиње са дукталним *in situ* карциномом (енгл. *Ductal carcinoma in situ*, DCIS) и да значајно корелира са старосном доби, величином тумора и стадијумом болести. Ове студије нису показале повезаност sST2 са експресијом HER2 у ћелијама карцинома дојке (192,203). У групи ER позитивних карцинома дојке забележена је и значајно већа концентрација серумског sST2 у групи са високим индексом пролиферације који је процењиван експресијом Ki-67 (203). *Sahin* и сарадници (779) су претходно показали да проценат позитивних ћелија на Ki-67 корелира са нуклеарним градусом, старосном доби и митотским индексом у карциномима дојке.

Како до сада није разматран значај локалне експресије IL-33R у карциному дојке, испитивали смо повезаност експресије овог белега са осталим претходно дефинисаним параметрима. Испитанице су класификоване на групу са ниском ( $\leq 22,5\%$  позитивних ћелија) и високом ( $> 22,5\%$  позитивних ћелија) експресијом IL-33R у туморским ћелијама карцинома дојке. Укупно је анализирано 40 ткивних узорака карцинома код којих је у 18 (45%) утврђена ниска а код 22 (55%) висока експресија IL-33R у ћелијама карцинома.

Наша студија је показала да је експресија ER и PR значајно већа у групи тумора у којој је детектована висока експресија IL-33R у туморским ћелијама, док се експресија p53 није значајно разликовала (Фигура 24А, Б и В). Такође, није забележена ни разлика у експресији HER2 у зависности од степена експресије IL-33R (Табела 19). Узевши у обзир резултате студија у којима је повезаност испитивана са серумским IL-33R сматрамо да је експресија IL-33 рецептора на туморским ћелијама повезана са хормонском сигнализацијом у ћелијама карцинома дојке. Вредности NPI и INPI су биле значајно ниже у групи карцинома са високим степеном експресије IL-33R у ћелијама карцинома дојке

што имплицира да је повећана експресија овог рецептора у туморским ћелијама повезана са повољнијом прогнозом болести (Фигура 24Г и Д). Карциноми ниског градуса показују виши степен експресије IL-33R у туморским ћелијама, што потврђује значај експресије IL-33R у туморским ћелијама, као повољног прогностичког фактора (Табела 19). Иако је на граници статистичке значајности, у групи тумора са ниском експресијом IL-33R забележена је процентуално већа заступљеност перинеуралне инвазије у односу на туморе који у већој мери експримирају IL-33R (Табела 19). У нашој студији нисмо утврдили значајну повезаност између степена експресије IL-33R са митотским индексом, инвазијом крвних и лимфних судова, стромалном мононуклеарном реакцијом, као и статусом и процентом метастатски измењених лимфних чворова аксиле (Фигура 24Ђ и Табела 19).

#### **5.2.10. Експресија IL-33R у ћелијама строме је повезана са патохистолошким карактеристикама биолошки агресивне форме карцинома дојке**

Поред туморских, експресија IL-33R је присутна и на ћелијама туморске строме укључујући: Th2 лимфоците, мастоците, еозинофиле, базофиле, неутрофиле, дендритске ћелије, макрофаге, NK ћелије, фибробласте, миофибробласте, глаткомишићне као и ендотеле и епителне ћелије (169). Раније студије које су се бавиле улогом сигналног пута IL33/IL-33R у биологији карцинома дојке претежно су биле усмерене на ћелије имунског система и модулацију имунског одговора (200,708). У нашој студији, испитивали смо улогу експресије IL-33R у ћелијама строме без посебног акцента на одређену популацију ћелија. Испитанице смо поделили на групу са ниском ( $\leq 13,75\%$  позитивних ћелија) и високом ( $> 13,75\%$  позитивних ћелија) експресијом IL-33R у ћелијама строме карцинома дојке. Укупно је анализирано 40 ткивних узорака карцинома код којих је у 20 (50%) утврђена ниска а код 20 (50%) висока експресија IL-33R у ћелијама туморске строме.

Тумори са високом експресијом IL-33R на ћелијама туморске строме имали су значајно нижу вредност скорa за ER али не и скорa за експресију PR у туморским ћелијама (Фигура 25А и Б). Могуће објашњење је да, IL-33 ослобођен из ћелија ER негативних тумора појачава инфилтрацију туморке строме IL-33R позитивним ћелијама. Тврдња је у складу са ранијим истраживањима која су показала да локална експресија IL-33 може да повећа интратуморску акумулацију IL-33R<sup>+</sup> имуносупресивних лимфоидних ћелија, код

пацијената са карциномом дојке (170). С обзиром да је наша студија показала да је негативност на ER повезана са некрозом у туморском ткиву, активација сигналног пута IL-33/IL-33R у ћелијама строме поспешује ослобађање про-ангиогених фактора и на тај начин спречава даље настајање исхемије и некрозе у туморском ткиву. Овакав налаз упућује на прогностички значај експресије IL-33R у ER негативним туморима, као и на потенцијалну мету у онколошком лечењу ове групе пацијената. Са друге стране експресије HER2 и p53 се нису значајно разликовале у зависности од степена експресије IL-33R у ћелијама туморске строме (Табела 20 и Фигура 25B). Вредности NPI и INPI су биле значајно веће у групама појачане експресије IL-33R, потврђујући присуство IL-33R у ћелијама строме као лош прогностички фактор (Фигура 25Г и Д). Поред овога, међу туморима са појачаном експресијом IL-33R у ћелијама строме велики је удео оних са високим хистолошким градусом (Табела 20). У истој групи тумора у значајно већој мери је била присутна инвазија лимфних судова и перинеурална инвазија, као и статус и проценат метастатски измењених лимфних чворова аксиле (Фигура 25Ђ и Табела 20). Јака стромална-мононуклеарна реакција је била одсутна код свих тумора са ниском а забележена је код 6/20 тумора са високом експресијом IL-33R у ћелијама туморске строме (Табела 20). Овај налаз је потврдио да активација сигналног пута IL33/IL-33R у ћелијама строме убрзава метастатско ширење примарног тумора дојке (173). Такође значајна разлика у стромално-мононуклеаној реакцији иде у прилог тврдњама да активација сигналног пута IL-33/IL-33R убрзава инфилтрацију туморског ткива запаљењским ћелијама и поларише имунски одговор у тип 2 правцу (17,23,200,708). Нашом анализом, нисмо утврдили повезаност између степена експресије IL-33R у ћелијама туморске строме са нуклеарним градусом, митотским индексом и инвазијом крвних судова у туморском ткиву карцинома дојке (Табела 20).

Наши резултати указују на потенцијално нов механизам којим је IL-33 укључен у процес карциногенезе. У студији је показано да делеција гена за IL-33R промовише некрозу у карциному дојке индукованом у мишева. Појачана некроза у IL-33R<sup>-/-</sup> мишева настаје као последица смањене експресије снажних проангиогених фактора IL-33 и VEGF-a, што је праћено споријим растом примарног тумора. Претходно је показано да сигнални пут IL-33/IL-33R инхибира урођени имунитет и последично промовише ангиогенезу (200,708). Појава некрозе у карциному дојке је традиционално повезивана са неповољном

прогнозом, да би новија истраживања доказала да некроза може бити пратећи феномен повољног терапијског одговора у лечењу малигних болести (508,518-523,529,725). Према томе, смањена експресија IL-33 стимулише антитуморски имунски одговор, док истовремено промовише развој некрозе која је последица смањене експресије VEGF-a (736,737). Од раније је познато да присуство туморске некрозе потенцира антитуморски имунски одговор, уз присуство ћелија урођеног имунског система (531,712), као и да ћелије које умиру некрозом убрзавају сазревање ћелија које презентују антиген (739).

Експресија IL-33 позитивно корелира са експресијом VEGF-a у туморским ћелијама мишићег карцинома дојке. Наши резултати су показали да присуство IL-33R појачава експресију IL-33, као и да је експресија VEGF-a смањена у туморским ћелијама IL-33R<sup>-/-</sup> мишева. Добијени резултати указују на позитивну повезаност сигналног пута IL-33/IL-33R и експресије VEGF-a у туморским ћелијама карцинома дојке.

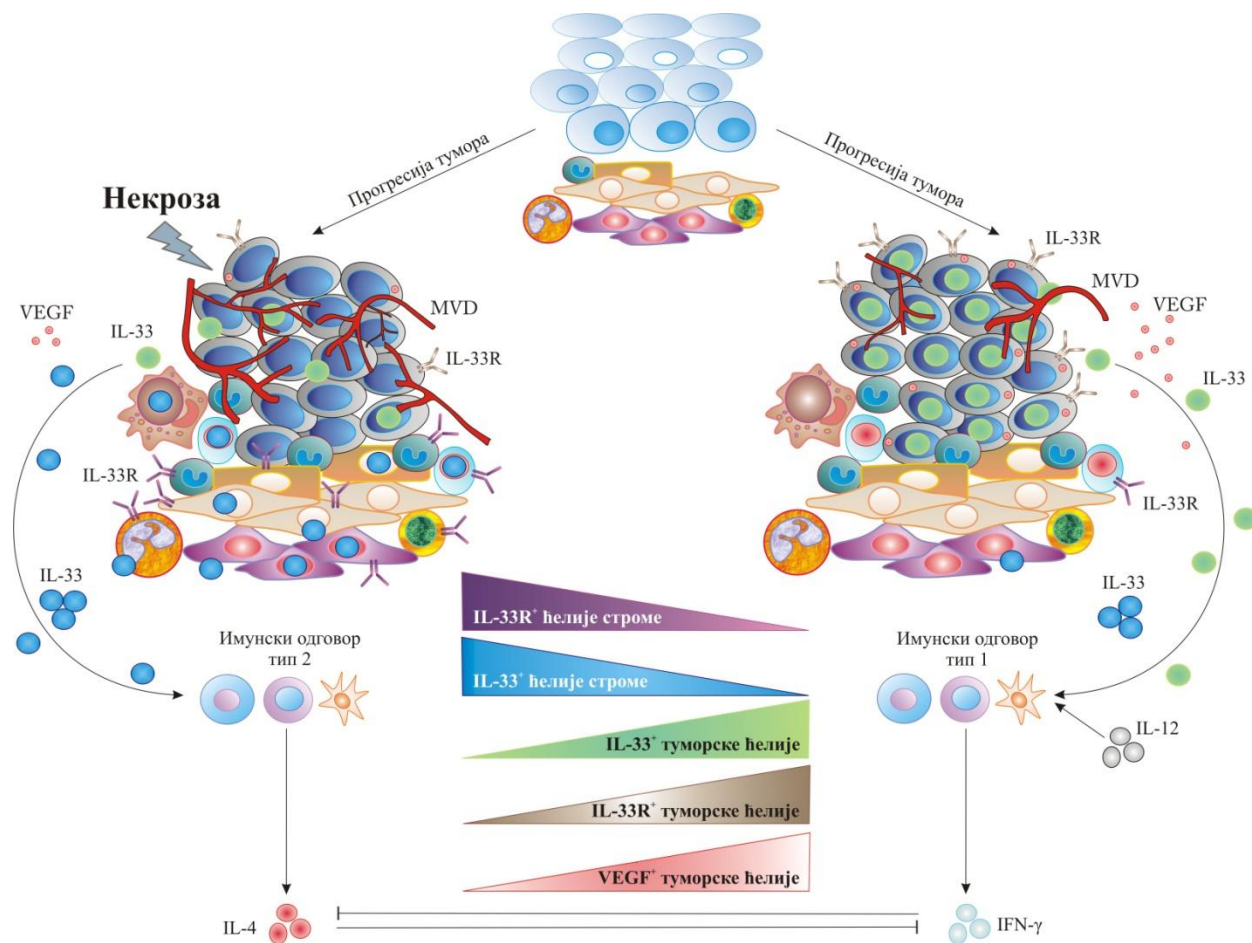
Налази у хуманим карциномима дојке су у складу са резултатима добијеним у експерименталном моделу болести. Експресија IL-33, IL-33R и VEGF-a негативно корелира са степеном некрозе у туморском ткиву хуманог карцинома дојке. Истовремено, експресије IL-33 и IL-33R позитивно корелирају са експресијом VEGF-a у туморским ћелијама. Налази наше студије указују да блокада сигналног пута IL-33/IL-33R у туморским ћелијама инхибира ангиогенезу смањивањем експресије VEGF-a, а промовише туморску некрозу (Слика 12).

У хуманим карциномима дојке у којима су детектована поља некрозе утврдили смо повећану MVD. Повећана MVD је детектована у зони перинекротичног туморског руба. Наши резултати нису потврдили значајну корелацију експресија IL-33 и IL-33R са MVD, док експресија VEGF-a у туморским ћелијама позитивно корелира са MVD у перинекротичним туморском ткиву.

Од раније је познато да други чланови породице цитокина IL-1 испољавају значајан утицај на туморску ангиогенезу (748,750,751). На основу ових студија и наших резултата сматрамо да IL-33 ослобођен из некротичних ћелија стимулише експресију VEGF-a у туморским ћелијама чиме промовише ангиогенезу и MVD у перинекротичној зони хуманог карцинома дојке.

IL-33 је веома сличан IL-1 $\beta$ . Оба цитокина проангиогени ефекат остварују путем контроле продукције VEGF-а. IL-1 $\beta$  повећава експресију VEGF-а и његових рецептора на ендотелним ћелијама и заједничким деловањем промовишу туморску ангиогенезу. Неутрализација IL-1 $\beta$  инхибира туморску ангиогенезу и последично туморски раст (748,750,751). Попут IL-1 и IL-33 користи IL-1R3 (енгл. *Interleukin 1 Receptor Accessory Protein*, IL-1RAcP) што може указати да анти-IL-1R3 антитела смањују ангиогенезу и повећавају туморску некрозу у карциному дојке услед губитка васкуларног снабдевања. Наша студија показује нов механизам којим је сигнални пут IL-33/IL-33R укључен у раст и прогресију тумора дојке и даје рационално објашњење за блокаду IL-33 као потенцијалног терапијског модалитета у лечењу хуманог карцинома дојке.

Сматра се да индукција туморске некрозе може да буде пожељан исход током антитуморске терапије. Студије показују да у околностима појачане продукције IL-12, IL-33 промовише Th1 имунски одговор што може имати директну импликацију у антитуморској терапији (173,780).



**Слика 12. Повезаност експресије IL-33 у туморским и ћелијама строме хуманог карцинома дојке.** IL-33 је конститутивно, високо, експримиран у ћелијама нормалног епитела. Током карциногенезе и прогресије тумора, интрацелуларно присуство IL-33 у туморским ћелијама се смањује док експресија у ћелијама туморске строме расте. Тумори високог градуса и/или тумори са присутним пољима некрозе показују нижи степен експресије IL-33 у туморским ћелијама у односу на туморе ниског градуса и/или туморе без некрозе. Карциноми ниског градуса и/или у којима нису присутна поља некрозе имају већу експресију VEGF-а у туморским ћелијама перинекротичног руба уз, последично, већу MVD у истој зони. Инверзна експресија IL-33 у туморским и ћелијама строме указује на различите ефекте туморске и стромалне експресије IL-33. Претпоставља се да функционална разноликост туморског и стромалног IL-33 настаје услед другачије локализације његовог прекурсора, као и секреције различитих форми овог протеина које карактерише структурна разноврсност у N крају. Порекло ослобођеног IL-33, циљне ћелије, као и локална микросредина дефинишу специфичну функцију овог цитокина у биологији канцера. Ослобођен из туморских ћелија, IL-33 поларизује имунски одговор у Th1 правцу, насупрот протеину ослобођеном из ћелија строме који посредује у Th2 имунском одговору. Претходне студије су показале да IL-33 у присуству IL-12 појачава Th1 имунски одговор.

## ЗАКЉУЧЦИ

Експериментални подаци приказани у овој студији указују на нов механизам којим је сигнални пут IL-33/IL-33R укључен у туморогенезу, дајући рационално објашњење за потенцијалну блокаду IL-33 као терапијског модалитета у лечењу хуманог карцинома дојке. Делетија гена за IL-33R појачава некрозу и успорава раст тумора у мишева. Ослобођен из некротичних и/или живих ћелија, IL-33 олакшава експресију VEGF-а у околним туморским ћелијама и појачава ангиогенезу повећањем MVD у перинекротичној зони хуманог карцинома дојке.

Закључак је изведен на основу следећих експерименталних доказа:

1. Експресија IL-33 у туморским ћелијама карцинома дојке корелира са растом тумора у IL-33R<sup>+/+</sup> мишева, а значајно је мања у IL-33<sup>-/-</sup> мишева.
2. Присуство некрозе у хуманом карциному дојке је праћено смањеном цитоплазматском експресијом IL-33, IL-33R и VEGF у туморским ћелијама.
3. Експресија VEGF-а позитивно корелира са MVD у перинекротичном рубу у хуманом карциному дојке.
4. Експресија IL-33 и IL-33R је у позитивној корелацији са експресијом VEGF-а у туморским ћелијама хуманог карцинома дојке.
5. Експресија IL-33 и IL-33R у туморским ћелијама је у негативној корелацији са експресијом истих белега у ћелијама туморске строме.
6. Експресија IL-33 у ћелијама тумора као и IL-33R у ћелијама тумора и туморске строме су поуздан показатељ присуства некрозе у туморском ткиву.
7. Пацијенти са туморима у којима су присутна поља некрозе показују значајно краће преживљавање у односу на групу хуманих карцинома дојке без некрозе.
8. Повећана експресија IL-33R у туморским ћелијама указује на одсуство некрозе, док повећана експресија истог белега у ћелијама туморске строме указује на присуство некрозе у хуманом карциному дојке.

## СКРАЋЕНИЦЕ

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| <b>5-FU</b>                          | хемотерапеутик, инхибитор тимидилат синтазе (енгл. 5-Fluorouracil)   |
| <b>ACC</b>                           | Америчко удружење за борбу против рака (енгл. American Cancer Society)   |
| <b>AEC</b>                           | 3-amino-9-ethylcarbazole   |
| <b>aFGF</b>                          | кисели фибробластни фактор раста (енгл. Acidic fibroblast growth factor)   |
| <b>AIA</b>                           | антителима индуковани артритис (енгл. Antibody-induced arthritis)  |
| <b>AIDS</b>                          | синдром стечене имунодефицијенције (енгл. Acquired immune deficiency syndrome)   |
| <b>AJCC</b>                          | Амерички заједнички комитет за рак (енгл. American Joint Committee on Cancer)  |
| <b>ALK-1</b>                         | киназа слична активинском рецептору (енгл. Activin receptor-like kinase)   |
| <b>AMP</b>                           | аденозин-монофосфат (енгл. Adenosine monophosphate)  |
| <b>Ang</b>                           | ангиопоетин (енгл. Angiopoetin)  |
| <b>AP-1</b>                          | активациони протеин-1 (енгл. Activator protein 1)  |
| <b>APAF-1</b>                        | активациони фактор апоптотских протеаза-1 (енгл. Apoptotic protease activating factor 1)   |
| <b>APC</b>                           | ћелија која презентују антиген (енгл. Antigen-presenting cells)  |
| <b>APP</b>                           | амилоидни прекурсорски протеин (енгл. Amyloid precursor protein)   |
| <b>ATCC</b>                          | Америчка колекција ћелијских култура (енгл. American Type Culture Collection)  |
| <b>ATP</b>                           | аденозин-трифосфат (енгл. Adenosine triphosphate)  |
| <b>BAX</b>                           | протеин X повезан са Bcl2 (енгл. Bcl-2-associated X protein)   |
| <b>BCL2</b>                          | B-ћелијски лимфом 2 (енгл. B-cell lymphoma 2)  |
| <b>BCLXL</b>                         | B-ћелијски лимфом XL (енгл. B-cell lymphoma-extra large)   |
| <b>BCR-ABL</b>                       | фузиони ген карактеристичан за Philadelphia хромозом (енгл. Breakpoint cluster region-ABL)   |
| <b>bFGF</b>                          | базни фибробластни фактор раста (енгл. Basic fibroblast growth factor)   |
| <b>BH3, BID</b>                      | проапоптотски протеин, члан Bcl2 фамилије (енгл. BH3 interacting-domain death agonist)   |
| <b>BRCA</b>                          | тумор супресорски ген (енгл. Breast cancer)  |
| <b>CCL17, TARC</b>                   | хемокин-17 или тимусом и активацијом регулисани хемокин (енгл. Chemokine (C-C motif) ligand 17 или Thymus and activation regulated chemokine)  |
| <b>CCL24, MPIF-2, eotaxin-2</b>      | хемокин-24 или инхибитор мијелоидних прогенитора-2 или хемотактични протеин за еозинofile-2 (енгл. Chemokine (C-C motif) ligand 24 или myeloid progenitor inhibitory factor 2 или eosinophil chemotactic protein 2 ) |
| <b>CD105</b>                         | ендоглин (енгл. Endoglin или CD105)  |
| <b>CD117, SCRF</b>                   | рецептор фактора раста мастоцита/матичних ћелија или протоонкоген c-Kit или тирозинска протеинска киназа Kit (енгл. Mast/stem cell growth factor receptor или proto-oncogene c-Kit или tyrosine-protein kinase Kit)  |
| <b>CD31, PECAM-1</b>                 | тромбоцитно-ендотелни адхезивни молекула (енгл. Platelet endothelial cell adhesion molecule)   |
| <b>CD34</b>                          | антиген хематопоетских прогениторских ћелија (енгл. Hematopoetic progenitor cell antigen)  |
| <b>CD36 (FAT, GP88, GPIV, GPIIb)</b> | рецептор за велики број лиганата укључујући TSP-1 (енгл. Fatty acid translocase)   |
| <b>CD40</b>                          | костимулаторни протеин присутан на ћелијама које презентују антиген  |
| <b>CD47</b>                          | протеин повезан са интегрином (енгл. Integrin associated protein)  |



|   |   |
|---|---|
| <b>CD8</b>                              | корцептор карактеристичан за цитотоксичке Т лимфоците али може бити присутан на тимоцитима, НК и дендритским ћелијама |
| <b>CD80</b>                             | Костимулаторни рецептор   |
| <b>CD86</b>                             | Костимулаторни рецептор   |
| <b>CDK (Cdc)</b>                        | циклин зависна киназа (енгл. Cyclin-dependent kinase)   |
| <b>CIA</b>                              | колагеном индуковани артритис (енгл. Collagen-induced arthritis)  |
| <b>CKCR4</b>                            | хемокински рецептор-4 (енгл. C-X-C chemokine receptor type 4)   |
| <b>CMV</b>                              | цитомегаловирус (енгл. Cytomegalovirus)   |
| <b>CNS</b>                              | централни нервни систем (енгл. <i>Central nervous system</i> )  |
| <b>CT</b>                               | компјутеризована томографија (енгл. Computed Tomography)  |
| <b>CVD</b>                              | кардиоваскуларне болести (енгл. Cardiovascular disease)   |
| <b>DAB</b>                              | 3,3'-diaminobenzidine   |
| <b>DAMP</b>                             | молекулски обрасци повезани са оштећењем ћелија (енгл. Damage-associated molecular patterns)                          |
| <b>DCIS</b>                             | дуктални „in situ“ карцином (енгл. Ductal in situ carcinoma)  |
| <b>Diablo</b>                           | протеин који се везује за IAP и индукује апоптозу преко проапоптотских каспаза  |
| <b>DMEM</b>                             | медијум за култивацију ћелија (енгл. Dulbecco's Modified Eagles Medium)   |
| <b>DNA</b>                              | деоксирибонуклеинска киселина (енгл. Deoxyribonucleic acid)   |
| <b>EAE</b>                              | експериментални аутоимунски енцефаломијелитис (енгл. Experimental autoimmune encephalomyelitis)                       |
| <b>ECM</b>                              | ванћелијски матрикс (енгл. Extracellular matrix)  |
| <b>EDTA</b>                             | етилендиамино-тетрасирћетна киселина (енгл. Ethylenediaminetetraacetic acid)  |
| <b>EGF</b>                              | епидермални фактор раста (енгл. Epidermal growth factor)  |
| <b>EGFR</b>                             | рецептор за епидермални фактор раста (енгл. Epidermal growth factor receptor)   |
| <b>EMT</b>                              | епително-мезенхимална транзиција (енгл. Epithelial–mesenchymal transition)  |
| <b>eNOS</b>                             | ендотелна азот-моноксид синтетаза (енгл. Endothelial nitric oxide synthase)   |
| <b>EPC</b>                              | прогениторске ћелије ендотела (енгл. Endothelial progenitor cell)   |
| <b>ER</b>                               | рецептор за естроген (енгл. Estrogene receptor)   |
| <b>Erk1/2</b>                           | екстрацелуларним сигналом регулисана киназа 1/2 (енгл. Extracellular signal–regulated kinases 1/2)                    |
| <b>FADD</b>                             | протеин са доменом смрти везан за FAS рецептор (енгл. Fas-Associated protein with Death Domain)                       |
| <b>FAS (CD95, Apo-1, TNFRSF6, FasR)</b> | рецептор смрти из породице рецептора за фактор некрозе тумора   |
| <b>FasL</b>                             | лиганд за FAS   |
| <b>FBS</b>                              | фетални говеђи серум (енгл. Fetal bovine serum)   |
| <b>FDA</b>                              | Управа за храну и лекове (енгл. The Food and Drug Administration)   |
| <b>FEC</b>                              | хемиотерапијски протокол (5-Fluorouracil, Epirubicin, Cyclophosphamid)  |
| <b>FGF</b>                              | фибробластни фактор раста (енгл. Fibroblast growth factor)  |
| <b>FIAU</b>                             | 1-(29-deoxy-29-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodo-uracil   |
| <b>G</b>                                | хистолошки градус (енгл. Histological grade)  |
| <b>Gadd45</b>                           | ген и истоимени протеин са улогом у заустављању раста ћелија и оштећења DNA (енгл. The Growth Arrest and DNA Damage)  |

|   |  |
|---|--|
| <b>GCP</b>                                      | Добра клиничка пракса (енгл. <i>Good clinical practice</i> )   |
| <b>GM-CSF</b>                                   | гранулоцитно-моноцитни фактор стимулације раста колоније (енгл. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)  |
| <b>HE</b>                                       | бојење хамтоксилином и еозином (енгл. Haematoxylin and eosin stain)  |
| <b>HER2</b>                                     | хумани епидермални фактор раста-2 (енгл. Human epidermal growth factor receptor-2)   |
| <b>HGF</b>                                      | фактор раста хепатоцита (енгл. Hepatocyte growth factor)   |
| <b>HIF</b>                                      | хипоксијом индуковани фактор (енгл. Hypoxia-inducible factor)  |
| <b>HIV</b>                                      | вирус хумане имунодефицијенције (енгл. Human immunodeficiency virus)   |
| <b>HMGB1</b>                                    | протеин високе мобилности групе В1 (енгл. High mobility group box 1)   |
| <b>HPF</b>                                      | велико микроскопско увећање (енгл. High power field)   |
| <b>HPV</b>                                      | хумани папиломавирус (енгл. Human papillomavirus)  |
| <b>HRP</b>                                      | пероксидаза из рена (енгл. Horse-radish peroxidase)  |
| <b>Hsc70</b>                                    | протеин топлотног шока-70 (енгл. Heat shock 70 kDa protein 8)  |
| <b>HtrA2 (OMI)</b>                              | митохондријска серинска протеаза HTRA2 (енгл. Serine protease HTRA2, mitochondrial)  |
| <b>HUVEC</b>                                    | ћелије из културе хумане умбиликалне вене (енгл. Human Umbilical Vein Endothelial Cells)   |
| <b>IAP</b>                                      | инхибитори апоптотских протеина (енгл. Inhibitors of apoptosis proteins)   |
| <b>ICAD</b>                                     | инхибитор каспазом активираних DNазе (енгл. Inhibitor of caspase-activated DNase)  |
| <b>icIL-33</b>                                  | унутарћелијски IL-33 (енгл. Intracellular interleukin-33)  |
| <b>IDC</b>                                      | инвазивни дуктални карцином (енгл. Invasive ductal carcinoma)  |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b>                  | интерферон- $\gamma$ (енгл. Interferon- $\gamma$ )   |
| <b>IgE</b>                                      | имуноглобулин Е  |
| <b>IGF-1</b>                                    | инсулину сличан фактор раста-1 (енгл. Insulin-like growth factor-1)  |
| <b>IHC</b>                                      | имунохистохемија (енгл. Immunohistochemistry)  |
| <b>IHPI</b>                                     | имунохистохемијски прогностички индекс (енгл. Immunohistochemical prognostic index)  |
| <b>IL</b>                                       | интерлеукин (енгл. Interleukin)  |
| <b>IL1-RacP</b>                                 | помоћни протеин рецептора за IL-1 (енгл. Interleukin 1 Receptor Accessory Protein)   |
| <b>IP-10, CXCL10</b>                            | протеин-10 индукован IFN- $\gamma$ или хемокин 10 (енгл. Interferon gamma-induced protein 10 или Chemokine (C-X-C motif) ligand 10)  |
| <b>IP-9 (ITAC, CXCL11)</b>                      | протеин-9 индукован IFN- $\gamma$ или хемоатрактант Т лимфоцита индукован IFN- $\gamma$ или хемокин 9 (енгл. Interferon-gamma-inducible protein 9 или Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant или Chemokine (C-X-C motif) ligand 11) |
| <b>IRAK</b>                                     | киназа повезана са рецептором за IL-1 (енгл. Interleukin-1 receptor-associated kinase)   |
| <b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b> | инхибитор NF $\kappa$ B (енгл. nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha)  |
| <b>JAK</b>                                      | JUN N-терминална киназа (енгл. Janus kinase)   |
| <b>LAMP-2<math>\alpha</math></b>                | мембрански протеин-2 $\alpha$ повезан са лизозомом (енгл. Lysosome-associated membrane protein 2)  |
| <b>LVI</b>                                      | лимфоваскуларна инвазија (енгл. Limfovascular invasion)  |
| <b>МАРК</b>                                     | протеин киназа активирана митогеном (енгл. Mitogen-activated protein kinase)   |
| <b>MHC1</b>                                     | главни комплекс ткивне подударности класе I (енгл. Major histocompatibility complex class I)   |

|                      |   |
|----------------------|---|
| <b>MI</b>            | митотски индекс (енгл. <i>Mitotic index</i> )   |
| <b>MIP-1, CCL3</b>   | хемокин-3 или макрофагни инфламаторни протеин-1 или (енгл. Chemokine (C-C motif) ligand 3 или Макрофагни инфламаторни протеин-1)  |
| <b>MIP-2 (CXCL2)</b> | Макрофагни инфламаторни протеин-2 или хемокин-2 (енгл. Macrophage inflammatory protein 2-alpha или Chemokine (C-X-C motif) ligand 2)  |
| <b>MMP</b>           | матрикс металопротеиназе (енгл. Matrix metalloproteinases)  |
| <b>MNNG</b>          | енгл. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine  |
| <b>MRI</b>           | магнетна резонанца (енгл. Magnetic resonance imaging)   |
| <b>mRNA</b>          | информациона рибонуклеинска киселина (енгл. Messenger RNA)  |
| <b>MS</b>            | мултипла склероза (енгл. <i>Multiple sclerosis</i> )  |
| <b>MVD</b>           | микроваскуларна густина (енгл. Microvessel density)   |
| <b>myc</b>           | ген који кодира истоимени протеин са улогом транскрипционог фактора у регулацији хелијског циклуса и пролиферације хелија (енгл. Myelocytomatosis viral oncogene homolog)           |
| <b>MyD88</b>         | (енгл. Myeloid differentiation primary response gene 88)  |
| <b>NF-HEV</b>        | нуклеарни фактор у високим ендотелијалним венама (енгл. Nuclear factor in high endothelial venules)   |
| <b>NFκB</b>          | нуклеарни фактор κB (енгл. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)  |
| <b>NG</b>            | нуклеарни градус (енгл. Nuclear grade)  |
| <b>NK</b>            | урођено убилачке хелије (енгл. Natural killer cells)  |
| <b>NKT</b>           | урођено убилачке Т хелије (енгл. Natural killer T cells)  |
| <b>NO</b>            | азот монооксид (енгл. Nitric oxide)   |
| <b>NOS</b>           | без посебних карактеристика (енгл. Not otherwise specified)   |
| <b>NPI</b>           | прогностички индекс (енгл. Nottingham prognostic index)   |
| <b>NSCLC</b>         | неситнохелијски карцином плућа (енгл. Non-small cell lung cancer)   |
| <b>NST</b>           | без посебног типа (енгл. No special type)   |
| <b>PAI-1</b>         | инхибитор активатора плазминогена-1 (енгл. Plasminogen activator inhibitor-1)   |
| <b>PBS</b>           | фосфатни пуфер (енгл. Phosphate-buffered saline)  |
| <b>PCR</b>           | реакција ланчаног умножавања (енгл. <i>Polymerase chain reaction</i> )  |
| <b>PDGF</b>          | тромбоцитни фактор раста (енгл. Platelet-derived growth factor)   |
| <b>PET</b>           | позитронска емисиона томографија (енгл. Positron emission tomography)   |
| <b>PF4 (CXCL4)</b>   | тромбоцитни фактор-4 (енгл. Platelet factor 4 или Chemokine (C-X-C motif) ligand 4)   |
| <b>PI3K/AKT/mTOR</b> | сигнални пут фосфатидилинозитол-3-киназа/протеинска киназа В/мета за рапамидин сисара (енгл. phosphatidylinositol-3-kinases/Protein kinase B (AKT)/mechanistic target of rapamycin) |
| <b>PKC</b>           | протеин киназа C (енгл. Protein kinase C)   |
| <b>PNI</b>           | перинеурална инвазија (енгл. Perineural invasion)   |
| <b>PR</b>            | рецептор за прогестерон (енгл. Progesterone receptor)   |
| <b>PTEN</b>          | ген који енкодира продукцију фосфатаза/тензин хомологог протеина (енгл. Phosphatase and tensin homolog gene)  |
| <b>pTNM</b>          | патолошка TNM класификација (енгл. Pathologic TNM classification)   |
| <b>RA</b>            | реуматоидни артритис (енгл. Rheumatoid arthritis)   |
| <b>RAGE</b>          | рецептор за крајње продукте гликације (енгл. Receptor for advanced glycation end products)  |

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>RANTES, CCL5</b>   | хемокин 5 (енгл. Chemokine (C-C motif) ligand 5 или Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted)                     |
| <b>Ras</b>            | онкоген за улогом у регулацији ћелијског циклуса, пролиферације, диференцијације, апоптозе, адхезивности и миграције ћелија.              |
| <b>rIL-33</b>         | рекомбинантни IL-33 (енгл. Recombinant IL-33)   |
| <b>RIP</b>            | протеинска киназа везана за рецептор (енгл. Receptor-interacting protein kinases)   |
| <b>ROC</b>            | крива оперативне карактеристике примаоца (енгл. Receiver operating characteristic)  |
| <b>ROS</b>            | реактивни медијатори кисеоника (енгл. Reactive oxygen species)  |
| <b>SDF-1 (CXCL12)</b> | стромални изведени фактор-1 или хемокин-12 (енгл. Stromal cell-derived factor 1 или Chemokine (C-X-C motif) ligand 12)                    |
| <b>SEM</b>            | стандардна грешка мерења (енгл. Standard error of mean)   |
| <b>SERR</b>           | База података за преживљавање, епидемиологију и крајњи исход (енгл. The Surveillance, Epidemiology, and End Results)                      |
| <b>SIGIRR</b>         | протеин са улогом у модулацији имунског одговора, хемостази епитела дебелог црева и карциногенези (енгл. Single Ig IL-1-related receptor) |
| <b>SLE</b>            | системски лупус еритематозус (енгл. Systemic lupus erythematosus)   |
| <b>Smac</b>           | други активатор каспаза изведен из митохондрија (енгл. Second mitochondria-derived activator of caspases)                                 |
| <b>SMAD</b>           | протеини за пренос сигнала и модулатори транскрипције (енгл. Mothers against decapentaplegic homolog 2)                                   |
| <b>SMR</b>            | стромална-мононуклеарна реакција (енгл. Mononuclear Stromal Reaction)   |
| <b>SOCS</b>           | супресор сигнализације цитокинима (енгл. Suppressor of cytokine signaling)  |
| <b>SP</b>             | супстанца P (енгл. Substance P)   |
| <b>SS</b>             | системска склероза (енгл. Systemic sclerosis)   |
| <b>SUV39H1</b>        | (енгл. Histone-lysine N-methyltransferase)  |
| <b>TAM</b>            | макрофаги повезани са тумором (енгл. Tumor-associated macrophages)  |
| <b>TDLU</b>           | терминални канал лобуларне јединице (енгл. Terminal duct lobular unit)  |
| <b>TGF-β</b>          | трансформишући фактор раста (енгл. Transforming growth factor-β)  |
| <b>Th лимфоцити</b>   | помоћнички T лимфоцити (енгл. T helper)   |
| <b>tie2</b>           | рецептор за ангиопоетин   |
| <b>TIFF</b>           | рачунарски формат за складиштење графичких података високог квалитета (енгл. Tagged image file format)                                    |
| <b>TIMP</b>           | ткивни инхибитор металопротеиназа (енгл. Tissue inhibitor of metalloproteinase)   |
| <b>TIR</b>            | екстрацелуларни домен карактеристичан за рецепторе сличне „toll-u“ и присутан у цитоплазматском делу IL-1R1 (енгл. Toll-IL-1 receptor)    |
| <b>TLR</b>            | рецептори слични „toll-y“ (енгл. Toll-like receptors)   |
| <b>TNF</b>            | фактор некрозе тумора (енгл. Tumor necrosis factor superfamily)   |
| <b>TNFAIP3, A20</b>   | протеин индукован са TNFR3 (енгл. Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3)   |
| <b>TNFR</b>           | рецептор за TNF (енгл. Tumor necrosis factor receptor)  |
| <b>t-PA</b>           | ткивни активатор плазминогена (енгл. Tissue plasminogen activator)  |
| <b>TRADD</b>          | протеин са доменом смрти везан за TNFR1 (енгл. Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein)                     |
| <b>TRAF6</b>          | фактор везан за TNFR6 (енгл. TNF receptor associated factor 6)  |

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| <b>TRAIL</b>                        | апоптозом индукован лиганд повезан са TNF (енгл. TNF-related apoptosis-inducing ligand)   |
| <b>TSH</b>                          | тиреостимулишући хормон (енгл. Thyroid-Stimulating Hormone)   |
| <b>TSLP</b>                         | тимусни стромлани лимфопоетин (енгл. Thymic stromal lymphopoetin)   |
| <b>TSP-1</b>                        | тромбоспондин-1 (енгл. Thrombospondin-1)  |
| <b>UICC</b>                         | Међународна унија за контролу рака (енгл. Union for International Cancer Control)   |
| <b>UK NEQAS</b>                     | Национални сервис за екстерну контролу квалитета Велике Британије (енгл. United Kingdom National External Quality Assessment Service) |
| <b>u-PA</b>                         | урокиназни активатор плазминогена (енгл. Urokinase plasminogen activator)   |
| <b>VEGF</b>                         | васкуларни ендотелни фактор раста (енгл. Vascular endothelial growth factor)  |
| <b>WHO</b>                          | Светска здравствена организација (енгл. World Health Organisation)  |
| <b>WMA</b>                          | Светска медицинска асоцијација (енгл. <i>World Medical Association</i> )  |
| <b>WT</b>                           | дивљи тип (енгл. Wild type)   |
| <b><math>\alpha 5\beta 1</math></b> | интегрин  |
| <b><math>\alpha</math>-SMA</b>      | глатко-мишићни актин- $\alpha$ (енгл. $\alpha$ -smooth muscle actin)  |
| <b><math>\alpha V\beta 1</math></b> | интегрин  |
| <b><math>\alpha V\beta 3</math></b> | интегрин  |

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bergers G, Reikerstorfer A, Braselmann S, Graninger P, Busslinger M. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J.* 1994; 13(5): p. 1176-88.
2. Trajkovic V, Sweet MJ, Xu D. T1/ST2--an IL-1 receptor-like modulator of immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15(2-3): p. 87-95.
3. Sweet MJ, Leung BP, Kang D, Sogaard M, Schulz K, Trajkovic V, Campbell CC, Xu D, Liew FY. A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol.* 2001; 166(11): p. 6633-9.
4. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 2013; 39(6): p. 1003-18.
5. Tago K, Noda T, Hayakawa M, Iwahana H, Yanagisawa K, Yashiro T, Tominaga S. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 285(5): p. 1377-83.
6. Tominaga S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Lett.* 1989; 258(2): p. 301-4.
7. Klemenz R, Hoffmann S, Werenskiold AK. Serum- and oncoprotein-mediated induction of a gene with sequence similarity to the gene encoding carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(15): p. 5708-12.
8. Löhning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, Levinson D, Radbruch A, Kamradt T. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(12): p. 6930-5.
9. Gächter T, Werenskiold AK, Klemenz R. Transcription of the interleukin-1 receptor-related T1 gene is initiated at different promoters in mast cells and fibroblasts. *J Biol Chem.* 1996; 271(1): p. 124-9.
10. Lécart S, Lecointe N, Subramaniam A, Alkan S, Ni D, Chen R, Boulay V, Pène J, Kuroiwa K, Tominaga S, Yssel H. Activated, but not resting human Th2 cells, in contrast to Th1 and T regulatory cells, produce soluble ST2 and express low levels of ST2L at the cell surface. *Eur J Immunol.* 2002; 32(10): p. 2979-87.
11. Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood.* 2009; 113(7): p. 1526-34.

12. Gayle MA, Slack JL, Bonnert TP, Renshaw BR, Sonoda G, Taguchi T, Testa JR, Dower SK, Sims JE. Cloning of a putative ligand for the T1/ST2 receptor. *J Biol Chem*. 1996; 271(10): p. 5784-9.
13. Iwahana H, Yanagisawa K, Ito-Kosaka A, Kuroiwa K, Tago K, Komatsu N, Katashima R, Itakura M, Tominaga S. Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells. *Eur J Biochem*. 1999; 264(2): p. 397-406.
14. Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflamm*. 2011; 8(1): p. 22.
15. Liu X, Hammel M, He Y, Tainer JA, Jeng US, Zhang L, Wang S, Wang X. Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(37): p. 14918-23.
16. Andrade MV, Iwaki S, Ropert C, Gazzinelli RT, Cunha-Melo JR, Beaven MA. Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33. *Eur J Immunol*. 2011; 41(3): p. 760-72.
17. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005; 23(5): p. 479-90.
18. Funakoshi-Tago M, Tago K, Sato Y, Tominaga S, Kasahara T. JAK2 is an important signal transducer in IL-33-induced NF- $\kappa$ B activation. *Cell Signal*. 2011; 23(2): p. 363-70.
19. Bulek K, Swaidani S, Qin J, Lu Y, Gulen MF, Herjan T, Min B, Kastelein RA, Aronica M, Kosz-Vnenchak M, Li X. The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. *J Immunol*. 2009; 182(5): p. 2601-9.
20. Garlanda C, Riva F, Bonavita E, Mantovani A. Negative regulatory receptors of the IL-1 family. *Semin Immunol*. 2013; 25(6): p. 408-15.
21. Kuroiwa K, Li H, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Komatsu N, Oshikawa K, Sugiyama Y, Arai T, Tominaga SI. Construction of ELISA system to quantify human ST2 protein in sera of patients. *Hybridoma*. ; 19(2): p. 151-9.
22. Oshikawa K, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Ohno S, Tominaga SI, Sugiyama Y. Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164(2): p. 277-81.
23. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10(2): p. 103-10.
24. Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in

- allergic airway inflammation. *J Biol Chem.* 2007; 282(36): p. 26369-80.
25. Kumar S, Tzimas MN, Griswold DE, Young PR. Expression of ST2, an interleukin-1 receptor homologue, is induced by proinflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 235(3): p. 474-8.
  26. Oshikawa K, Yanagisawa K, Tominaga S, Sugiyama Y. Expression and function of the ST2 gene in a murine model of allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2002; 32(10): p. 1520-6.
  27. Weinberg EO, Shimpo M, De Keulenaer GW, MacGillivray C, Tominaga S, Solomon SD, Rouleau JL, Lee RT. Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation.* 2002 ; 106(23): p. 2961-6.
  28. Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, Tetsuka T, Tominaga S. Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. *FEBS Lett.* 1993; 318(1): p. 83-7.
  29. Ho JE, Chen WY, Chen MH, Larson MG, McCabe EL, Cheng S, Ghorbani A, Coglianese E, Emilsson V, Johnson AD, Walter S, Franceschini N, O'Donnell CJ; CARDIoGRAM Consortium.; CHARGE Inflammation Working Group., Dehghan A, Lu C, Levy D, Newton-Cheh C; CHARGE He. Common genetic variation at the IL1RL1 locus regulates IL-33/ST2 signaling. *J Clin Invest.* 2013; 123(10): p. 4208-18.
  30. Sattler S, Smits HH, Xu D, Huang FP. The evolutionary role of the IL-33/ST2 system in host immune defence. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013; 61(2): p. 107-17.
  31. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, Bouche G, Girard JP. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(1): p. 282-7.
  32. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One.* 2008; 3(10): p. e3331.
  33. Oshikawa K, Yanagisawa K, Tominaga Si, Sugiyama Y. ST2 protein induced by inflammatory stimuli can modulate acute lung inflammation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 299(1): p. 18-24.
  34. Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard JP. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep.* 2008; 9(10): p. 1006-12.
  35. Cayrol C, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(22): p. 9021-6.



36. Lingel A, Weiss TM, Niebuhr M, Pan B, Appleton BA, Wiesmann C, Bazan JF, Fairbrother WJ. Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors--insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes. *Structure*. 2009; 17(10): p. 1398-410.
37. Martin NT, Martin MU. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol*. 2016; 17(2): p. 122-31.
38. Zhao WH, Hu ZQ. Up-regulation of IL-33 expression in various types of murine cells by IL-3 and IL-4. *Cytokine*. 2012; 58(2): p. 267-73.
39. Su Z, Lin J, Lu F, Zhang X, Zhang L, Gandhi NB, de Paiva CS, Pflugfelder SC, Li DQ. Potential autocrine regulation of interleukin-33/ST2 signaling of dendritic cells in allergic inflammation. *Mucosal Immunol*. 2013; 6(5): p. 921-30.
40. Li C, Li H, Jiang Z, Zhang T, Wang Y, Li Z, Wu Y, Ji S, Xiao S, Ryffel B, Radek KA, Xia Z, Lai Y. Interleukin-33 increases antibacterial defense by activation of inducible nitric oxide synthase in skin. *PLoS Pathog*. 2014; 10(2): p. e1003918.
41. Sundnes O, Pietka W, Loos T, Sponheim J, Rankin AL, Pflanz S, Bertelsen V, Sitek JC, Hol J, Haraldsen G, Khnykin D. Epidermal Expression and Regulation of Interleukin-33 during Homeostasis and Inflammation: Strong Species Differences. *J Invest Dermatol*. 2015; 135(7): p. 1771-80.
42. Meephansan J, Tsuda H, Komine M, Tominaga S, Ohtsuki M. Regulation of IL-33 expression by IFN- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2012; 132(11): p. 2593-600.
43. Seltmann J, Werfel T, Wittmann M. Evidence for a regulatory loop between IFN- $\gamma$  and IL-33 in skin inflammation. *Exp Dermatol*. 2013; 22(2): p. 102-7.
44. Demyanets S, Kaun C, Pentz R, Krychtiuk KA, Rauscher S, Pfaffenberger S, Zuckermann A, Aliabadi A, Gröger M, Maurer G, Huber K, Wojta J. Components of the interleukin-33/ST2 system are differentially expressed and regulated in human cardiac cells and in cells of the cardiac vasculature. *J Mol Cell Cardiol*. 2013; 60: p. 16-26.
45. Kopach P, Lockett V, Pickering EM, Haskell RE, Anderson RD, Hasday JD, Todd NW, Luzina IG, Atamas SP. IFN- $\gamma$  directly controls IL-33 protein level through a STAT1- and LMP2-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2014; 289(17): p. 11829-43.
46. Hu X, Ivashkiv LB. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity*. 2009; 31(4): p. 539-50.
47. Sugita S, Hosaka Y, Okada K, Mori D, Yano F, Kobayashi H, Taniguchi Y, Mori Y, Okuma T, Chang SH, Kawata M, Taketomi S, Chikuda H, Akiyama H, Kageyama R, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, Ohba S, Saito T. Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development in

- cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(10): p. 3080-5.
48. Liang Y, Jie Z, Hou L, Yi P, Wang W, Kwota Z, Salvato M, de Waal Malefyt R, Soong L, Sun J. IL-33 promotes innate IFN- $\gamma$  production and modulates dendritic cell response in LCMV-induced hepatitis in mice. *Eur J Immunol*. 2015; 45(11): p. 3052-63.
  49. Zhang HF, Xie SL, Chen YX, Mai JT, Wang JF, Zhu WL, Zhu LG. Altered serum levels of IL-33 in patients with advanced systolic chronic heart failure: correlation with oxidative stress. *J Transl Med*. 2012; 10: p. 120.
  50. Hammad H, Lambrecht BN. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity*. 2015; 43(1): p. 29-40.
  51. Divekar R, Kita H. Recent advances in epithelium-derived cytokines (IL-33, IL-25, and thymic stromal lymphopoietin) and allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2015; 15(1): p. 98-103.
  52. Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL, Kita H. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123(5): p. 1047-54.
  53. Besnard AG, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol*. 2011; 41(6): p. 1675-86.
  54. Matta BM, Lott JM, Mathews LR, Liu Q, Rosborough BR, Blazar BR, Turnquist HR. IL-33 is an unconventional Alarmin that stimulates IL-2 secretion by dendritic cells to selectively expand IL-33R/ST2+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2014; 193(8): p. 4010-20.
  55. Williams JW, Tjota MY, Clay BS, Vander Lugt B, Bandukwala HS, Hrusch CL, Decker DC, Blaine KM, Fixsen BR, Singh H, Sciammas R, Sperling AI. Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nat Commun*. 2013; 4: p. 2990.
  56. Tjota MY, Hrusch CL, Blaine KM, Williams JW, Barrett NA, Sperling AI. Signaling through Fc $\gamma$ -associated receptors on dendritic cells drives IL-33-dependent TH2-type responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 134(3): p. 706-13.
  57. Kurokawa M, Matsukura S, Kawaguchi M, Ieki K, Suzuki S, Odaka M, Watanabe S, Homma T, Sato M, Yamaguchi M, Takeuchi H, Adachi M. Expression and effects of IL-33 and ST2 in allergic bronchial asthma: IL-33 induces eotaxin production in lung fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011; 155(Suppl 1): p. 12-20.
  58. Bianchetti L, Marini MA, Isgrò M, Bellini A, Schmidt M, Mattoli S. IL-33 promotes the migration and proliferation of circulating fibrocytes from patients with allergen-exacerbated asthma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 426(1): p. 116-21.

59. Hayashi H, Kawakita A, Okazaki S, Murai H, Yasutomi M, Ohshima Y. IL-33 enhanced the proliferation and constitutive production of IL-13 and IL-5 by fibrocytes. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: p. 738625.
60. Onda H, Kasuya H, Takakura K, Hori T, Imaizumi T, Takeuchi T, Inoue I, Takeda J. Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19(11): p. 1279-88.
61. Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, Brandtzaeg P, Erard M, Haraldsen G, Girard JP. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol.* 2003; 163(1): p. 69-79.
62. Sundlisaeter E, Edelmann RJ, Hol J, Sponheim J, Kuchler AM, Weiss M, Udalova IA, Midwood KS, Kasprzycka M, Haraldsen G. The alarmin IL-33 is a notch target in quiescent endothelial cells. *Am J Pathol.* 2012; 181(3): p. 1099-111.
63. Kuchler AM, Pollheimer J, Balogh J, Sponheim J, Manley L, Sorensen DR, De Angelis PM, Scott H, Haraldsen G. Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. *Am J Pathol.* 2008; 173(4): p. 1229-42.
64. Talabot-Ayer D, Martin P, Vesin C, Seemayer CA, Vigne S, Gabay C, Palmer G. Severe neutrophil-dominated inflammation and enhanced myelopoiesis in IL-33-overexpressing CMV/IL33 mice. *J Immunol.* 2015; 194(2): p. 750-60.
65. Zhiguang X, Wei C, Steven R, Wei D, Wei Z, Rong M, Zhanguo L, Lianfeng Z. Over-expression of IL-33 leads to spontaneous pulmonary inflammation in mIL-33 transgenic mice. *Immunol Lett.* 2010; 131(2): p. 159-65.
66. Pichery M, Mirey E, Mercier P, Lefrancais E, Dujardin A, Ortega N, Girard JP. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel Il-33-LacZ gene trap reporter strain. *J Immunol.* 2012; 188(7): p. 3488-95.
67. Préfontaine D, Nadigel J, Chouiali F, Audusseau S, Semlali A, Chakir J, Martin JG, Hamid Q. Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(3): p. 752-4.
68. Louten J, Rankin AL, Li Y, Murphy EE, Beaumont M, Moon C, Bourne P, McClanahan TK, Pflanz S, de Waal Malefyt R. Endogenous IL-33 enhances Th2 cytokine production and T-cell responses during allergic airway inflammation. *Int Immunol.* 2011; 23(5): p. 307-15.
69. Kakkar R, Hei H, Dobner S, Lee RT. Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. *J Biol Chem.* 2012; 287(9): p. 6941-8.

70. Bessa J, Meyer CA, de Vera Mudry MC, Schlicht S, Smith SH, Iglesias A, Cote-Sierra J. Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation. *J Autoimmun.* 2014; 55: p. 33-41.
71. Kalashnikova AA, Porter-Goff ME, Muthurajan UM, Luger K, Hansen JC. The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure. *J R Soc Interface.* 2013; 10(82): p. 20121022.
72. Shao D, Perros F, Caramori G, Meng C, Dormuller P, Chou PC, Church C, Papi A, Casolari P, Welsh D, Peacock A, Humbert M, Adcock IM, Wort SJ. Nuclear IL-33 regulates soluble ST2 receptor and IL-6 expression in primary human arterial endothelial cells and is decreased in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 451(1): p. 8-14.
73. Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R, Schmitz ML, Martin MU. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF- $\kappa$ B to dampen NF- $\kappa$ B-stimulated gene transcription. *J Immunol.* 2014; 187(4): p. 1609-16.
74. Choi YS, Park JA, Kim J, Rho SS, Park H, Kim YM, Kwon YG. Nuclear IL-33 is a transcriptional regulator of NF- $\kappa$ B p65 and induces endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 421(2): p. 305-11.
75. Shan J, Oshima T, Muto T, Yasuda K, Fukui H, Watari J, Nakanishi K, Miwa H. Epithelial-derived nuclear IL-33 aggravates inflammation in the pathogenesis of reflux esophagitis. *J Gastroenterol.* 2015; 50(4): p. 414-23.
76. Zhang F, Tossberg JT, Spurlock CF, Yao SY, Aune TM, Sriram S. Expression of IL-33 and its epigenetic regulation in Multiple Sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2014; 1(5): p. 307-318.
77. Tao L, Chen C, Song H, Piccioni M, Shi G, Li B. Deubiquitination and stabilization of IL-33 by USP21. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 7(8): p. 4930-7.
78. Rider P, Carmi Y, Voronov E, Apte RN. Interleukin-1 $\alpha$ . *Semin Immunol.* 2013; 25(6): p. 430-8.
79. Haraldsen G, Balogh J, Pollheimer J, Sponheim J, K uchler AM. Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? *Trends Immunol.* 2009; 30(5): p. 227-33.
80. Hong J, Bae S, Jhun H, Lee S, Choi J, Kang T, Kwak A, Hong K, Kim E, Jo S, Kim S. Identification of constitutively active interleukin 33 (IL-33) splice variant. *J Biol Chem.* 2011; 286(22): p. 20078-86.
81. L uthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, Brumatti G, Taylor RC, Kersse K, Vandenabeele P, Lavelle EC, Martin SJ. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity.* 2009; 31(1): p. 84-98.

82. Ali S, Nguyen DQ, Falk W, Martin MU. Caspase 3 inactivates biologically active full length interleukin-33 as a classical cytokine but does not prohibit nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 391(3): p. 1512-6.
83. Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Gabay C, Palmer G. Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem.* 2009; 284(29): p. 19420-6.
84. Rickard JA, O'Donnell JA, Evans JM, Lalaoui N, Poh AR, Rogers T, Vince JE, Lawlor KE, Ninnis RL, Anderton H, Hall C, Spall SK, Pheesse TJ, Abud HE, Cengia LH, Corbin J, Mifsud S, Di Rago L, Metcalf D, Ernst M, Dewson G, Roberts AW, Alexander WS, Murphy JM. RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis. *Cell.* 2014; 157(5): p. 1175-88.
85. Chen WY, Hong J, Gannon J, Kakkar R, Lee RT. Myocardial pressure overload induces systemic inflammation through endothelial cell IL-33. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112(23): p. 7249-54.
86. Zhao W, Hu Z. The enigmatic processing and secretion of interleukin-33. *Cell Mol Immunol.* 2010; 7(4): p. 260-2.
87. Lefrançais E, Cayrol C. Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. *Eur Cytokine Netw.* 2012; 23(4): p. 120-7.
88. Lefrançais E, Duval A, Mirey E, Roga S, Espinosa E, Cayrol C, Girard JP. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(43): p. 15502-7.
89. Roy A, Ganesh G, Sippola H, Bolin S, Sawesi O, Dagälv A, Schlenner SM, Feyerabend T, Rodewald HR, Kjellén L, Hellman L, Åbrink M. Mast cell chymase degrades the alarmins heat shock protein 70, biglycan, HMGB1, and interleukin-33 (IL-33) and limits danger-induced inflammation. *J Biol Chem.* 2014; 289(1): p. 237-50.
90. Cohen ES, Scott IC, Majithiya JB, Rapley L, Kemp BP, England E, Rees DG, Overed-Sayer CL, Woods J, Bond NJ, Veysier CS, Embrey KJ, Sims DA, Snaith MR, Vousden KA, Strain MD, Chan DT, Carmen S, Huntington CE, Flavell L, Xu J, Popovic B et al. Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. *Nat Commun.* 2015; 6: p. 8327.
91. Lopetuso LR, Scaldaferrri F, Pizarro TT. Emerging role of the interleukin (IL)-33/ST2 axis in gut mucosal wound healing and fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012; 5(1): p. 18.
92. Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic ML. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *J Hepatol.* ; 56(1): p. 26-33.
93. Kamijo S, Takeda H, Tokura T, Suzuki M, Inui K, Hara M, Matsuda H, Matsuda A, Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S, Sudo K, Suto H, Ichikawa S, Ogawa H, Okumura K, Takai T. IL-33-mediated innate response and adaptive immune cells contribute to maximum responses of protease allergen-

- induced allergic airway inflammation. *J Immunol.* 2013; 190(9): p. 4489-99.
94. Ciccia F, Alessandro R, Rizzo A, Raimondo S, Giardina A, Raiata F, Boiardi L, Cavazza A, Guggino G, De Leo G, Salvarani C, Triolo G. IL-33 is overexpressed in the inflamed arteries of patients with giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72(2): p. 258-64.
  95. Dong R, Dong K, Wang X, Chen G, Shen C, Zheng S. Interleukin-33 overexpression is associated with gamma-glutamyl transferase in biliary atresia. *Cytokine.* 2013; 61(2): p. 433-7.
  96. Byers DE, Alexander-Brett J, Patel AC, Agapov E, Dang-Vu G, Jin X, Wu K, You Y, Alevy Y, Girard JP, Stappenbeck TS, Patterson GA, Pierce RA, Brody SL, Holtzman MJ. Long-term IL-33-producing epithelial progenitor cells in chronic obstructive lung disease. *J Clin Invest.* 2013; 123(9): p. 3967-82.
  97. Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B, Garcia CC, Komai-Koma M, Pitman N, Li Y, Niedbala W, McKenzie AN, Teixeira MM, Liew FY, Xu D. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol.* 2008; 181(7): p. 4780-90.
  98. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol.* 2008; 20(8): p. 1019-30.
  99. Komai-Koma M, Xu D, Li Y, McKenzie AN, McInnes IB, Liew FY. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol.* 2007; 37(10): p. 2779-86.
  100. Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol.* 2007; 179(4): p. 2051-4.
  101. Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121(6): p. 1484-90.
  102. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N, Shepherd M, McSharry C, McInnes IB, Xu D, Liew FY. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol.* 2009; 183(10): p. 6469-77.
  103. Mayuzumi N, Matsushima H, Takashima A. IL-33 promotes DC development in BM culture by triggering GM-CSF production. *Eur J Immunol.* 2009; 39(12): p. 3331-42.
  104. Choi YS, Choi HJ, Min JK, Pyun BJ, Maeng YS, Park H, Kim J, Kim YM, Kwon YG. Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. *Blood.* 2009; 114(14): p. 3117-26.

105. Theoharides TC, Zhang B, Kempuraj D, Tagen M, Vasiadi M, Angelidou A, Alysandratos KD, Kalogeromitros D, Asadi S, Stavrianeas N, Peterson E, Leeman S, Conti P. IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(9): p. 4448-53.
106. Stojkovic S, Kaun C, Heinz M, Krychtiuk KA, Rauscher S, Lemberger CE, de Martin R, Gröger M, Petzelbauer P, Huk I, Huber K, Wojta J, Demyanets S. Interleukin-33 induces urokinase in human endothelial cells--possible impact on angiogenesis. *J Thromb Haemost*. 2014; 12(6): p. 948-57.
107. Wojta J, Zoellner H, Gallicchio M, Hamilton JA, McGrath K. Gamma-interferon counteracts interleukin-1 alpha stimulated expression of urokinase-type plasminogen activator in human endothelial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 188(1): p. 463-9.
108. van Hinsbergh VW, van den Berg EA, Fiers W, Dooijewaard G. Tumor necrosis factor induces the production of urokinase-type plasminogen activator by human endothelial cells. *Blood*. 1990; 75(10): p. 1991-8.
109. Demyanets S, Konya V, Kastl SP, Kaun C, Rauscher S, Niessner A, Pentz R, Pfaffenberger S, Rychli K, Lemberger CE, de Martin R, Heinemann A, Huk I, Gröger M, Maurer G, Huber K, Wojta J. Interleukin-33 induces expression of adhesion molecules and inflammatory activation in human endothelial cells and in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31(9): p. 2080-9.
110. Arroyo AG, Iruela-Arispe ML. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc Res*. 2010; 86(2): p. 226-35.
111. Leeman SE, Ferguson SL. Substance P: an historical perspective. *Neuropeptides*. 2000; 34(5): p. 249-54.
112. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol*. 2004; 201(2): p. 167-80.
113. Kawana S, Liang Z, Nagano M, Suzuki H. Role of substance P in stress-derived degranulation of dermal mast cells in mice. *J Dermatol Sci*. 2006; 42(1): p. 47-54.
114. Kandere-Grzybowska K, Gheorghe D, Priller J, Esposito P, Huang M, Gerard N, Theoharides TC. Stress-induced dura vascular permeability does not develop in mast cell-deficient and neurokinin-1 receptor knockout mice. *Brain Res*. 2003; 980(2): p. 213-20.
115. Remröd C, Lonne-Rahm S, Nordlind K. Study of substance P and its receptor neurokinin-1 in psoriasis and their relation to chronic stress and pruritus. *Arch Dermatol Res*. 2007; 299(2): p. 85-91.
116. Farber EM, Nickoloff BJ, Recht B, Fraki JE. Stress, symmetry, and psoriasis: possible role of neuropeptides. *J Am Acad Dermatol*. 1986; 14(2): p. 305-11.

117. Schön MP, Boehncke WH. Psoriasis. *N Engl J Med.* 2005; 352(18): p. 1899-912.
118. Jiang WY, Raychaudhuri SP, Farber EM. Double-labeled immunofluorescence study of cutaneous nerves in psoriasis. *Int J Dermatol.* 1998; 37(8): p. 572-4.
119. Chan J, Smoller BR, Raychaudhuri SP, Jiang WY, Farber EM. Intraepidermal nerve fiber expression of calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal peptide and substance P in psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 1997; 289(11): p. 611-6.
120. Al'Abadie MS, Senior HJ, Bleehen SS, Gawkrödger DJ. Neuropeptides and general neuronal marker in psoriasis--an immunohistochemical study. *Clin Exp Dermatol.* 1995; 20(5): p. 384-9.
121. Naukkarinen A, Järvikallio A, Lakkakorpi J, Harvima IT, Harvima RJ, Horsmanheimo M. Quantitative histochemical analysis of mast cells and sensory nerves in psoriatic skin. *J Pathol.* 1996; 180(2): p. 200-5.
122. Castellani ML, Kempuraj D, Salini V, Vecchiet J, Tete S, Ciampoli C, Conti F, Cerulli G, Caraffa A, Antinolfi P, Theoharides TC, De Amicis D, Perrella A, Cuccurullo C, Boscolo P, Shaik Y. The latest interleukin: IL-33 the novel IL-1-family member is a potent mast cell activator. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2009; 23(1): p. 11-4.
123. Salven P, Hattori K, Heissig B, Rafii S. Interleukin-1 $\alpha$  promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion. *FASEB J.* 2002; 16(11): p. 1471-3.
124. Silver MR, Margulis A, Wood N, Goldman SJ, Kasaian M, Chaudhary D. IL-33 synergizes with IgE-dependent and IgE-independent agents to promote mast cell and basophil activation. *Inflamm Res.* 2010; 59(3): p. 207-18.
125. Pushparaj PN, Tay HK, H'ng SC, Pitman N, Xu D, McKenzie A, Liew FY, Melendez AJ. The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(24): p. 9773-8.
126. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, Bucks C, Kane CM, Fallon PG, Pannell R, Jolin HE, McKenzie AN. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature.* 2010; 464(7293): p. 1367-70.
127. Yagami A, Orihara K, Morita H, Futamura K, Hashimoto N, Matsumoto K, Saito H, Matsuda A. IL-33 mediates inflammatory responses in human lung tissue cells. *J Immunol.* 2010; 185(10): p. 5743-50.
128. Kondo Y, Yoshimoto T, Yasuda K, Futatsugi-Yumikura S, Morimoto M, Hayashi N, Hoshino T, Fujimoto J, Nakanishi K. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol.* 2008; 20(6): p.



791-800.

129. Stolarski B, Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Xu D, Liew FY. IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation. *J Immunol.* 2010; 185(6): p. 3472-80.
130. Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(43): p. 18581-6.
131. Bartunek J, Delrue L, Van Durme F, Muller O, Casselman F, De Wiest B, Croes R, Verstreken S, Goethals M, de Raedt H, Sarma J, Joseph L, Vanderheyden M, Weinberg EO. Nonmyocardial production of ST2 protein in human hypertrophy and failure is related to diastolic load. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52(25): p. 2166-74.
132. Saidi S, Bouri F, Lencel P, Duplomb L, Baud'huin M, Delplace S, Leterme D, Miellot F, Heymann D, Hardouin P, Palmer G, Magne D. IL-33 is expressed in human osteoblasts, but has no direct effect on bone remodeling. *Cytokine.* 2011; 53(3): p. 347-54.
133. Wood IS, Wang B, Trayhurn P. IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 384(1): p. 105-9.
134. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest.* 2007; 117(6): p. 1538-49.
135. Seki K, Sanada S, Kudinova AY, Steinhauser ML, Handa V, Gannon J, Lee RT. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ Heart Fail.* 2009; 2(6): p. 684-91.
136. Davenport P, Tipping PG. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol.* 2003; 163(3): p. 1117-25.
137. Gupta S, Pablo AM, Jiang Xc, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest.* 1997; 99(11): p. 2752-61.
138. McLaren JE, Michael DR, Salter RC, Ashlin TG, Calder CJ, Miller AM, Liew FY, Ramji DP. IL-33 reduces macrophage foam cell formation. *J Immunol.* 2010; 185(2): p. 1222-9.
139. Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, Pitman N, Kurowska-Stolarska M, McKenzie AN, McInnes IB, Liew FY. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(31): p. 10913-8.
140. Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Toy D, Seemayer CA, Viatte S, Finckh A, Smith DE, Gabay C. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis.

- Arthritis Rheum. 2009; 60(3): p. 738-49.
141. Matsuyama Y, Okazaki H, Hoshino M, Onishi S, Kamata Y, Nagatani K, Nagashima T, Iwamoto M, Yoshio T, Ohto-Ozaki H, Tamemoto H, Komine M, Sekiya H, Tominaga S, Minota S. Sustained elevation of interleukin-33 in sera and synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis non-responsive to anti-tumor necrosis factor: possible association with persistent IL-1 $\beta$  signaling and a poor clinical response. *Rheumatol Int.* 2012; 32(5): p. 1397-401.
  142. Mu R, Huang HQ, Li YH, Li C, Ye H, Li ZG. Elevated serum interleukin 33 is associated with autoantibody production in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2010; 37(10): p. 2006-13.
  143. Xiangyang Z, Lutian Y, Lin Z, Liping X, Hui S, Jing L. Increased levels of interleukin-33 associated with bone erosion and interstitial lung diseases in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine.* 2012; 58(1): p. 6-9.
  144. Hong YS, Moon SJ, Joo YB, Jeon CH, Cho ML, Ju JH, Oh HJ, Heo YJ, Park SH, Kim HY, Min JK. Measurement of interleukin-33 (IL-33) and IL-33 receptors (sST2 and ST2L) in patients with rheumatoid arthritis. *J Korean Med Sci.* 2011; 26(9): p. 1132-9.
  145. Talabot-Ayer D, McKee T, Gindre P, Bas S, Baeten DL, Gabay C, Palmer G. Distinct serum and synovial fluid interleukin (IL)-33 levels in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 2012; 79(1): p. 32-7.
  146. Schulze J, Bickert T, Beil FT, Zaiss MM, Albers J, Wintges K, Streichert T, Klaetschke K, Keller J, Hissnauer TN, Spiro AS, Gessner A, Schett G, Amling M, McKenzie AN, Horst AK, Schinke T. Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells. *J Bone Miner Res.* 2011; 26(4): p. 704-17.
  147. Leung BP, Xu D, Culshaw S, McInnes IB, Liew FY. A novel therapy of murine collagen-induced arthritis with soluble T1/ST2. *J Immunol.* 2004; 173(1): p. 145-50.
  148. Xu D, Jiang HR, Li Y, Pushparaj PN, Kurowska-Stolarska M, Leung BP, Mu R, Tay HK, McKenzie AN, McInnes IB, Melendez AJ, Liew FY. IL-33 exacerbates autoantibody-induced arthritis. *J Immunol.* 2010; 184(5): p. 2620-6.
  149. Keller J, Catala-Lehnen P, Wintges K, Schulze J, Bickert T, Ito W, Horst AK, Amling M, Schinke T. Transgenic over-expression of interleukin-33 in osteoblasts results in decreased osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 417(1): p. 217-22.
  150. Jiang HR, Milovanović M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, Alves-Filho JC, Togbe D, Goodyear CS, Linington C, Xu D, Lukic ML, Liew FY. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- $\gamma$  production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol.* 2012; 42(7): p. 1804-14.

151. Yasuoka S, Kawanokuchi J, Parajuli B, Jin S, Doi Y, Noda M, Sonobe Y, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Production and functions of IL-33 in the central nervous system. *Brain Res.* 2011; 1385: p. 8-17.
152. Li M, Li Y, Liu X, Gao X, Wang Y. IL-33 blockade suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol.* 2012; 247(1-2): p. 25-31.
153. Christophi GP, Gruber RC, Panos M, Christophi RL, Jubelt B, Massa PT. Interleukin-33 upregulation in peripheral leukocytes and CNS of multiple sclerosis patients. *Clin Immunol.* 2012; 142(3): p. 308-19.
154. Jafarzadeh A, Mahdavi R, Jamali M, Hajghani H, Nemati M, Ebrahimi HA. Increased Concentrations of Interleukin-33 in the Serum and Cerebrospinal Fluid of Patients with Multiple Sclerosis. *Oman Med J.* 2016; 31(1): p. 40-5.
155. Milovanovic M, Volarevic V, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic ML. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol Res.* 2012; 52(1-2): p. 89-99.
156. Milovanovic M, Volarevic V, Ljujic B, Radosavljevic G, Jovanovic I, Arsenijevic N, Lukic ML. Deletion of IL-33R (ST2) abrogates resistance to EAE in BALB/C mice by enhancing polarization of APC to inflammatory phenotype. *PLoS One.* 2012; 7(9): p. e45225.
157. Kuroiwa K, Arai T, Okazaki H, Minota S, Tominaga S. Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 284(5): p. 1104-8.
158. Mok MY, Huang FP, Ip WK, Lo Y, Wong FY, Chan EY, Lam KF, Xu D. Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2010; 49(3): p. 520-7.
159. Yang Z, Liang Y, Xi W, Li C, Zhong R. Association of increased serum IL-33 levels with clinical and laboratory characteristics of systemic lupus erythematosus in Chinese population. *Clin Exp Med.* 2011; 11(2): p. 75-80.
160. Manetti M, Ibba-Manneschi L, Liakouli V, Guiducci S, Milia AF, Benelli G, Marrelli A, Conforti ML, Romano E, Giacomelli R, Matucci-Cerinic M, Cipriani P. The IL1-like cytokine IL33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(3): p. 598-605.
161. Yanaba K, Yoshizaki A, Asano Y, Kadono T, Sato S. Serum IL-33 levels are raised in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *Clin Rheumatol.* 2011; 30(6): p. 825-30.
162. Terras S, Opitz E, Moritz RK, Hoxtermann S, Gambichler T, Kreuter A. Increased serum IL-33 levels may indicate vascular involvement in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72(1): p.

- 144-5.
163. Rankin AL, Mumm JB, Murphy E, Turner S, Yu N, McClanahan TK, Bourne PA, Pierce RH, Kastelein R, Pflanz S. IL-33 induces IL-13-dependent cutaneous fibrosis. *J Immunol.* 2010; 184(3): p. 1526-35.
164. Savinko T, Matikainen S, Saarialho-Kere U, Lehto M, Wang G, Lehtimäki S, Karisola P, Reunala T, Wolff H, Lauerma A, Alenius H. IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: expression profiles and modulation by triggering factors. *J Invest Dermatol.* 2012; 132(5): p. 1392-400.
165. Alase A, Seltmann J, Werfel T, Wittmann M. Interleukin-33 modulates the expression of human  $\beta$ -defensin 2 in human primary keratinocytes and may influence the susceptibility to bacterial superinfection in acute atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2012; 167(6): p. 1386-9.
166. Han GW, Zeng LW, Liang CX, Cheng BL, Yu BS, Li HM, Zeng FF, Liu SY. Serum levels of IL-33 is increased in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2011; 30(12): p. 1583-8.
167. Lin CY, Pfluger CM, Henderson RD, McCombe PA. Reduced levels of interleukin 33 and increased levels of soluble ST2 in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2012; 249(1-2): p. 93-5.
168. Hamzaoui K, Kaabachi W, Fazaa B, Zakraoui L, Mili-Boussen I, Haj-Sassi F. Serum IL-33 levels and skin mRNA expression in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2013; 31(3 Suppl 77): p. 6-14.
169. Lopetuso LR, Chowdhry S, Pizarro TT. Opposing Functions of Classic and Novel IL-1 Family Members in Gut Health and Disease. *Front Immunol.* 2013; 4: p. 181.
170. Liu J, Shen JX, Hu JL, Huang WH, Zhang GJ. Significance of interleukin-33 and its related cytokines in patients with breast cancers. *Front Immunol.* 2014; 5: p. 141.
171. Chen SF, Nieh S, Jao SW, Wu MZ, Liu CL, Chang YC, Lin YS. The paracrine effect of cancer-associated fibroblast-induced interleukin-33 regulates the invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2013; 231(2): p. 180-9.
172. Mager LF, Riether C, Schürch CM, Banz Y, Wasmer MH, Stuber R, Theodorides AP, Li X, Xia Y, Saito H, Nakae S, Baerlocher GM, Manz MG, McCoy KD, Macpherson AJ, Ochsenbein AF, Beutler B, Krebs P. IL-33 signaling contributes to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *J Clin Invest.* 2015; 125(7): p. 2579-91.
173. Lu B, Yang M, Wang Q. Interleukin-33 in tumorigenesis, tumor immune evasion, and cancer immunotherapy. *J Mol Med.* 2016; 94(5): p. 535-43.
174. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008; 214(2): p. 199-210.
175. Milosavljevic MZ, Jovanovic IP, Pejnovic NN, Mitrovic SL, Arsenijevic NN, Simovic Markovic BJ,

- Lukic ML. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. *Oncotarget*. 2016; 7(14): p. 18106-15.
176. Tsuda H, Komine M, Karakawa M, Etoh T, Tominaga S, Ohtsuki M. Novel splice variants of IL-33: differential expression in normal and transformed cells. *J Invest Dermatol*. 2012; 132(11): p. 2661-4.
177. Bergis D, Kassis V, Radeke HH. High plasma sST2 levels in gastric cancer and their association with metastatic disease. *Cancer Biomark*. 2016; 16(1): p. 117-25.
178. Bergis D, Kassis V, Ranglack A, Koeberle V, Piiper A, Kronenberger B, Zeuzem S, Waidmann O, Radeke HH. High Serum Levels of the Interleukin-33 Receptor Soluble ST2 as a Negative Prognostic Factor in Hepatocellular Carcinoma. *Transl Oncol*. 2013; 6(3): p. 311-8.
179. Ishikawa K, Yagi-Nakanishi S, Nakanishi Y, Kondo S, Tsuji A, Endo K, Wakisaka N, Murono S, Yoshizaki T. Expression of interleukin-33 is correlated with poor prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Auris Nasus Larynx*. 2014; 41(6): p. 552-7.
180. Liu X, Zhu L, Lu X, Bian H, Wu X, Yang W, Qin Q. IL-33/ST2 pathway contributes to metastasis of human colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 453(3): p. 486-92.
181. Yang ZP, Ling DY, Xie YH, Wu WX, Li JR, Jiang J, Zheng JL, Fan YH, Zhang Y. The Association of Serum IL-33 and sST2 with Breast Cancer. *Dis Markers*. 2015; 2015: p. 516895.
182. Tong X, Barbour M, Hou K, Gao C, Cao S, Zheng J, Zhao Y, Mu R, Jiang HR. Interleukin-33 predicts poor prognosis and promotes ovarian cancer cell growth and metastasis through regulating ERK and JNK signaling pathways. *Mol Oncol*. 2016; 10(1): p. 113-25.
183. Fang KM, Yang CS, Lin TC, Chan TC, Tzeng SF. Induced interleukin-33 expression enhances the tumorigenic activity of rat glioma cells. *Neuro Oncol*. 2014; 16(4): p. 552-66.
184. Wu Z, Zhang H. Prognostic value of interleukin-33 in cervical cancer patients who underwent radical hysterectomy. *Int J Clin Exp Pathol*. 2016;9; 9(5): p. 5466-72.
185. Wang L, Li H, Liang F, Hong Y, Jiang S, Xiao L. Examining IL-33 expression in the cervix of HPV-infected patients: a preliminary study comparing IL-33 levels in different stages of disease and analyzing its potential association with IFN- $\gamma$ . *Med Oncol*. 2014; 31(9): p. 143.
186. Yu XX, Hu Z, Shen X, Dong LY, Zhou WZ, Hu WH. IL-33 Promotes Gastric Cancer Cell Invasion and Migration Via ST2-ERK1/2 Pathway. *Dig Dis Sci*. 2015; 60(5): p. 1265-72.
187. Maywald RL, Doerner SK, Pastorelli L, De Salvo C, Benton SM, Dawson EP, Lanza DG, Berger NA, Markowitz SD, Lenz HJ, Nadeau JH, Pizarro TT, Heaney JD. IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(19): p. E2487-96.
188. Katkoori VR, Shanmugam C, Jia X, Vitta SP, Sthanam M, Callens T, Messiaen L, Chen D, Zhang B,

- Bumpers HL, Samuel T, Manne U. Prognostic significance and gene expression profiles of p53 mutations in microsatellite-stable stage III colorectal adenocarcinomas. *PLoS One*. 2012; 7(1): p. e30020.
189. Cui G, Qi H, Gundersen MD, Yang H, Christiansen I, Sørbye SW, Goll R, Florholmen J. Dynamics of the IL-33/ST2 network in the progression of human colorectal adenoma to sporadic colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2015; 64(2): p. 181-90.
190. Sun P, Ben Q, Tu S, Dong W, Qi X, Wu Y. Serum interleukin- 33 levels in patients with gastric cancer. *Dig Dis Sci*. 2011; 56: p. 3596-601.
191. Hu LA, Fu Y, Zhang DN, Zhang J. Serum IL-33 as a diagnostic and prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14(4): p. 2563-6.
192. Gillibert-Duplantier J, Duthey B, Sisirak V, Salaün D, Gargi T, Trédan O, Finetti P, Bertucci F, Birnbaum D, Bendriss-Vermare N, Badache A. Gene expression profiling identifies sST2 as an effector of ErbB2-driven breast carcinoma cell motility, associated with metastasis. *Oncogene*. 2012; 31(30): p. 3516-24.
193. Gao K, Li X, Zhang L, Bai L, Dong W, Gao K, Shi G, Xia X, Wu L, Zhang L. Transgenic expression of IL-33 activates CD8(+) T cells and NK cells and inhibits tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Lett*. 2013; 335: p. 463–71.
194. Villarreal DO, Wise MC, Walters JN, Reuschel E, Choi MJ, Obeng-Adjei N, Yan J, Morrow MP, Weiner DB. Alarmin IL-33 acts as an immunoadjuvant to enhance antigen-specific tumor immunity. *Cancer Res*. 2014; 74(6): p. 1789-800.
195. Barrera L, Montes-Servín E, Barrera A, Ramírez-Tirado LA, Salinas-Parra F, Bañales-Méndez JL, Sandoval-Ríos M, Arrieta Ó. Cytokine profile determined by data-mining analysis set into clusters of non-small-cell lung cancer patients according to prognosis. *Ann Oncol*. 2015; 26(2): p. 428-35.
196. Musolino C, Allegra A, Profita M, Alonci A, Saitta S, Russo S, Bonanno A, Innao V, Gangemi S. Reduced IL-33 plasma levels in multiple myeloma patients are associated with more advanced stage of disease. *Br J Haematol*. 2013; 160(5): p. 709-10.
197. Zhu Y, Ju S, Chen E, Dai S, Li C, Morel P, Liu L, Zhang X, Lu B. T-bet and eomesodermin are required for T cell-mediated antitumor immune responses. *J Immunol*. 2010; 185(6): p. 3174-83.
198. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006; 313(5795): p. 1960-4.
199. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006 ; 6(4): p.

295-307.

200. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, Lukic ML. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer*. 2014; 134(7): p. 1669-82.
201. Kretschmer C, Sterner-Kock A, Siedentopf F, Schoenegg W, Schlag PM, Kemmner W. Identification of early molecular markers for breast cancer. *Mol Cancer*. 2011; 10(1): p. 15.
202. Landis MD, Seachrist DD, Abdul-Karim FW, Keri RA. Sustained trophism of the mammary gland is sufficient to accelerate and synchronize development of ErbB2/Neu-induced tumors. *Oncogene*. 2006; 25(23): p. 3325-34.
203. Lu DP, Zhou XY, Yao LT, Liu CG, Ma W, Jin F, Wu YF. Serum soluble ST2 is associated with ER-positive breast cancer. *BMC Cancer*. 2014; 14: p. 198.
204. Gilbertson DG, Duff ME, West JW, Kelly JD, Sheppard PO, Hofstrand PD, Gao Z, Shoemaker K, Bukowski TR, Moore M, Feldhaus AL, Humes JM, Palmer TE, Hart CE. Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor. *J Biol Chem*. 2001; 276(29): p. 27406-14.
205. Zwerner JP, May WA. PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming growth factor in Ewing family tumors. *Oncogene*. 2001; 20(5): p. 626-33.
206. Lokker NA, Sullivan CM, Hollenbach SJ, Israel MA, Giese NA. Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Res*. 2002; 62(13): p. 3729-35.
207. Anderberg C, Li H, Fredriksson L, Andrae J, Betsholtz C, Li X, Eriksson U, Pietras K. Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res*. 2009; 69(1): p. 369-78.
208. Crawford Y, Kasman I, Yu L, Zhong C, Wu X, Modrusan Z, Kaminker J, Ferrara N. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell*. 2009; 15(1): p. 21-34.
209. Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*. 1990; 348(6303): p. 699-704.
210. Ehemann CR, Shaw KM, Ryerson AB, Miller JW, Ajani UA, White MC. The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;

- 18(6): p. 1763–9.
211. Vinay K, Abul KA, Jon CA, Nelson F. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th ed. Lyon: Elsevier; 2010.
212. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, Van de Vijver MJ, eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed. Lyon: IARC; 2012.
213. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R. Robbins Basic of Pathology. 8th ed. New York: Elsevier Inc; 2007.
214. Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet.* 2008; 124(1): p. 31-42.
215. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 2004; 95(11): p. 866-71.
216. Venkitaraman AR. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci.* 2001; 114(Pt 20): p. 3591-8.
217. Welch PL, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(7): p. 705-13.
218. Marsh DJ, Dahia PL, Caron S, Kum JB, Frayling IM, Tomlinson IP, Hughes KS, Eeles RA, Hodgson SV, Murday VA, Houlston R, Eng C. Germline PTEN mutations in Cowden syndrome-like families. *J Med Genet.* 1998; 35(11): p. 881-5.
219. Sorrell AD, Espenschied CR, Culver JO, Weitzel JN. Tumor protein p53 (TP53) testing and Li-Fraumeni syndrome : current status of clinical applications and future directions. *Mol Diagn Ther.* 2013; 17(1): p. 31-47.
220. Marabelli M, Cheng SC, Parmigiani G. Penetrance of ATM Gene Mutations in Breast Cancer: A Meta-Analysis of Different Measures of Risk. *Genet Epidemiol.* 2016; 40(5): p. 425-31.
221. Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med.* 2005; 353(16): p. 1652-4.
222. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int.* 2014; 2014: p. 852748.
223. Field JK, Spandidos DA. The role of ras and myc oncogenes in human solid tumours and their relevance in diagnosis and prognosis (review). *Anticancer Res.* 1990; 10(1): p. 1-22.
224. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL,



- Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406(6797): p. 747-52.
225. Chen WY. Exogenous and endogenous hormones and breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008; 22(4): p. 573-85.
226. Hyder SM, Huang JC, Nawaz Z, Boettger-Tong H, Mäkelä S, Chiappetta C, Stancel GM. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by estrogens and progestins. *Environ Health Perspect*. 2000; 108(Suppl 5): p. 785-90.
227. Choi KC, Kang SK, Tai CJ, Auersperg N, Leung PC. Estradiol up-regulates antiapoptotic Bcl-2 messenger ribonucleic acid and protein in tumorigenic ovarian surface epithelium cells. *Endocrinology*. 2001; 142(6): p. 2351-60.
228. Guibout C, Adjadj E, Rubino C, Shamsaldin A, Grimaud E, Hawkins M, Mathieu MC, Oberlin O, Zucker JM, Panis X, Lagrange JL, Daly-Schveitzer N, Chavaudra J, de Vathaire F. Malignant breast tumors after radiotherapy for a first cancer during childhood. *J Clin Oncol*. 2005; 23(1): p. 197-204.
229. Poste G, Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*. 1980; 283(5743): p. 139-46.
230. Hunter KW, Crawford NP, Alsarraj J. Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res*. 2008; 10(Suppl 1): p. S2.
231. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*. 2010; 70(14): p. 5649-69.
232. Fidler IJ, Gersten DM, Hart IR. The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv Cancer Res*. 1978; 28: p. 149-250.
233. Li DM, Feng YM. Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets. *Breast Cancer Res Treat*. 2011; 128(1): p. 7-21.
234. Wendt MK, Taylor MA, Schiemann BJ, Schiemann WP. Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. *Mol Biol Cell*. 2011; 22(14): p. 2423-35.
235. Gould Rothberg BE, Bracken MB. E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2006; 100(2): p. 139-48.
236. Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res*. 2003; 5(6): p. 217-22.
237. Kotb AM, Hierholzer A, Kemler R. Replacement of E-cadherin by N-cadherin in the mammary gland leads to fibrocystic changes and tumor formation. *Breast Cancer Res*. 2011; 13(5): p. 104.

238. Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, Waltham M, Thompson EW, Polette M, Gilles C. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010; 15(2): p. 261-73.
239. Ota I, Li XY, Hu Y, Weiss SJ. Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(48): p. 20318-23.
240. Mego M, Mani SA, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010; 7(12): p. 693-701.
241. Danø K, Behrendt N, Høyer-Hansen G, Johnsen M, Lund LR, Ploug M, Rømer J. Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost*. 2005; 93(4): p. 676-81.
242. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(3): p. 161-74.
243. Huang HY, Jiang ZF, Li QX, Liu JY, Wang T, Zhang R, Zhao J, Xu YM, Bao W, Zhang Y, Jia LT, Yang AG. Inhibition of human breast cancer cell invasion by siRNA against urokinase-type plasminogen activator. *Cancer Invest*. 2010; 28(7): p. 689-97.
244. Götte M, Yip GW. Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Res*. 2006; 66(21): p. 10233-7.
245. Arvatz G, Shafat I, Levy-Adam F, Ilan N, Vlodavsky I. The heparanase system and tumor metastasis: is heparanase the seed and soil? *Cancer Metastasis Rev*. 2011; 30(2): p. 253-68.
246. Roskams T, Rosenbaum J, De Vos R, David G, Desmet V. Heparan sulfate proteoglycan expression in chronic cholestatic human liver diseases. *Hepatology*. 1996; 24(3): p. 524-32.
247. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989; 8(2): p. 98-101.
248. Psaila B, Kaplan RN, Port ER, Lyden D. Priming the 'soil' for breast cancer metastasis: the pre-metastatic niche. *Breast Dis*. 2006-2007; 26: p. 65-74.
249. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(5): p. 392-401.
250. De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 2003; 9(6): p. 789-95.
251. Fidler IJ, Kim SJ, Langley RR. The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis. *J Cell Biochem*. 2007; 101(4): p. 927-36.
252. Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1796(2): p. 293-308.

253. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(4): p. 239-52.
254. Kuhn NZ, Tuan RS. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol*. 2010; 222(2): p. 268-77.
255. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(4): p. 274-84.
256. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(4): p. 285-93.
257. Coghlin C, Murray GI. Current and emerging concepts in tumour metastasis. *J Pathol*. 2010; 222(1): p. 1-15.
258. Lin EY, Pollard JW. Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res*. 2007; 67(11): p. 5064-6.
259. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008; 454(7203): p. 436-44.
260. Gao D, Mittal V. The role of bone-marrow-derived cells in tumor growth, metastasis initiation and progression. *Trends Mol Med*. 2009; 15(8): p. 333-43.
261. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol*. 2009; 86(5): p. 1065-73.
262. Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell*. 2009; 15(5): p. 416-28.
263. Robinson BD, Sica GL, Liu YF, Rohan TE, Gertler FB, Condeelis JS, Jones JG. Tumor microenvironment of metastasis in human breast carcinoma: a potential prognostic marker linked to hematogenous dissemination. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(7): p. 2433-41.
264. Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(8): p. 584-93.
265. Parker B, Sukumar S. Distant metastasis in breast cancer: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Cancer Biol Ther*. 2003; 2(1): p. 14-21.
266. Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Gupta GP, Giri DD, Doubrovin M, Ponomarev V, Gerald WL, Blasberg R, Massagué J. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest*. 2005; 115(1): p. 44-55.
267. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya

- M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell*. 2002; 2(4): p. 289-300.
268. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massagué J. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005; 436(7050): p. 518-24.
269. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Córdón-Cardo C, Guise TA, Massagué J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 2003; 3(6): p. 537-49.
270. de Castro Junior G, Puglisi F, de Azambuja E, El Saghier NS, Awada A. Angiogenesis and cancer: A cross-talk between basic science and clinical trials (the "do ut des" paradigm). *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006; 59(1): p. 40-50.
271. Hanahan D, Weinberg RA. Hanahan D, Weinberg RA. *Cell*. 2011; 144(5): p. 646-74.
272. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000; 407(6801): p. 249-57.
273. Fan F, Schimming A, Jaeger D, Podar K. Targeting the tumor microenvironment: focus on angiogenesis. *J Oncol*. 2012; 2012: p. 281261.
274. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 2005; 307(5706): p. 58-62.
275. Leite de Oliveira R, Hamm A, Mazzone M. Growing tumor vessels: more than one way to skin a cat - implications for angiogenesis targeted cancer therapies. *Mol Aspects Med*. 2011; 32(2): p. 71-87.
276. Subramaniam DS, Isaacs C. Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2005; 6(2): p. 147-59.
277. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*. 2004; 9(6): p. 606-16.
278. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer*. 2010; 17(4): p. 245-62.
279. Ly A, Lester SC, Dillon D. Prognostic Factors for Patients with Breast Cancer: Traditional and New. *Surg Pathol Clin*. 2012; 5(3): p. 775-85.
280. Fasching PA, Heusinger K, Haeberle L, Niklos M, Hein A, Bayer CM, Rauh C, Schulz-Wendtland R, Bani MR, Schrauder M, Kahmann L, Lux MP, Strehl JD, Hartmann A, Dimmler A, Beckmann MW, Wachter DL. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer*. 2011; 11: p. 486.

281. Puzstai L, Ayers M, Stec J, Hortobágyi GN. Clinical application of cDNA microarrays in oncology. *Oncologist*. 2003; 8(3): p. 252-8.
282. Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer*. 2008; 44(7): p. 946-53.
283. Hefti MM, Hu R, Knoblauch NW, Collins LC, Haibe-Kains B, Tamimi RM, Beck AH. Estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast cancer is not a reproducible subtype. *Breast Cancer Res*. 2013; 15(4): p. R68.
284. Lønning PE. Breast cancer prognostication and prediction: are we making progress? *Ann Oncol*. 2007; 18(Suppl 8): p. viii3-7.
285. Tonini G, Fratto ME, Schiavon G. Molecular prognostic factors: clinical implications in patients with breast cancer. *Cancer Therapy*. 2008; 6(2): p. 773-82.
286. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Richardson AL, Schnitt SJ, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Badve S, Ellis IO. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res*. 2010; 12(4): p. 207.
287. Ellis MJ, Tao Y, Luo J, A'Hern R, Evans DB, Bhatnagar AS, Chaudri Ross HA, von Kameke A, Miller WR, Smith I, Eiermann W, Dowsett M. Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100(19): p. 1380–8.
288. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Ignatiadis M, Sengstag T, Schütz F, Goldstein DR, Piccart M, Delorenzi M. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res*. 2008; 10(4): p. R65.
289. Simpson JF, Gray R, Dressler LG, Cobau CD, Falkson CI, Gilchrist KW, Pandya KJ, Page DL, Robert NJ. Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189. *J Clin Oncol*. 2000; 18(10): p. 2059–69.
290. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, Blamey RW, Ellis IO. Prognostic significance of nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008; 26(10): p. 3153–8.
291. Saimura M, Fukutomi T, Tsuda H, Sato H, Miyamoto K, Akashi-Tanaka S, Nanasawa T. Prognosis of a series of 763 consecutive node-negative invasive breast cancer patients without adjuvant therapy: analysis of clinicopathological prognostic factor. *J Surg Oncol*. 1999; 71(2): p. 101–5.

292. Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg.* 2002; 235(1): p. 10–26.
293. Reed W, Hannisdal E, Boehler PJ, Gundersen S, Host H, Marthin J. The prognostic value of p53 and c-erb B-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors in 613 patients with a follow-up of 14-30 years. *Cancer.* 2000; 88(4): p. 804–13.
294. Yang Q, Mori I, Sakurai T, Yoshimura G, Suzuma T, Nakamura Y, Nakamura M, Taniguchi E, Tamaki T, Umemura T, Kakudo K. Correlation between nuclear grade and biological prognostic variables in invasive breast cancer. *Breast Cancer.* 2001; 8(2): p. 105-10.
295. Bergers E, Baak JP, van Diest PJ, van Gorp LH, Kwee WS, Los J, Peterse HL, Ruitenberg HM, Schapers RF, Somsen JG, van Beek MW, Bellot SM, Fijnheer J. Prognostic implications of different cell cycle analysis models of flow cytometric DNA histograms of 1,301 breast cancer patients: results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project (MMMCP). *Int J Cancer.* 1997; 74(3): p. 260-9.
296. Baak JP. Mitosis counting in tumors. *Hum Pathol.* 1990; 21(7): p. 683-5.
297. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast.* 2008; 17(4): p. 323-34.
298. Baak JP, van Diest PJ, Janssen EA, Gudlaugsson E, Voorhorst FJ, van der Wall E, Vermorken JB; Collaborators of Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project (MMMCP). Proliferation accurately identifies the high-risk patients among small, low-grade, lymph node-negative invasive breast cancers. *Ann Oncol.* 2008; 19(4): p. 649-54.
299. Andre F, Khalil A, Slimane K, Massard C, Mathieu MC, Vignot S, Assi H, Delaloge S, Spielmann M. Mitotic index and benefit of adjuvant anthracycline-based chemotherapy in patients with early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23(13): p. 2996-3000.
300. Janssen EA, van Diest PJ, Søiland H, Gudlaugson E, Nysted A, Voorhorst FJ, Vermorken JB, Søreide JA, Baak JP. Success predictors of adjuvant chemotherapy in node-negative breast cancer patients under 55 years. *Cell Oncol.* 2006; 28(5-6): p. 295-303.
301. Vincent-Salomon A, Rousseau A, Jouve M, Beuzeboc P, Sigal-Zafrani B, Fréneaux P, Rosty C, Nos C, Campana F, Klijanienko J, Al Ghuzlan A, Sastre-Garau X; Breast Cancer Study Group. Proliferation markers predictive of the pathological response and disease outcome of patients with breast carcinomas treated by anthracycline-based preoperative chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2004; 40(10): p. 1502-8.

302. Penault-Llorca F, Abrial C, Raoufils I, Chollet P, Cayre A, Mouret-Reynier MA, Thivat E, Mishellany F, Gimbergues P, Durando X. Changes and predictive and prognostic value of the mitotic index, Ki-67, cyclin D1, and cyclo-oxygenase-2 in 710 operable breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Oncologist*. 2008; 13(12): p. 1235-45.
303. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983; 31(1): p. 13-20.
304. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984; 133(4): p. 1710-5.
305. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000; 182(3): p. 311-22.
306. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991; 19(5): p. 403-10.
307. Elston CW, Ellis IO. *The Breast*. Edinburgh: Churchill-Livingstone; 1998.
308. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957; 11(3): p. 359-77.
309. Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, Peterse JL, Mukai K, Tabár L, Jacquemier J, Cornelisse CJ, Sasco AJ, Kaaks R, Pisani P, Goldgar DE, Devilee P, Cleton-Jansen MJ, Børresen-Dale AL, van't Veer L, Sapino A. Invasive breast carcinoma. In Tavassoli FA, Devilee P. *WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC; 2003. p. 13-59.
310. Mollberg NM, Bennette C, Howell E, Backhus L, Devine B, Ferguson MK. Lymphovascular invasion as a prognostic indicator in stage I non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Thorac Surg*. 2014; 97(3): p. 965-71.
311. Rakha EA, Martin S, Lee AH, Morgan D, Pharoah PD, Hodi Z, Macmillan D, Ellis IO. The prognostic significance of lymphovascular invasion in invasive breast carcinoma. *Cancer*. 2012; 118(15): p. 3670-80.
312. Lim SB, Yu CS, Jang SJ, Kim TW, Kim JH, Kim JC. Prognostic significance of lymphovascular invasion in sporadic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2010; 53(4): p. 377-84.
313. Kim SH, Yang HK, Moon KC, Lee ES. Localized non-conventional renal cell carcinoma: prediction of clinical outcome according to histology. *Int J Urol*. 2014; 21(4): p. 359-64.

314. Cheng L, Jones TD, Lin H, Eble JN, Zeng G, Carr MD, Koch MO. Lymphovascular invasion is an independent prognostic factor in prostatic adenocarcinoma. *J Urol*. 2005; 174(6): p. 2181-5.
315. Fujita K, Tanigawa G, Imamura R, Nakagawa M, Hayashi T, Kishimoto N, Hosomi M, Yamaguchi S. Preoperative serum sodium is associated with cancer-specific survival in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma treated by nephroureterectomy. *Int J Urol*. 2013; 20(6): p. 594-601.
316. Seisen T, Colin P, Hupertan V, Yates DR, Xylinas E, Nison L, Cussenot O, Neuzillet Y, Bensalah K, Novara G, Montorsi F, Zigeuner R, Remzi M, Shariat SF, Rouprêt M. Postoperative nomogram to predict cancer-specific survival after radical nephroureterectomy in patients with localised and/or locally advanced upper tract urothelial carcinoma without metastasis. *BJU Int*. 2014; 114(5): p. 733-40.
317. Shen SD, Zhong SZ, Wang CZ, Huang WH. Correlation of lymphovascular invasion with clinicopathological factors in invasive breast cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(10): p. 17789-95.
318. Wei YS, Yao DS, Long Y. Evaluation of the association between perineural invasion and clinical and histopathological features of cervical cancer. *Mol Clin Oncol*. 2016; 5(3): p. 307-11.
319. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer*. 2009; 115(15): p. 3379-91.
320. Bilici A, Seker M, Ustaalioglu BB, Kefeli U, Yildirim E, Yavuzer D, Aydin FM, Salepci T, Oncel M, Gumus M. Prognostic significance of perineural invasion in patients with gastric cancer who underwent curative resection. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17(8): p. 2037-44.
321. Binmadi NO, Basile JR. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: a discussion of significance and review of the literature. *Oral Oncol*. 2011; 47(11): p. 1005-10.
322. Demir IE, Ceyhan GO, Liebl F, D'Haese JG, Maak M, Friess H. Neural invasion in pancreatic cancer: the past, present and future. *Cancers (Basel)*. 2010; 2(3): p. 1513-27.
323. Roh J, Muelleman T, Tawfik O, Thomas SM. Perineural growth in head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Oral Oncol*. 2015; 51(1): p. 16-23.
324. Jiang N, Deng JY, Liu Y, Ke B, Liu HG, Liang H. Incorporation of perineural invasion of gastric carcinoma into the 7th edition tumor-node-metastasis staging system. *Tumour Biol*. 2014; 35(9): p. 9429-36.
325. Klonk S, Deuticke B. Involvement of cytoskeletal proteins in the barrier function of the human erythrocyte membrane. I. Impairment of resealing and formation of aqueous pores in the ghost membrane after modification of SH groups. *Biochim Biophys Acta*. 1992; 1106(1): p. 126-36.



326. Cui L, Shi Y, Zhang GN. Perineural invasion as a prognostic factor for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2015; 292(1): p. 13-9.
327. Karak SG, Quatrano N, Buckley J, Ricci A Jr. Prevalence and significance of perineural invasion in invasive breast carcinoma. *Conn Med.* 2010; 74(1): p. 17-21.
328. Duraker N, Caynak ZC, Türköz K. Perineural invasion has no prognostic value in patients with invasive breast carcinoma. *Breast.* 2006; 15(5): p. 629-34.
329. Black MM, Barclay TH, Hankey BF. Prognosis in breast cancer utilizing histologic characteristics of the primary tumor. *Cancer.* 1975; 36(6): p. 2048-55.
330. Berg JW. Morphological evidence for immune response to breast cancer. An historical review. *Cancer.* 1971; 28(6): p. 1453-6.
331. Underwood JC. Lymphoreticular infiltration in human tumours: prognostic and biological implications: a review. *Br J Cancer.* 1974; 30(6): p. 538-48.
332. Hamlin IM. Possible host resistance in carcinoma of the breast: a histological study. *Br J Cancer.* 1968; 22(3): p. 383-401.
333. Moore OS Jr, Foote FW Jr. The relatively favorable prognosis of medullary carcinoma of the breast. *Cancer.* 1949; 2(4): p. 635-42.
334. Crissman JD. Tumor-host interactions as prognostic factors in the histologic assessment of carcinomas. *Pathol Annu.* 1986; 21(Pt 1): p. 29-52.
335. Ridolfi RL, Rosen PP, Port A, Kinne D, Miké V. Medullary carcinoma of the breast: a clinicopathologic study with 10 year follow-up. *Cancer.* 1977; 40(4): p. 1365-85.
336. Champion HR, Wallace IW, Prescott RJ. Histology in breast cancer prognosis. *Br J Cancer.* 1972; 26(2): p. 129-38.
337. AK B. Application of monoclonal antibodies to tissue diagnosis. In DeLellis R, editor. *Advances in Immunochemistry.* New York: Masson Publishing; 1984. p. 1-30.
338. Schoorl R, Riviere AB, Borne AE, Feltkamp-Vroom TM. Identification of T and B lymphocytes in human breast cancer with immunohistochemical techniques. *Am J Pathol.* 1976; 84(3): p. 529-44.
339. Bhan AK, DesMarais CL. Immunohistologic characterization of major histocompatibility antigens and inflammatory cellular infiltrate in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1983; 71(3): p. 507-16.
340. Shimokawara I, Imamura M, Yamanaka N, Ishii Y, Kikuchi K. Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance: an immunoperoxidase study with

- anti-human T- and B-cell sera. *Cancer*. 1982; 49(7): p. 1456-64.
341. Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH. TNM residual tumor classification revisited. *Cancer*. 2002; 94(2): p. 2511-6.
342. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF, Hughes LL, Hutter RV, Morrow M, Page DL, Recht A, Theriault RL, Thor A, Weaver DL, Wieand HS, Greene FL. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002; 20(17): p. 3628-36.
343. Sobin LH, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours, UICC New York: Wiley-Liss; 2002.
344. National Cancer Institute Surveillance Epidemiology, and End Results SEER\* Stat software. [Online]. [cited 30.12.2016]. Available from: [www.seer.cancer.gov/seerstat](http://www.seer.cancer.gov/seerstat) .
345. Elston CW, Ellis IO, Pinder SE. Pathological prognostic factors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1999; 31(3): p. 209-23.
346. Guerra I, Algorta J, Díaz de Otazu R, Pelayo A, Fariña J. Immunohistochemical prognostic index for breast cancer in young women. *Mol Pathol*. 2003; 56(6): p. 323-7.
347. Sjögren S, Inganäs M, Lindgren A, Holmberg L, Bergh J. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol*. 1998; 16(2): p. 462-9.
348. Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L. p53 in node-negative breast carcinoma: an immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *J Clin Oncol*. 1995; 13(4): p. 821-30.
349. Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW, Johnson J, Doyle PJ, Campbell FC, Nicholson RI, Griffiths K. A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1982; 45(3): p. 361-6.
350. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1992; 22(3): p. 207-19.
351. Miller DV, Leontovich AA, Lingle WL, Suman VJ, Mertens ML, Lillie J, Ingalls KA, Perez EA, Ingle JN, Couch FJ, Visscher DW. Utilizing Nottingham Prognostic Index in microarray gene expression profiling of breast carcinomas. *Mod Pathol*. 2004; 17(7): p. 756-64.
352. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(19): p. 10869-74.

353. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, Meltzer P, Gusterson B, Esteller M, Kallioniemi OP, Wilfond B, Borg A, Trent J, Raffeld M, Yakhini Z, Ben-Dor A, Dougherty E, Kononen J, Bubendorf L, Fehrle W, Pittaluga S, Gruvberger S, Loma. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med.* 2001; 344(8): p. 539-48.
354. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002; 415(6871): p. 530-6.
355. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002; 347(25): p. 1999-2009.
356. Gruvberger S, Ringnér M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg A, Fernö M, Peterson C, Meltzer PS. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res.* 2001; 61(16): p. 5979-84.
357. West M, Blanchette C, Dressman H, Huang E, Ishida S, Spang R, Zuzan H, Olson JA Jr, Marks JR, Nevins JR. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(20): p. 11462-7.
358. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Bernards R, Friend SH. Expression profiling predicts outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2003; 5(1): p. 57-8.
359. Ahr A, Holtrich U, Solbach C, Scharl A, Strebhardt K, Karn T, Kaufmann M. Molecular classification of breast cancer patients by gene expression profiling. *J Pathol.* 2001; 195(3): p. 312-20.
360. Kwatra A, Aggarwal D, Gupta R, Chaturvedi AK, Kudesia M, Singh S. Correlation of various histopathologic prognostic factors with Nottingham prognostic index and microvessel density in invasive breast carcinoma: A study of 100 cases. *Indian J Cancer.* 2015; 52(1): p. 110-3.
361. Walker RA, Lees E, Webb MB, Dearing SJ. Breast carcinomas occurring in young women are different. *Br J Cancer.* 1996; 74(11): p. 1796-800.
362. Bertheau P, Steinberg SM, Merino MJ. C-erbB-2, p53, and nm23 gene product expression in breast cancer in young women: immunohistochemical analysis and clinicopathologic correlation. *Hum Pathol.* 1998; 29(4): p. 323-9.
363. Kothari AS, Fentiman IS. Breast cancer in young women. *Int J Clin Pract.* 2002; 56(3): p. 184-7.
364. Muramatsu M, Inoue S. Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive

- functions? *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 270(1): p. 1-10.
365. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1988; 240(4854): p. 889-95.
366. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995; 83(6): p. 835-9.
367. Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, Brawley OW. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Res Treat.* 2002; 76(1): p. 27-36.
368. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol.* 1988; 6(7): p. 1076-87.
369. Anderson WF, Chu KC, Chatterjee N, Brawley O, Brinton LA. Tumor variants by hormone receptor expression in white patients with node-negative breast cancer from the surveillance, epidemiology, and end results database. *J Clin Oncol.* 2001; 19(1): p. 18-27.
370. Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2007; 9(1): p. R6.
371. Wetendorf M, DeMayo FJ. Progesterone receptor signaling in the initiation of pregnancy and preservation of a healthy uterus. *Int J Dev Biol.* 2014; 58(2-4): p. 95-106.
372. Osborne CK, Schiff R, Arpino G, Lee AS, Hilsenbeck VG. Endocrine responsiveness: understanding how progesterone receptor can be used to select endocrine therapy. *Breast.* 2005; 14(6): p. 458-65.
373. Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 72(2): p. 163-72.
374. Abdel-Hafiz H, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB. The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression. *J Biol Chem.* 2002; 277(37): p. 33950-6.
375. Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG, Cui Y, Allred DC, Horwitz KB, Fuqua SA. Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(8): p. 2751-60.
376. Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res.* 2001; 3(6): p. 385-9.

377. Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The role of overexpressed HER2 in transformation. *Ann Oncol.* 2001; 12(Suppl 1): p. 9-13.
378. Ménard S, Pupa SM, Campiglio M, Tagliabue E. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene.* 2003; 22(42): p. 6570-8.
379. Riese DJ 2nd, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays.* 1998; 20(1): p. 41-8.
380. van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol.* 1994; 10: p. 251-337.
381. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(7): p. 505-16.
382. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene.* 2007; 26(45): p. 6469-87.
383. Nahta R, Yuan LX, Zhang B, Kobayashi R, Esteva FJ. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res.* 2005; 65(23): p. 11118-28.
384. Fukushige S, Matsubara K, Yoshida M, Sasaki M, Suzuki T, Semba K, Toyoshima K, Yamamoto T. Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. *Mol Cell Biol.* 1986; 6(3): p. 955-8.
385. Reichelt U, Duesedau P, Tsourlakis MCh, Quaas A, Link BC, Schurr PG, Kaifi JT, Gros SJ, Yekebas EF, Marx A, Simon R, Izbicki JR, Sauter G. Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus. *Mod Pathol.* 2007; 20(1): p. 120-9.
386. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987; 235(4785): p. 177-82.
387. Press MF, Pike MC, Chazin VR, Hung G, Udove JA, Markowicz M, Danyluk J, Godolphin W, Sliwkowski M, Akita R, et al. Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res.* 1993; 53(20): p. 4960-70.
388. Seshadri R, Fergaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 1993; 11(10): p. 1936-42.
389. Park K, Han S, Kim HJ, Kim J, Shin E. HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ

- hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology*. 2006; 48(6): p. 702-7.
390. Gabos Z, Sinha R, Hanson J, Chauhan N, Hugh J, Mackey JR, Abdulkarim B. Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24(36): p. 5658-63.
391. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol*. 2005; 16(10): p. 1569-83.
392. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology. 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): p. 3997-4013.
393. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009; 137(3): p. 413-31.
394. Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011: p. 978312.
395. Soussi T, Bérout C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1(3): p. 233-40.
396. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): p. 57-70.
397. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*. 1991; 352(6333): p. 345-7.
398. Toledo F, Krummel KA, Lee CJ, Liu CW, Rodewald LW, Tang M, Wahl GM. A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network. *Cancer Cell*. 2006; 9(4): p. 273-85.
399. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(5): p. 402-12.
400. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. 1994; 9(6): p. 1799-805.
401. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax

- gene. *Cell*. 1995; 80(2): p. 293-9.
402. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993; 74(4): p. 609-19.
403. Müller M, Strand S, Hug H, Heinemann EM, Walczak H, Hofmann WJ, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest*. 1997; 99(3): p. 403-13.
404. Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*. 1998; 188(11): p. 2033-45.
405. Giono LE, Manfredi JJ. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J Cell Physiol*. 2006; 209(1): p. 13-20.
406. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001; 20(15): p. 1803-15.
407. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(10): p. 701-13.
408. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990; 250(4985): p. 1233-8.
409. Blaszyk H, Hartmann A, Cunningham JM, Schaid D, Wold LE, Kovach JS, Sommer SS. A prospective trial of midwest breast cancer patients: a p53 gene mutation is the most important predictor of adverse outcome. *Int J Cancer*. 2000; 89(1): p. 32-8.
410. Børresen AL, Andersen TI, Eyfjörd JE, Cornelis RS, Thorlacius S, Borg A, Johansson U, Theillet C, Scherneck S, Hartman S, et al. TP53 mutations and breast cancer prognosis: particularly poor survival rates for cases with mutations in the zinc-binding domains. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995; 14(1): p. 71-5.
411. Bergh J, Norberg T, Sjögren S, Lindgren A, Holmberg L. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med*. 1995; 1(10): p. 1029-34.
412. Geisler S, Lønning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, Lillehaug JR, Akslen LA, Børresen-Dale AL. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res*. 2001; 61(6): p. 2505-12.

413. Norberg T, Lennerstrand J, Inganäs M, Bergh J. Comparison between p53 protein measurements using the luminometric immunoassay and immunohistochemistry with detection of p53 gene mutations using cDNA sequencing in human breast tumors. *Int J Cancer*. 1998; 79(4): p. 376-83.
414. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(14): p. 8418-23.
415. Correa Geyer F, Reis-Filho JS. Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: are we there yet? *Int J Surg Pathol*. 2009; 17(4): p. 285-302.
416. Geyer FC, Lopez-Garcia MA, Lambros MB, Reis-Filho JS. Genetic characterization of breast cancer and implications for clinical management. *J Cell Mol Med*. 2009; 13(10): p. 4090-103.
417. Munjal K, Ambaye A, Evans MF, Mitchell J, Nandedkar S, Cooper K. Immunohistochemical analysis of ER, PR, Her2 and CK5/6 in infiltrative breast carcinomas in Indian patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2009; 10(5): p. 773-8.
418. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, Perou CM. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2006; 19(2): p. 264-71.
419. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslén LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(16): p. 5367-74.
420. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006; 295(21): p. 2492-502.
421. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, Perou CM, Nielsen TO. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(5): p. 1368-76.
422. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. ; 109(1): p. 25-32.
423. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61(2): p. 69-90.
424. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJ, Naghavi M. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*.



- 2011; 378(9801): p. 1461-84.
425. Registar za rak u Centralnoj Srbiji. Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2013. Beograd: Institut za zaštitu zdravlja Srbije, Centar za prevenciju i kontrolu nezaraznih oboljenja; 2015.
426. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013; 49(6): p. 1374-403.
427. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melin. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2009; 16(1): p. 3-11.
428. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 2004; 16(6): p. 663-9.
429. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1757(9-10): p. 1371-87.
430. Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*. 2006; 20(1): p. 1-15.
431. Yuan J. Divergence from a dedicated cellular suicide mechanism: exploring the evolution of cell death. *Mol Cell*. 2006; 23(1): p. 1-12.
432. Zitvogel L, Casares N, Péquignot MO, Chaput N, Albert ML, Kroemer G. Immune response against dying tumor cells. *Adv Immunol*. 2004; 84: p. 131-79.
433. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000; 407(6805): p. 784-8.
434. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4): p. 495–516.
435. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26(4): p. 239-57.
436. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41: p. 367-401.
437. Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000; 301(1): p. 5-17.
438. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*.

- 2002; 2(4): p. 277-88.
439. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 2005; 22(3): p. 355-70.
440. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001; 104(4): p. 487-501.
441. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281(5381): p. 1305-8.
442. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*. 1997; 272(51): p. 32401-10.
443. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol*. 1998; 10(5): p. 545-51.
444. Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*. 2001; 20(17): p. 2122-33.
445. Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, Rosenwald A, Climent J, Martinez JI, Schilhabel M, Karran EL, Gesk S, Esteller M, deLeeuw R, Staudt LM, Fernandez-Luna JL, Pinkel D, Dyer MJ, Martinez-Climent JA. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*. 2005; 106(9): p. 3214-22.
446. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 1995; 81(4): p. 495-504.
447. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 1995; 14(22): p. 5579-88.
448. Hitoshi Y, Lorens J, Kitada SI, Fisher J, LaBarge M, Ring HZ, Francke U, Reed JC, Kinoshita S, Nolan GP. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity*. 1998; 8(4): p. 461-71.
449. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004; 23(16): p. 2861-74.
450. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000; 102(1): p. 33-42.
451. van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K,

- Vandekerckhove J, Declercq W, Vandenameele P. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* 2002; 9(1): p. 20-6.
452. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 2006; 13(9): p. 1423-33.
453. Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia.* 1999; 1(1): p. 5-15.
454. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J.* 2004; 23(10): p. 2134-45.
455. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* 2004; 64(20): p. 7183-90.
456. Ekert PG, Vaux DL. The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol.* 2005; 17(6): p. 626-30.
457. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(9): p. 647-56.
458. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 2001; 29(Pt 6): p. 684-8.
459. Brunner T, Wasem C, Torgler R, Cima I, Jakob S, Corazza N. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol.* 2003; 15(3): p. 167-76.
460. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(10): p. 735-47.
461. Pardo J, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Naval J, Müllbacher A, Anel A, Simon MM. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol.* 2004; 167(3): p. 457-68.
462. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998; 391(6662): p. 96-9.
463. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(6): p. 401-9.
464. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ.* 2001; 322(7301): p. 1536-8.

465. Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci.* 2000; 23: p. 73-87.
466. Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol.* 2003; 4(5): p. 410-5.
467. Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; 30(9): p. 1019-30.
468. Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology.* 1991; 129(5): p. 2799-801.
469. Lund LR, Rømer J, Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ, Danø K, Werb Z. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development.* 1996; 122(1): p. 181-93.
470. Harman D. Role of free radicals in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1992; 673: p. 126-41.
471. Ozawa T. Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1271(1): p. 177-89.
472. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 1998; 60: p. 601-17.
473. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994; 73(8): p. 2013-26.
474. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 1988; 335(6189): p. 440-2.
475. Wang XW, Harris CC. p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *J Cell Physiol.* 1997; 173(2): p. 247-55.
476. Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Metelev V, Pardee AB. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science.* 1995; 268(5209): p. 429-31.
477. Ethell DW, Buhler LA. Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. *J Clin Immunol.* 2003; 23(6): p. 439-46.
478. Chen N, Karantza-Wadsworth V. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1793(9): p. 1516-23.
479. Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1793(4): p. 664-73.

480. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. ; 451(7182): p. 1069-75.
481. Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Saftig P, Nishino I. Lysosomal myopathies: an excessive build-up in autophagosomes is too much to handle. *Neuromuscul Disord*. 2008; 18(7): p. 521-9.
482. Winslow AR, Rubinsztein DC. Autophagy in neurodegeneration and development. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1782(12): p. 723-9.
483. Orvedahl A, Levine B. Eating the enemy within: autophagy in infectious diseases. *Cell Death Differ*. 2009; 16(1): p. 57-69.
484. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, Xavier RJ, Sleckman BP, Li E, Mizushima N, Stappenbeck TS, Virgin HW 4th. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*. 2008; 456(7219): p. 259-63.
485. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*. 2008; 456(7219): p. 264-8.
486. Yen WL, Klionsky DJ. How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiology (Bethesda)*. 2008; 23: p. 248-62.
487. Jin S, White E. Tumor suppression by autophagy through the management of metabolic stress. *Autophagy*. 2008; 4(5): p. 563-6.
488. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol*. 2005; 169(3): p. 425-34.
489. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiisa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 2004; 432(7020): p. 1032-6.
490. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. 2005; 120(2): p. 237-48.
491. Onodera J, Ohsumi Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem*. 2005; 280(36): p. 31582-6.
492. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, G elinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts

- necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006; 10(1): p. 51-64.
493. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, White E. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev*. 2007; 21(13): p. 1621-35.
494. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S, White E. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev*. 2007; 21(11): p. 1367-81.
495. Ito H, Daido S, Kanzawa T, Kondo S, Kondo Y. Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells. *Int J Oncol*. 2005; 26(5): p. 1401-10.
496. Gills JJ, Lopiccolo J, Tsurutani J, Shoemaker RH, Best CJ, Abu-Asab MS, Borojerdi J, Warfel NA, Gardner ER, Danish M, Hollander MC, Kawabata S, Tsokos M, Figg WD, Steeg PS, Dennis PA. Nelfinavir, A lead HIV protease inhibitor, is a broad-spectrum, anticancer agent that induces endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(17): p. 5183-94.
497. Katayama M, Kawaguchi T, Berger MS, Pieper RO. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death Differ*. 2007; 14(3): p. 548-58.
498. Pan J, Chen B, Su CH, Zhao R, Xu ZX, Sun L, Lee MH, Yeung SC. Autophagy induced by farnesyltransferase inhibitors in cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2008; 7(10): p. 1679-84.
499. Park MA, Zhang G, Martin AP, Hamed H, Mitchell C, Hylemon PB, Graf M, Rahmani M, Ryan K, Liu X, Spiegel S, Norris J, Fisher PB, Grant S, Dent P. Vorinostat and sorafenib increase ER stress, autophagy and apoptosis via ceramide-dependent CD95 and PERK activation. *Cancer Biol Ther*. 2008; 7(10): p. 1648-62.
500. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 2007; 21(22): p. 2861-73.
501. Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci*. 2005; 118(Pt 1): p. 7-18.
502. Massey A, Kiffin R, Cuervo AM. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(12): p. 2420-34.
503. Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy*. 2008; 4(4): p. 510-2.
504. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(12): p. 961-7.

505. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006; 441(7092): p. 431-6.
506. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*. 2007; 131(6): p. 1149-63.
507. Sakai Y, Oku M, van der Klei IJ, Kiel JA. Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1763(12): p. 1767-75.
508. Proskuryakov SY, Gabai VL. Mechanisms of tumor cell necrosis. *Curr Pharm Des*. 2010; 16(1): p. 56-68.
509. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res*. 2003; 283(1): p. 1-16.
510. Boujrad H, Gubkina O, Robert N, Krantic S, Susin SA. AIF mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. *Cell Cycle*. 2007; 6(21): p. 2612-9.
511. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*. 2007; 32(1): p. 37-43.
512. Steinbach JP, Klumpp A, Wolburg H, Weller M. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling protects human malignant glioma cells from hypoxia-induced cell death. *Cancer Res*. 2004; 64(5): p. 1575-8.
513. Carretero J, Medina PP, Blanco R, Smit L, Tang M, Roncador G, Maestre L, Conde E, Lopez-Rios F, Clevers HC, Sanchez-Cespedes M. Dysfunctional AMPK activity, signalling through mTOR and survival in response to energetic stress in LKB1-deficient lung cancer. *Oncogene*. 2007; 26(11): p. 1616-25.
514. Ginouves A, Ilc K, Macias N, Pouyssegur J, Berra E. PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIFalpha and protects cells from necrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(12): p. 4745-50.
515. Bras M, Yuste VJ, Roué G, Barbier S, Sancho P, Virely C, Rubio M, Baudet S, Esquerda JE, Merle-Béral H, Sarfati M, Susin SA. Drp1 Mediates Caspase-Independent Type III Cell Death in Normal and Leukemic Cells. *Mol Cell Biol*. 2007; 27(20): p. 7073-88.
516. Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev*. 2004; 18(11): p. 1272-82.

517. Scholz C, Wieder T, Stärck L, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Dörken B, Daniel PT. Arsenic trioxide triggers a regulated form of caspase-independent necrotic cell death via the mitochondrial death pathway. *Oncogene*. 2005; 24(11): p. 1904-13.
518. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1776(1): p. 86-107.
519. Kallio A, Zheng A, Dahllund J, Heiskanen KM, Harkonen P. Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis*. 2005; 10(6): p. 1395-410.
520. Zheng A, Kallio A, Harkonen P. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signalregulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. *Endocrinology*. 2007; 148(6): p. 2764-77.
521. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R. Role of noncanonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ*. 2008; 15(8): p. 1318-29.
522. Li L, Han W, Gu Y, Qiu S, Lu Q, Jin J, Luo J, Hu X. Honokiol induces a necrotic cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Cancer Res*. 2007; 67(10): p. 4894-903.
523. Han W, Li L, Qiu S, Lu Q, Pan Q, Gu Y, Luo J, Hu X. Shikonin circumvents cancer drug resistance by induction of a necroptotic death. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6(5): p. 1641-9.
524. Seluanov A, Gorbunova V, Falcovitz A, Sigal A, Milyavsky M, Zurer I, Shohat G, Goldfinger N, Rotter V. Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(5): p. 1552-64.
525. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): p. 57-70.
526. Dinnen RD, Drew L, Petrylak DP, Mao Y, Cassai N, Szmulewicz J, Brandt-Rauf P, Fine RL. Activation of targeted necrosis by a p53 peptide: a novel death pathway that circumvents apoptotic resistance. *J Biol Chem*. 2007; 282(37): p. 26675-86.
527. Gurova KV, Gudkov AV. Paradoxical role of apoptosis in tumor progression. *J Cell Biochem*. 2003; 88(1): p. 128-37.
528. Gurova KV, Kwek SS, Koman IE, Komarov AP, Kandel E, Nikiforov MA, Gudkov AV. Apoptosis inhibitor as a suppressor of tumor progression: expression of Bcl-2 eliminates selective advantages for p53-deficient cells in the tumor. *Cancer Biol Ther*. 2002; 1(1): p. 39-44.
529. Jin S, DiPaola RS, Mathew R, White E. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci*. 2007; 120(3): p. 379-83.
530. Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy*. 2007;



- 3(1): p. 28-31.
531. Vakkila J, Lotze MT. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(8): p. 641-8.
532. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 2007; 117(5): p. 1175-83.
533. Ullrich E, Bonmort M, Mignot G, Kroemer G, Zitvogel L. Tumor stress, cell death and the ensuing immune response. *Cell Death Differ.* 2008; 15(1): p. 21-8.
534. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, Lidereau R, Mariette C, Chaput N, Mira JP, Delaloge S, André F, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev.* 2007; 220(1): p. 47-59.
535. Zitvogel L, Kroemer G. Death, danger, and immunity: an infernal trio. *Immunol Rev.* 2007; 220(1): p. 5-7.
536. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Noguez C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, A. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 2007; 13(9): p. 1050-9.
537. Amaravadi RK, Thompson CB. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(24): p. 7271-9.
538. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997; 86(6626): p. 671-4.
539. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995; 1(1): p. 27-31.
540. Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol.* 1991; 53: p. 217-39.
541. Klagsbrun M, Moses MA. Molecular angiogenesis. *Chem Biol.* 1999; 6(8): p. 217-24.
542. Moses MA. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells.* 1997; 15(3): p. 180-9.
543. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 282(5): p. 947-70.
544. Maybin JA, Hirani N, Brown P, Jabbour HN, Critchley HO. The regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia and prostaglandin F<sub>2</sub>α during human endometrial repair. *J Clin Endocrinol*

- Metab. 2011; 96(8): p. 2475-83.
545. Maybin JA, Critchley HO. Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. *Hum Reprod Update*. 2015; 21(6): p. 748-61.
546. Kaitu'u-Lino TJ, Morison NB, Salamonsen LA. Estrogen is not essential for full endometrial restoration after breakdown: lessons from a mouse model. *Endocrinology*. 2007; 148(10): p. 5105-11.
547. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, Boocock CA, Smith SK. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod*. 1999; 48(5): p. 1120-8.
548. Sharkey AM, Day K, McPherson A, Malik S, Licence D, Smith SK, Charnock-Jones DS. Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85(1): p. 402-9.
549. Fan X, Krieg S, Kuo CJ, Wiegand SJ, Rabinovitch M, Druzin ML, Brenner RM, Giudice LC, Nayak NR. VEGF blockade inhibits angiogenesis and reepithelialization of endometrium. *FASEB J*. 2008; 22(10): p. 3571-80.
550. Girling JE, Rogers PA. Recent advances in endometrial angiogenesis research. *Angiogenesis*. 2005; 8(2): p. 89-99.
551. Nayak NR, Brenner RM. Vascular proliferation and vascular endothelial growth factor expression in the rhesus macaque endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(4): p. 1845-55.
552. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med*. 2003; 198(8): p. 1201-12.
553. Dosiou C, Giudice LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev*. 2005; 26(1): p. 44-62.
554. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(9): p. 656-63.
555. Robson A, Harris LK, Innes BA, Lash GE, Aljunaidy MM, Aplin JD, Baker PN, Robson SC, Bulmer JN. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *FASEB J*. 2012; 26(12): p. 4876-85.
556. Greenwood JD, Minhas K, di Santo JP, Makita M, Kiso Y, Croy BA. Ultrastructural studies of implantation sites from mice deficient in uterine natural killer cells. *Placenta*. 2000; 21(7): p. 693-702.

557. Ashkar AA, Black GP, Wei Q, He H, Liang L, Head JR, Croy BA. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. *J Immunol.* 2003; 171(6): p. 2937-44.
558. Wilkens J, Male V, Ghazal P, Forster T, Gibson DA, Williams AR, Brito-Mutunayagam SL, Craigon M, Lourenco P, Cameron IT, Chwalisz K, Moffett A, Critchley HO. Uterine NK cells regulate endometrial bleeding in women and are suppressed by the progesterone receptor modulator asoprisnil. *J Immunol.* 2013; 191(5): p. 2226-35.
559. Henderson TA, Saunders PT, Moffett-King A, Groome NP, Critchley HO. Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(1): p. 440-9.
560. Salamonsen LA, Butt AR, Hammond FR, Garcia S, Zhang J. Production of endometrial matrix metalloproteinases, but not their tissue inhibitors, is modulated by progesterone withdrawal in an in vitro model for menstruation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(5): p. 1409-15.
561. Hannan NJ, Salamonsen LA. Role of chemokines in the endometrium and in embryo implantation. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007; 19(3): p. 266-72.
562. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, Cahill DJ, Emili A, Fitzgerald DJ, Maguire PB. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood.* 2004; 103(6): p. 2096-104.
563. Bauer SM, Bauer RJ, Velazquez OC. Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. *Vasc Endovascular Surg.* 2005; 39(4): p. 293-306.
564. Wietecha MS, Cerny WL, DiPietro LA. Mechanisms of vessel regression: toward an understanding of the resolution of angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013; 367: p. 3-32.
565. Bodnar RJ, Yates CC, Rodgers ME, Du X, Wells A. IP-10 induces dissociation of newly formed blood vessels. *J Cell Sci.* 2009; 122(Pt 12): p. 2064-77.
566. Yates CC, Whaley D, Kulasekaran P, Hancock WW, Lu B, Bodnar R, Newsome J, Hebda PA, Wells A. Delayed and deficient dermal maturation in mice lacking the CXCR3 ELR-negative CXC chemokine receptor. *Am J Pathol.* 2007; 171(2): p. 484-95.
567. Bodnar RJ. Chemokine Regulation of Angiogenesis During Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015; 4(11): p. 641-650.
568. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82(1): p. 4-6.
569. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(2): p. 237-

- 268.
570. Algire GH, Chalkley HW. Vascular reactions of normal and malignant tissue in vivo. I. *J Natl Cancer Ins.* 1945; 6: p. 73–85.
571. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971; 285(21): p. 1182-6.
572. Eichhorn ME, Kleespies A, Angele MK, Jauch KW, Bruns CJ. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langenbecks Arch Surg.* 2007; 392(3): p. 371-9.
573. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004; 350(23): p. 2335-42.
574. Folkman J, Kalluri R. Cancer without disease. *Nature.* 2004; 427(6977): p. 787.
575. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(6): p. 401-10.
576. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature.* 2005; 438(7070): p. 967-74.
577. O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG, Folkman J, Moses MA. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J Biol Chem.* 1999; 274(41): p. 29568-71.
578. Harris AL. Hypoxia: a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: p. 38–47.
579. Maxwell PH. The HIF pathway in cancer. *Semin Cell Dev Bio.* 2005; 16(4-5): p. 523–30.
580. Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer.* 2003; 97(6): p. 1573–81.
581. Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M, Jakesz R, Kubista E, Birner P, Oberhuber G; Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(6): p. 1831-7.
582. Trastour C, Benizri E, Ettore F, Ramaioli A, Chamorey E, Pouysségur J, Berra E. HIF-1alpha and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome. *Int J Cancer.* 2007; 120(7): p. 1451–58.
583. Dales JP, Garcia S, Meunier-Carpentier S, Andrac-Meyer L, Haddad O, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha predicts early relapse

- in breast cancer: retrospective study in a series of 745 patients. *Int J Cancer*. 2005; 116(5): p. 734-9.
584. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J*. 2003; 17(2): p. 271-3.
585. Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EH, Kondo Y, Hara S, Conaway RC, Conaway JW, Ohh M. Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem*. 2003; 278(13): p. 11032-40.
586. Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(13): p. 5675–86.
587. Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Inves*. 2007; 117(4): p. 862–5.
588. Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. Hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) induces angiogenesis in breast carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006; 14(1): p. 78-82.
589. Leek RD, Talks KL, Pezzella F, Turley H, Campo L, Brown NS, Bicknell R, Taylor M, Gatter KC, Harris AL. Relation of hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) expression in tumor-infiltrative macrophages to tumor angiogenesis and the oxidative thymidine phosphorylase pathway in Human breast cancer. *Cancer Res*. 2002; 62(5): p. 1326-9.
590. Greenblatt M, Shubi P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst*. 1968; 41(1): p. 111-24.
591. Ehrmann RL, Knoth M. Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *J Natl Cancer Inst*. 1968; 41(6): p. 1329-41.
592. Neufeld G, Kessler O. Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006; 25(3): p. 373-85.
593. Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007; 62(3): p. 179-213.
594. Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary. *Cancer Res*. 1997; 57(5): p. 963-9.

595. Fox SB, Gasparini G, Harris AL. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol.* 2001; 2(5): p. 278-89.
596. Nikitenko LL, Fox SB, Kehoe S, Rees MC, Bicknell R. Adrenomedullin and tumour angiogenesis. *Br J Cancer.* 2006; 94(1): p. 1-7.
597. Engels K, Fox SB, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Up-regulation of thymidine phosphorylase expression is associated with a discrete pattern of angiogenesis in ductal carcinomas in situ of the breast. *J Pathol.* 1997; 182(4): p. 414-20.
598. Fox SB, Westwood M, Moghaddam A, Comley M, Turley H, Whitehouse RM, Bicknell R, Gatter KC, Harris AL. The angiogenic factor platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase is up-regulated in breast cancer epithelium and endothelium. *Br J Cancer.* 1996; 73(3): p. 275-80.
599. Italiano JE Jr, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom S, Folkman J, Klement GL. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood.* 2008; 111(3): p. 1227-33.
600. Sehgal S, Storrie B. Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release. *J Thromb Haemost.* 2007; 5(10): p. 2009-16.
601. Drake CJ, Little CD. Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(17): p. 7657-61.
602. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9(6): p. 669-76.
603. Bielenberg DR, Pettaway CA, Takashima S, Klagsbrun M. Neuropilins in neoplasms: expression, regulation, and function. *Exp Cell Res.* 2006; 312(5): p. 584-93.
604. Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, Mikami Y, Tanaka K, Yamamoto S, Sonoo H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. *Jpn J Cancer Res.* 1999; 90(9): p. 977-81.
605. Okada K, Osaki M, Araki K, Ishiguro K, Ito H, Ohgi S. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha), VEGF-C and VEGF-D in non-invasive and invasive breast ductal carcinomas. *Anticancer Res.* 2005; 25(4): p. 3003-9.
606. Gunningham SP, Currie MJ, Han C, Robinson BA, Scott PA, Harris AL, Fox SB. The short form of the alternatively spliced flt-4 but not its ligand vascular endothelial growth factor C is related to

- lymph node metastasis in human breast cancers. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(11): p. 4278-86.
607. Currie MJ, Hanrahan V, Gunningham SP, Morrin HR, Frampton C, Han C, Robinson BA, Fox SB. Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with hypoxia inducible factor (HIF-1alpha) and the HIF-1alpha target gene DEC1, but not lymph node metastasis in primary human breast carcinomas. *J Clin Pathol.* 2004; 57(8): p. 829-34.
608. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yang Q, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(2): p. 716-21.
609. Kinoshita J, Kitamura K, Kabashima A, Saeki H, Tanaka S, Sugimachi K. Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2001; 66(2): p. 159-64.
610. Yang W, Klos K, Yang Y, Smith TL, Shi D, Yu D. ErbB2 overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial growth factors A, C, and D in human breast carcinoma. *Cancer.* 2002; 94(11): p. 2855-61.
611. Mylona E, Alexandrou P, Giannopoulou I, Liapis G, Sofia M, Keramopoulos A, Nakopoulou L. The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2007; 104(3): p. 557-63.
612. Plank MJ, Sleeman BD, Jones PF. The role of the angiopoietins in tumour angiogenesis. *Growth Factors.* 2004; 22(1): p. 1-11.
613. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997; 277(5322): p. 55-60.
614. Szebenyi G, Fallon JF. Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int Rev Cytol.* 1999; 185: p. 45-106.
615. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene.* 2003; 22(42): p. 6549-56.
616. Sargiannidou I, Zhou J, Tuszynski GP. The role of thrombospondin-1 in tumor progression. *Exp Biol Med (Maywood).* 2001; 226(8): p. 726-33.
617. Wong SH, Hamel L, Chevalier S, Philip A. Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF-beta signalling receptors. *Eur J Biochem.* 2000; 267(17): p. 5550-60.

618. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000; 342(18): p. 1350-8.
619. Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther.* 2003; 98(2): p. 257-65.
620. Zhu HJ, Burgess AW. Regulation of transforming growth factor-beta signaling. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2001; 4(6): p. 321-30.
621. Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, Syro LV, Kovacs K, Lloyd RV. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res.* 2011; 31(6): p. 2283-90.
622. Hata A, Shi Y, Massagué J. TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today.* 1998; 4(6): p. 257-62.
623. Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992; 267(27): p. 19027-30.
624. Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem.* 1999; 274(2): p. 584-94.
625. Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 2000; 19(8): p. 1745-54.
626. Bellón T, Corbí A, Lastres P, Calés C, Cebrián M, Vera S, Cheifetz S, Massague J, Letarte M, Bernabéu C. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol.* 1993; 23(9): p. 2340-5.
627. Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem.* 2002; 277(32): p. 29197-209.
628. Lastres P, Martín-Perez J, Langa C, Bernabéu C. Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J.* 1994; 301(Pt 3): p. 765-8.
629. Wang JM, Kumar S, Pye D, Haboubi N, al-Nakib L. Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86(5): p. 386-8.
630. Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S, Natali PG, Maio M. Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol.* 2001;



- 188(1): p. 1-7.
631. Li C, Guo B, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N, Kumar S. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer*. 2000; 89(2): p. 122-6.
632. Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*. 1999; 284(5419): p. 1534-7.
633. Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, Sedlacek HH, Müller R, Adamkiewicz J. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer*. 1999; 81(4): p. 568-72.
634. Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J*. 2000; 14(1): p. 55-64.
635. Choi KS, Bae MK, Jeong JW, Moon HE, Kim KW. Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol*. 2003; 36(1): p. 120-7.
636. Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabéu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem*. 2002; 277(46): p. 43799-808.
637. Tian F, Zhou AX, Smits AM, Larsson E, Goumans MJ, Heldin CH, Borén J, Akyürek LM. Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 392(3): p. 283-8.
638. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES, Thorpe PE. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res*. 1995; 1(12): p. 1623-34.
639. Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, Ellis LM. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(7): p. 1931-7.
640. Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniewska K, Harris AL. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet*. 1992; 340(8828): p. 1120-4.
641. Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am J Pathol*. 1988; 133(2): p. 419-23.
642. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T. Association of tumour vasculature with tumour progression and overall survival of patients with non-early gastric carcinomas. *Br J Cancer*.

- 1997; 75(4): p. 566-71.
643. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1992; 84(24): p. 1875-87.
644. Page DL, Jensen RA. Angiogenesis in human breast carcinoma: what is the question? *Hum Pathol.* 1995; 26(11): p. 1173-4.
645. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer.* 1996; 32(14): p. 2474-84.
646. Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, Kimura Y, Kinoshita J, Miyazaki M, Abe T. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery.* 2002; 131(1 Suppl): p. 109-13.
647. Behrem S, Zarkovic K, Eskinja N, Jonjic N. Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma. *Croat Med J.* 2005; 46(3): p. 417-22.
648. Yao Y, Kubota T, Takeuchi H, Sato K. Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody. *Neuropathology.* 2005; 25(3): p. 201-6.
649. Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res.* 1999; 59(4): p. 856-61.
650. Tabata M, Kondo M, Haruta Y, Seon BK. Antiangiogenic radioimmunotherapy of human solid tumors in SCID mice using (125)I-labeled anti-endoglin monoclonal antibodies. *Int J Cancer.* 1999; 82(5): p. 737-42.
651. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yamada T, Hanaoka N, Inui K, Wada H. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(11): p. 3410-5.
652. Yao Y, Pan Y, Chen J, Sun X, Qiu Y, Ding Y. Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of primary hepatocellular carcinomas: analysis using tissue microarrays and comparisons with CD34 and VEGF. *Ann Clin Lab Sci.* 2007; 37(1): p. 39-48.
653. Wikström P, Lissbrant IF, Stattin P, Egevad L, Bergh A. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate.* 2002; 51(4): p. 268-75.

654. Schimming R, Marmé D. Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck*. 2002; 24(2): p. 151-6.
655. Brewer CA, Setterdahl JJ, Li MJ, Johnston JM, Mann JL, McAsey ME. Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. *Obstet Gynecol*. 2000; 96(2): p. 224-8.
656. Pizarro CB, Oliveira MC, Pereira-Lima JF, Leães CG, Kramer CK, Schuch T, Barbosa-Coutinho LM, Ferreira NP. Evaluation of angiogenesis in 77 pituitary adenomas using endoglin as a marker. *Neuropathology*. 2009; 29(1): p. 40-4.
657. Ho JW, Poon RT, Sun CK, Xue WC, Fan ST. Clinicopathological and prognostic implications of endoglin (CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(2): p. 176-81.
658. Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y, Tsai H, Seon BK. Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res*. 2001; 7(3): p. 524-32.
659. Myśliwiec P, Pawlak K, Kukliński A, Kedra B. Combined perioperative plasma endoglin and VEGF--a assessment in colorectal cancer patients. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009; 47(2): p. 231-6.
660. Marioni G, D'Alessandro E, Giacomelli L, Staffieri A. CD105 is a marker of tumour vasculature and a potential target for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2010; 39(5): p. 361-7.
661. Fox SB. Quantitative angiogenesis in breast cancer. *Methods Mol Med*. 2006; 120: p. 161–187.
662. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94(12): p. 883-93.
663. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen consumption and tissue oxygenation of human tumors. *Adv Exp Med Biol*. 1990; 277: p. 895-905.
664. Fox SB, Gatter KC, Bicknell R, Going JJ, Stanton P, Cooke TG, Harris AL. Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. *Cancer Res*. 1993; 53(18): p. 4161-3.
665. Kakolyris S, Giatromanolaki A, Koukourakis M, Leigh IM, Georgoulas V, Kanavaros P, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL. Assessment of vascular maturation in non-small cell lung cancer using a novel basement membrane component, LH39: correlation with p53 and angiogenic factor expression. *Cancer Res*. 1999; 59(21): p. 5602-7.
666. Kakolyris S, Fox SB, Koukourakis M, Giatromanolaki A, Brown N, Leek RD, Taylor M, Leigh IM, Gatter KC, Harris AL. Relationship of vascular maturation in breast cancer blood vessels to vascular density and metastasis, assessed by expression of a novel basement membrane component, LH39. *Br*

- J Cancer. 2000; 82(4): p. 844-51.
667. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*. 1999; 284(5422): p. 1994-8.
668. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene*. 1999; 18(38): p. 5356-62.
669. Patan S, Munn LL, Jain RK. Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc Res*. 1996; 51(2): p. 260-72.
670. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol*. 2000; 50(1-2): p. 1-15.
671. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999; 85(3): p. 221-8.
672. Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL, Kähler CM, Grünewald K, Stockhammer G, Gabl C, Dirnhofer S, Clausen J, Gastl G. Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet*. 2000; 355(9216): p. 1688-91.
673. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest*. 2000; 105(1): p. 17-9.
674. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*. 1999; 18(14): p. 3964-72.
675. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, Antin JH, Myerson D, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW, Lengauer C. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med*. 2005; 11(3): p. 261-2.
676. Young PP, Vaughan DE, Hatzopoulos AK. Biologic properties of endothelial progenitor cells and their potential for cell therapy. *Prog Cardiovasc Dis*. 2007; 49(6): p. 421-9.
677. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*. 2000; 7(11): p. 1194-201.

678. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, Schaper W. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res.* 2004; 94(2): p. 230-8.
679. Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, Jaggi JS, Bambino K, Gupta S, Heikamp E, McDevitt MR, Scheinberg DA, Benezra R, Mittal V. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev.* 2007; 21(12): p. 1546-58.
680. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell.* 2006; 124(1): p. 175-89.
681. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.* 2004; 10(8): p. 858-64.
682. Shirakawa K, Wakasugi H, Heike Y, Watanabe I, Yamada S, Saito K, Konishi F. Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Int J Cancer.* 2002; 99(6): p. 821-8.
683. Brat DJ, Van Meir EG. Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research. *Am J Pathol.* 2001; 158(3): p. 789-96.
684. Straume O, Chappuis PO, Salvesen HB, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Goffin JR, Bégin LR, Foulkes WD, Akslen LA. Prognostic importance of glomeruloid microvascular proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers. *Cancer Res.* 2002; 62(23): p. 6808-11.
685. Sundberg C, Nagy JA, Brown LF, Feng D, Eckelhoefer IA, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery. *Am J Pathol.* 2001; 158(3): p. 1145-60.
686. Zhang HT, Scott PA, Morbidelli L, Peak S, Moore J, Turley H, Harris AL, Ziche M, Bicknell R. The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. *Br J Cancer.* 2000; 83(1): p. 63-8.
687. Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol.* 2007; 170(1): p. 1-15.
688. Sood AK, Seftor EA, Fletcher MS, Gardner LM, Heidger PM, Buller RE, Seftor RE, Hendrix MJ. Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol.* 2001; 158(4): p. 1279-88.
689. Warren B. The vascular morphology of tumors. In Peterson H e. *Tumor Blood Circulation.* Boca Raton, FL: CRC Press; 1979. p. 1-47.
690. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;

- 97(26): p. 14608-13.
691. Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol.* 2000; 156(2): p. 361-8.
692. McDonald DM, Munn L, Jain RK. Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant? *Am J Pathol.* 2000; 156(2): p. 383-8.
693. Miller FR, Miller BE, Heppner GH. Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion Metastasis.* 1983; 3(1): p. 22-31.
694. Miller FR. Tumor subpopulation interactions in metastasis. *Invasion Metastasis.* 1983; 3(4): p. 234-42.
695. Yoneda T, Michigami T, Yi B, Williams PJ, Niewolna M, Hiraga T. Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. *Cancer.* 2000; 88(12 Suppl): p. 2979-88.
696. Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 1992; 52(6): p. 1399-405.
697. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. *Cancer Res.* 1998; 58(7): p. 1486-93.
698. Eckhardt BL, Parker BS, van Laar RK, Restall CM, Natoli AL, Tavarria MD, Stanley KL, Sloan EK, Moseley JM, Anderson RL. Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix. *Mol Cancer Res.* 2005; 3(1): p. 1-13.
699. Tao K, Li J, Warner J, MacLeod K, Miller FR, Sahagian GG. Multiple lysosomal trafficking phenotypes in metastatic mouse mammary tumor cell lines. *Int J Oncol.* 2001; 19(6): p. 1333-9.
700. Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer.* 2008; 8: p. 228.
701. Lelekakis M, Moseley JM, Martin TJ, Hards D, Williams E, Ho P, Lowen D, Javni J, Miller FR, Slavin J, Anderson RL. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis.* 1999; 17(2): p. 163-70.
702. Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Jolin HE, McKenzie AN. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med.* 2000; 191(6): p. 1069-76.
703. Alberts B, Johnson A, Lewis J. Chapter 8: Manipulating proteins, DNA and RNA. In Alberts B,

- Johnson A, Lewis J. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed.: Science Taylor & Francis Group; 2007. p. 501-78.
704. Alberts B, Johnson A, Lewis J. Chapter 5: DNA replication, repair and recombination. In Alberts B, Johnson A, Lewis J. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed.: Science Taylor & Francis Group; 2007. p. 263-328.
705. Smith CM. Technical Knockout: Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function. *The Scientist*. 2000; 14: p. 32.
706. Rutherford A. The life history of the mouse in genetics. *Nature*. 2002; 420: p. 510.
707. Carlsson G, Ekelund L, Stigsson L, Hafström L. Vascularization and tumour volume estimations of solitary liver tumours in rats. *Ann Chir Gynaecol*. 1983; 72(4): p. 187-91.
708. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Juranic VL, McKenzie AN, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol*. 2011; 41(7): p. 1902-12.
709. Rakha EA, Pinder SE, Bartlett JM, Ibrahim M, Starczynski J, Carder PJ, Provenzano E, Hanby A, Hales S, Lee AH, Ellis IO; National Coordinating Committee for Breast Pathology. Updated UK Recommendations for HER2 assessment in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2015; 68(2): p. 93-9.
710. Rydén L, Jirstrom K, Haglund M, Stål O, Fernö M. Epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor 2 are specific biomarkers in triple-negative breast cancer. Results from a controlled randomized trial with long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 120(2): p. 491-8.
711. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991; 324(1): p. 1-8.
712. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer*. 1999; 79(5-6): p. 991-5.
713. Voron T, Marcheteau E, Pernot S, Colussi O, Tartour E, Taieb J, Terme M. Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Front Oncol*. 2014; 2(4): p. 70.
714. Gkogkou C, Frangia K, Saif MW, Trigidou R, Syrigos K. Necrosis and apoptotic index as prognostic factors in non-small cell lung carcinoma: a review. *Springerplus*. 2014; 3: p. 120.
715. Richards CH, Mohammed Z, Qayyum T, Horgan PG, McMillan DC. The prognostic value of histological tumor necrosis in solid organ malignant disease: a systematic review. *Future Oncol*. 2011; 7(10): p. 1223-35.

716. Maiorano E, Regan MM, Viale G, Mastropasqua MG, Colleoni M, Castiglione-Gertsch M, Price KN, Gelber RD, Goldhirsch A, Coates AS. Prognostic and predictive impact of central necrosis and fibrosis in early breast cancer: results from two International Breast Cancer Study Group randomized trials of chemoendocrine adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 121(1): p. 211-8.
717. Hasebe T, Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Tsubono Y, Yamamoto H, Mukai K. Fibrotic focus in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a significant histopathological prognostic parameter for predicting the long-term survival of the patients. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 49(3): p. 195-208.
718. Hasebe T, Tsuda H, Tsubono Y, Imoto S, Mukai K. Fibrotic focus in invasive ductal carcinoma of the breast: a histopathological prognostic parameter for tumor recurrence and tumor death within three years after the initial operation. *Jpn J Cancer Res.* 1997; 88(6): p. 590-9.
719. Hasebe T, Mukai K, Tsuda H, Ochiai A. New prognostic histological parameter of invasive ductal carcinoma of the breast: clinicopathological significance of fibrotic focus. *Pathol Int.* 2000 ; 50(4): p. 263-72.
720. Tsuda H, Takarabe T, Hasegawa F, Fukutomi T, Hirohashi S. Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases. *Am J Surg Pathol.* 2000; 24(2): p. 197-202.
721. Jimenez RE, Wallis T, Visscher DW. Centrally necrotizing carcinomas of the breast: a distinct histologic subtype with aggressive clinical behavior. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25(3): p. 331-7.
722. Colpaert C, Vermeulen P, Jeuris W, van Beest P, Goovaerts G, Weyler J, Van Dam P, Dirix L, Van Marck E. Early distant relapse in "node-negative" breast cancer patients is not predicted by occult axillary lymph node metastases, but by the features of the primary tumour. *J Pathol.* 2001; 193(4): p. 442-9.
723. Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Ochiai A. Highly proliferative fibroblasts forming fibrotic focus govern metastasis of invasive ductal carcinoma of the breast. *Mod Pathol.* 2001; 14(4): p. 325-37.
724. Colpaert CG, Vermeulen PB, Fox SB, Harris AL, Dirix LY, Van Marck EA. The presence of a fibrotic focus in invasive breast carcinoma correlates with the expression of carbonic anhydrase IX and is a marker of hypoxia and poor prognosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 81(2): p. 137-47.
725. Van den Eynden GG, Smid M, Van Laere SJ, Colpaert CG, Van der Auwera I, Bich TX, van Dam P, den Bakker MA, Dirix LY, Van Marck EA, Vermeulen PB, Foekens JA. Gene expression profiles associated with the presence of a fibrotic focus and the growth pattern in lymph node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(10): p. 2944-52.
726. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, Sofronis A, Gillett CE, Lakhani SR, Hanby A. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology.* 2006; 49(1): p. 22-34.



727. Colpaert C, Vermeulen P, van Beest P, Goovaerts G, Weyler J, Van Dam P, Dirix L, Van Marck E. Intratumoral hypoxia resulting in the presence of a fibrotic focus is an independent predictor of early distant relapse in lymph node-negative breast cancer patients. *Histopathology*. 2001; 39(4): p. 416-25.
728. Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy*. 2007; 3(1): p. 28-31.
729. Olofsson MH, Ueno T, Pan Y, Xu R, Cai F, van der Kuip H, Muerdter TE, Sonnenberg M, Aulitzky WE, Schwarz S, Andersson E, Shoshan MC, Havelka AM, Toi M, Linder S. Cytokeratin-18 is a useful serum biomarker for early determination of response of breast carcinomas to chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(11): p. 3198-206.
730. de Bruin EC, Medema JP. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev*. 2008; 34(8): p. 737-49.
731. Frey B, Rubner Y, Kulzer L, Werthmüller N, Weiss EM, Fietkau R, Gaipl US. Antitumor immune responses induced by ionizing irradiation and further immune stimulation. *Cancer Immunol Immunother*. 2014; 63(1): p. 29-36.
732. Panaretakis T, Pokrovskaja K, Shoshan MC, Grandér D. Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. *J Biol Chem*. 2002; 277(46): p. 44317-26.
733. Dartsch DC, Schaefer A, Boldt S, Kolch W, Marquardt H. Comparison of anthracycline-induced death of human leukemia cells: programmed cell death versus necrosis. *Apoptosis*. 2002; 7(6): p. 537-48.
734. Pu RT, Schott AF, Sturtz DE, Griffith KA, Kleer CG. Pathologic features of breast cancer associated with complete response to neoadjuvant chemotherapy: importance of tumor necrosis. *Am J Surg Pathol*. 2005; 29(3): p. 354-8.
735. Bertheau P, Plassa F, Espié M, Turpin E, de Roquancourt A, Marty M, Lerebours F, Beuzard Y, Janin A, de Thé H. Effect of mutated TP53 on response of advanced breast cancers to high-dose chemotherapy. *Lancet*. 2002; 360(9336): p. 852-4.
736. Prewett M, Huber J, Li Y, Santiago A, O'Connor W, King K, Overholser J, Hooper A, Pytowski B, Witte L, Bohlen P, Hicklin DJ. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res*. 1999; 59(20): p. 5209-18.
737. Benjamin LE, Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(16): p. 8761-6.

738. Kodack DP, Chung E, Yamashita H, Incio J, Duyverman AM, Song Y, Farrar CT, Huang Y, Ager E, Kamoun W, Goel S, Snuderl M, Lussiez A, Hiddingh L, Mahmood S, Tannous BA, Eichler AF, Fukumura D, Engelman JA, Jain RK. Combined targeting of HER2 and VEGFR2 for effective treatment of HER2-amplified breast cancer brain metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(45): p. 3119-27.
739. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med*. 2000; 191(3): p. 423-34.
740. Barker RN, Erwig L, Pearce WP, Devine A, Rees AJ. Differential effects of necrotic or apoptotic cell uptake on antigen presentation by macrophages. *Pathobiology*. 1999; 67(5-6): p. 302-5.
741. Schmitt E, Parcellier A, Ghiringhelli F, Casares N, Gurbuxani S, Droin N, Hamai A, Pequignot M, Hammann A, Moutet M, Fromentin A, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Increased immunogenicity of colon cancer cells by selective depletion of cytochrome C. *Cancer Res*. 2004; 64(8): p. 2705-11.
742. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002; 418(6894): p. 191-5.
743. Todryk SM, Melcher AA, Dalgleish AG, Vile RG. Heat shock proteins refine the danger theory. *Immunology*. 2000; 99(3): p. 334-7.
744. Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(3): p. 185-94.
745. Pollheimer J, Bodin J, Sundnes O, Edelmann RJ, Skånland SS, Sponheim J, Brox MJ, Sundlisaeter E, Loos T, Vatn M, Kasprzycka M, Wang J, Kuchler AM, Taskén K, Haraldsen G, Hol J. Interleukin-33 drives a proinflammatory endothelial activation that selectively targets nonquiescent cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33(2): p. 47-55.
746. Blood CH, Zetter BR. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 1990; 1032(1): p. 89-118.
747. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med*. 1997; 3(2): p. 177-82.
748. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello CA, Apte RN. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(5): p. 2645-50.
749. Ågerstam H, Karlsson C, Hansen N, Sandén C, Askmyr M, von Palffy S, Högberg C, Rissler M, Wunderlich M, Juliusson G, Richter J, Sjöström K, Bhatia R, Mulloy JC, Järås M, Fioretos T. Antibodies targeting human IL1RAP (IL1R3) show therapeutic effects in xenograft models of acute

- myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(34): p. 10786-91.
750. Carmi Y, Dotan S, Rider P, Kaplanov I, White MR, Baron R, Abutbul S, Huszar M, Dinarello CA, Apte RN, Voronov E. The role of IL-1 $\beta$  in the early tumor cell-induced angiogenic response. *J Immunol*. 2013; 190(7): p. 3500-9.
751. Carmi Y, Voronov E, Dotan S, Lahat N, Rahat MA, Fogel M, Huszar M, White MR, Dinarello CA, Apte RN. The role of macrophage-derived IL-1 in induction and maintenance of angiogenesis. *J Immunol*. 2009; 183(7): p. 4705-14.
752. Bar D, Apte RN, Voronov E, Dinarello CA, Cohen S. A continuous delivery system of IL-1 receptor antagonist reduces angiogenesis and inhibits tumor development. *FASEB J*. 2004; 18(1): p. 161-3.
753. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS. HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*. 2003; 112(5): p. 645-57.
754. Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol*. 2008; 180(4): p. 2011-7.
755. Lewis CE, De Palma M, Naldini L. Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2. *Cancer Res*. 2007; 67(18): p. 8429-32.
756. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(8): p. 618-31.
757. Bosco MC, Puppo M, Blengio F, Fraone T, Cappello P, Giovarelli M, Varesio L. Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology*. 2008; 213(9-10): p. 733-49.
758. Arnold T, Betsholtz C. The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vasc Cell*. 2013; 5(1): p. 4.
759. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27: p. 451-83.
760. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454(7203): p. 428-35.
761. Dirx AE, Oude Egbrink MG, Wagstaff J, Griffioen AW. Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2006; 80(6): p. 1183-96.
762. Johansson M, Denardo DG, Coussens LM. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunol Rev*. 2008; 222: p. 145-54.
763. Lavi G, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN, Cohen S. Sustained delivery of IL-1 Ra from

- biodegradable microspheres reduces the number of murine B16 melanoma lung metastases. *J Control Release*. 2007; 123(2): p. 123-30.
764. Saijo Y, Tanaka M, Miki M, Usui K, Suzuki T, Maemondo M, Hong X, Tazawa R, Kikuchi T, Matsushima K, Nukiwa T. Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction. *J Immunol*. 2002; 169(1): p. 469-75.
765. Kato T, Kameoka S, Kimura T, Tanaka S, Nishikawa T, Kobayashi M. p53, mitosis, apoptosis and necrosis as prognostic indicators of long-term survival in breast cancer. *Anticancer Res*. 2002; 22(2B): p. 1105-12.
766. Putti TC, El-Rehim DM, Rakha EA, Paish CE, Lee AH, Pinder SE, Ellis IO. Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. *Mod Pathol*. 2005; 18(1): p. 26-35.
767. Purdie CA, Quinlan P, Jordan LB, Ashfield A, Ogston S, Dewar JA, Thompson AM. Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. *Br J Cancer*. 2014; 110(3): p. 565-72.
768. Le H, Kim W, Kim J, Cho HR, Kwon B. Interleukin-33: a mediator of inflammation targeting hematopoietic stem and progenitor cells and their progenies. *Front Immunol*. 2013; 4: p. 104.
769. Willart MA, Deswarte K, Pouliot P, Braun H, Beyaert R, Lambrecht BN, Hammad H. Interleukin-1 $\alpha$  controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *J Exp Med*. 2012; 209(8): p. 1505-17.
770. Kouzaki H, Iijima K, Kobayashi T, O'Grady SM, Kita H. The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. *J Immunol*. 2011; 186(7): p. 4375-87.
771. Kang Z, Swaidani S, Yin W, Wang C, Barlow JL, Gulen MF, Bulek K, Do JS, Aronica M, McKenzie AN, Min B, Li X. Epithelial cell-specific Act1 adaptor mediates interleukin-25-dependent helminth expulsion through expansion of Lin(-)c-Kit(+) innate cell population. *Immunity*. 2012; 36(5): p. 821-33.
772. Swamy M, Jamora C, Havran W, Hayday A. Epithelial decision makers: in search of the 'epimmunome'. *Nat Immunol*. 2010; 11(8): p. 656-65.
773. Kim HJ, Lee JS, Kim JD, Cha HJ, Kim A, Lee SK, Lee SC, Kwon BS, Mittler RS, Cho HR, Kwon B. Reverse signaling through the costimulatory ligand CD137L in epithelial cells is essential for natural killer cell-mediated acute tissue inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(1): p. 13-22.

774. Fujita J, Kawaguchi M, Kokubu F, Ohara G, Ota K, Huang SK, Morishima Y, Ishii Y, Satoh H, Sakamoto T, Hizawa N. Interleukin-33 induces interleukin-17F in bronchial epithelial cells. *Allergy*. 2012; 67(6): p. 744-50.
775. Hepworth MR, Daniłowicz-Luebert E, Rausch S, Metz M, Klotz C, Maurer M, Hartmann S. Mast cells orchestrate type 2 immunity to helminths through regulation of tissue-derived cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(17): p. 6644-9.
776. Arshad MI, Rauch M, L'helgoualc'h A, Julia V, Leite-de-Moraes MC, Lucas-Clerc C, Piquet-Pellorce C, Samson M. NKT cells are required to induce high IL-33 expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. *Eur J Immunol*. 2011; 41(8): p. 2341-8.
777. Arshad MI, Piquet-Pellorce C, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Patrat-Delon S, Ezan F, Lucas-Clerc C, Nabti S, Lehuen A, Cubero FJ, Girard JP, Trautwein C, Samson M. TRAIL but not FasL and TNF $\alpha$ , regulates IL-33 expression in murine hepatocytes during acute hepatitis. *Hepatology*. 2012; 56(6): p. 2353-62.
778. Sakai N, Van Sweringen HL, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, Tevar AD, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-33 is hepatoprotective during liver ischemia/reperfusion in mice. *Hepatology*. 2012; 56(4): p. 1468-78.
779. Sahin AA, Ro J, Ro JY, Blick MB, el-Naggar AK, Ordonez NG, Fritsche HA, Smith TL, Hortobagyi GN, Ayala AG. Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. *Cancer*. 1991; 68(3): p. 549-57.
780. Villarreal DO, Weiner DB. Interleukin 33: a switch-hitting cytokine. *Curr Opin Immunol*. 2014; 28: p. 102-6.

## ПРИЛОГ

### 8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:  
РБ

Идентификациони број:  
ИБР

Тип документације:  
ТД

Монографска публикација

Тип записа:  
ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада:  
ВР

Докторска дисертација

Аутор:  
АУ

Милош З. Милосављевић

Ментор/коментор:  
МН

Проф.др Иван Јовановић

Наслов рада:  
НР

Утицај сигналног пута IL-33/ST2 на развој некрозе код карцинома дојке

Језик публикације:  
ЈП

Српски (ћирилица)

|   |  |
|---|--|
| <b>Језик извода:</b><br><b>ЈИ</b>                     | Српски/енглески  |
| <b>Земља публикавања:</b><br><b>ЗП</b>                | Србија   |
| <b>Уже географско подручје:</b><br><b>УГП</b>         | Србија   |
| <b>Година:</b><br><b>ГО</b>                           | 2017   |
| <b>Издавач:</b><br><b>ИЗ</b>                          | Ауторски репринт   |
| <b>Место и адреса:</b><br><b>МС</b>                   | 34000 Крагујевац, Србија Светозара<br>Марковића 69   |
| <b>Физички опис рада:</b><br><b>ФО</b>                | Дисертација има 273 стране, садржи 7<br>поглавља, 12 слика, 25 графикона, 20 табела<br>и 780 референци           |
| <b>Научна област:</b>                                 | Медицина   |
| <b>Научна дисциплина:</b><br><b>ДИ</b>                | Онкологија   |
| <b>Предметна одредница/ кључне речи:</b><br><b>ПО</b> | IL-33, IL-33R, карцином дојке,<br>неоангиогенеза, некроза  |
| <b>УДК</b>  |  |
| <b>Чува се:</b><br><b>ЧУ</b>                          | У библиотеци Факултета медицинских<br>наука у Крагујевцу,<br>34000 Крагујевац, Србија, Светозара<br>Марковића 69 |
| <b>Важна напомена:</b><br><b>МН</b>                   |  |
| <b>Извод:</b><br><b>ИД</b>                            |  |

## Апстракт АП

Интерлеукин-33 (IL-33)/IL-33 рецептор (IL-33R, IL-RL1, ST2) сигнални пут промовише раст тумора и развој метастаза инхибицијом антитуморског имунског одговора. IL-33 је протеин са анти- и проинфламаторном улогом који функционише као транскрипциони фактор и класичан цитокин са улогом алармина. Некротичне ћелије секретују имунорегулаторне цитокина укључујући IL-33 који је члан IL-1 фамилије цитокина. Претходне студије сугеришу да IL-33 промовише експресију и ослобађање васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF) у мастоцитима и указују на његову проангиогену улогу активацијом ендотелних ћелија преко IL-33R. Међутим, значај активације IL-33/IL-33R сигналног пута у ангиогенези и туморској некрози није у потпуности јасна.

Циљ наше студије је био да се испита улога сигналног пута IL-33/IL-33R у туморској некрози и ангиогенези карцинома дојке.

Делеција гена за IL-33R у BALB/c мишева појачава туморску некрозу у испорава раст тумора у експерименталном моделу 4T1 карцинома дојке што је повезано са смањеном експресијом васкуларног ендотелног фактора раста и IL-33 у ћелијама тумора дојке. Експресија IL-33 у ћелијама карцинома дојке расте током времена у IL-33R<sup>+/+</sup> али не и у IL-33R<sup>-/-</sup>. Резултат указује на механизам позитивне повратне спреге IL-33/IL-33R осовине. Анализирали смо експресије IL-33, IL-33R, и VEGF-a, као и микроваскуларну густину (MVD) у туморима 40 пацијенкиња са карциномом дојке са присутном или одсутном некрозом у ткиву тумора. Детектовали смо значајно већу експресију IL-33, IL-33R и VEGF-a у ткиву карцинома дојке без детектабилне некрозе. Експресије IL-33 и IL-33R корелирају са експресијом VEGF-a у туморским ћелијама. Такође, експресија VEGF је била у позитивној корелацији са MVD у перинекротичном рубу тумора.

IL-33 попут IL-1 $\beta$  показује проангиогену улогу и контролише продукцију VEGF-a. IL-1 $\beta$  појачава експресију VEGF-a и његових рецептора на ендотелним ћелијама а заједно са VEGF-ом промовише туморску ангиогенезу. Као и IL-1, IL-33 активира IL-1R3 (IL-1RAcP) указујућ да инхибиција овог протеин применом анти-IL-1R3 антитела инхибира ангиогенезу тумора и појачава туморску некрозу у ткиву царцинома дојке услед губитка васкуларне подпоре. На основу ових резултата сматрамо да IL-33 ослобођен из некротичних ћелија фацитира експресију VEGF-a у околним туморским ћелијама промовишући ангиогенезу што је потврђено већом MVD у перинекротичној зони хуманог царцинома дојке. Наши резултати указују да IL-33/IL-33R сигнални пут игра важну улогу у расту тумора појачавањем експресије проангиогеног VEGF-a и инхибицијом туморске некрозе. У додатку на ранија истраживања, наши резултати указују на супротну улогу интрацелуларног и секретованог IL-33. Наша студија показује додатни механизам којим IL-33/IL-33R осовина учествује у карциногенези и даје рационално објашњење за потенцијалну блокаду IL-33 као терапијског модалитета у лечењу хуманог карцинома дојке.



**Датум прихватања теме од стране ННВ  
ДП**

**Датум одбране:  
ДО**

**Чланови комисије:  
КО**

**Председник:** **Проф. др Миодраг Лукић**, професор емеритус за ужу научну област Микробиологија и имунологија, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

**Ментор:** **Проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

**Члан:** **Проф. др Славица Кнежевић Ушај**, редовни професор за ужу научну област Патолошка анатомија, Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду

**Члан:** **Проф. др Гордана Радосављевић**, ванредни професор за ужу научну област Микробиологија и имунологија, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

## 8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC

FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC

**Accession number:**

ANO

**Identification number:**

INO

**Documentation type:**

DT

Monographic publication

**Type of record:**

TR

Textual printed material

**Contents code:**

CC

PhD thesis

**Author:**

AU

Miloš Z. Milosavljević

**Menthor/co-mentor:**

MN

Prof.dr Ivan Jovanović

**Title:**

TI

The role of IL-33/ST2 signaling pathway in development of breast carcinoma necrosis

**Language of text:**

LT

Serbian (Cyrilic)

**Language of abstract:**

Serbian/English

**Country of publication:**  
**CP** Serbia

**Locality of publication:**  
**LP** Serbia

**Publication year:**  
**PY** 2017

**Publisher:**  
**PU** Author reprint

**Publication place:**  
**PP** 34000 Kragujevac, Serbia Svetožara  
Markovića 69

**Physical description:**  
**PD** Thesis contains 273 pages, 7 chapters, 12  
pictures, 25 graphs, 20 tables and 780 citations

**Scientific field:**  
**SF** Medicine

**Scientific discipline:**  
**SD** Oncology

**Subject/key words:**  
**SKW** IL-33, IL-33R, breast neoplasm,  
neoangiogenesis, necrosis

**UDC**

**Holding data:** Library of Faculty of Medical Sciences  
Kragujevac, Serbia  
34000 Kragujevac, Serbia  
Svetožara Markovića 69

**Note:**  
**N**

**Abstract:**  
**AB**

Interleukin-33 (IL-33)/IL-33 receptor (IL-33R, IL-RL1, ST2) signaling pathway promotes mammary cancer growth and metastasis by inhibiting anti-tumor immunity. IL-33 is dual function protein with roles as a nuclear factor and a classical cytokine and functions as a prototypic „alarmin”. Necrotic cells release immunoregulatory cytokines, including IL-33, a member of the IL-1 family of cytokines. Previous studies suggest that IL-33 directly facilitated vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and secretion in primed mast and showed proangiogenic role of IL-33 by inducing endothelial proangiogenic activity via IL-33R expressed on endothelial cells. However, the role of IL-33/IL-33R axis in neoangiogenesis and tumor necrosis is not elucidated.

Therefore, the aim of this study was to investigate the role of IL-33/IL-33R axis in mammary tumor necrosis and angiogenesis.

Deletion of IL-33R gene in BALB/c mice enhanced tumor necrosis and attenuated tumor growth in 4T1 breast cancer model, which was associated with markedly decreased expression of VEGF and IL-33 in mammary tumor cells. IL-33 expression in mammary tumor cells significantly increased over time in IL-33R<sup>+/+</sup> mice, but not in IL-33R<sup>-/-</sup> mice the findings that reflect positive feedback mechanism in IL-33/IL-33R axis We next analyzed IL-33, IL-33R and VEGF expression and microvascular density (MVD) in breast tumors from 40 female patients with absent or present tumor necrosis. We found significantly higher expression of IL-33, IL-33R and VEGF in breast cancer tissues with absent tumor necrosis. Both, IL-33 and IL-33R expression correlated with VEGF expression in tumor cells. Further, VEGF expression positively correlated with MVD in perinecrotic zone.

IL-33 is very much like IL-1 in that both IL-1 $\beta$  and IL-33 are proangiogenic and control the production of VEGF. IL-1 $\beta$  increases expression of VEGF and its receptors on endothelial cells and acts together with VEGF in promoting tumor mediated angiogenesis. Thus, the neutralization of IL-1 $\beta$  reduced tumor growth and the tumor-induced angiogenesis. As IL-1 and IL-33 both use IL-1R3 (IL-1RAcP), it may be speculated that anti-IL-1R3 antibodies may reduce angiogenesis and increase tumor necrosis in breast cancer due to loss of vascular supply. On the basis of these observations we suggest that IL-33 released by necrotic cells may facilitate VEGF expression on nearby tumor cells, which could lead to enhanced angiogenesis as demonstrated by high-grade MVD in perinecrotic zone in human breast cancer tissue. Taking together, our data indicate that IL-33/IL-33R pathway is critically involved in mammary tumor growth by facilitating expression of pro-angiogenic VEGF in tumor cells and attenuating tumor necrosis. Additionally, results indicate opposite functions of intracellular and secreted IL-33. Thus, this study revealed an additional mechanism by which IL-33/IL-33R pathway may be involved in tumorigenesis and provide rationale for blocking IL-33 as a therapeutic modality in human breast carcinoma.

**Accepted by the Scientific Board on:**  
**ASB**

**Defended on:**  
**DE**

**Thesis defended board**  
**(Degree/name/surname/title/faculty)**  
**DB**

**President:** **Prof. dr Miodrag Lukić**, Professor Emeritus of Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

**Menthor:** **Prof. dr Ivan Jovanović**, Associate professor of Microbiology and Immunology, Basic of Oncology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

**Member:** **Prof. dr Slavica Knežević Ušaj**, Professor of Pathology, Faculty of Medicine, University of Novi Sad

**Member:** **Prof. dr Gordana Radosavljević**, Associate professor of Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

### 8.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Милош (Зоран) Милосављевић је рођен у Крагујевцу 14.04.1977. године. Основну школу и Прву крагујевачку гимназију завршио је у Крагујевцу. Дипломирао је 2005. године на Медицинском факултету, Универзитета у Крагујевцу чиме је стекао звање доктора медицине. Академске докторске студије на Медицинском факултету у Крагујевцу уписао је школске 2005/2006. године, изборно подручје Клиничка и експериментална хирургија а усмени докторски испит је положио у мају 2008. године са оценом 8 (осам).

У периоду од маја 2007. до октобра 2010. године ангажован је као инструктор практичне наставе на предметима Патолошка анатомија и Статистика у фармацији, Медицинског факултета у Крагујевцу. Од децембра 2009. године запослен је у Служби за патолошку-анатомску дијагностику, Клиничког центра у Крагујевцу. Специјалистичке студије из области Патолошке анатомије започео је 2012. године на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Милош (Зоран) Милосављевић се активно бави научно-истраживачким радом у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Поред тога, учесник је на бројним пројектима које финансира Факултет медицинских наука у Крагујевцу, Универзитета у Крагујевцу. Аутор је више радова објављених у часописима међународног и националног значаја, као и већег броја сажетака објављених на међународним и домаћим научним скуповима.

Члан је Српског лекарског друштва, Удружења патолога и цитолога Србије и Европског удружења патолога.

Говори енглески, служи се немачким језиком и познаје рад на рачунару.

Милош (Зоран) Милосављевић је остварио 17 бодова по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета:

- четири рада у целини публикована у научним часописима међународног значаја

## 8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

Научни радови објављени у целини у часописима међународног значаја:

1. **Milosavljevic M**, Jovanovic I, Pejnovic N, Mitrovic S, Arsenijevic N, Simovic Markovic B and Lukic ML. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(14): 18106-18115. **M21=8 points**
2. Krstic V, **Milosavljevic M**, Mitrovic S, Azanjac G, Knezevic M, Konstantinovic V, Nedovic J. Synovial sarcoma of carotid space. *Cent Eur J Med* 2012; 7(4): 497-502. **M23=3 points**
3. Protrka Z, Arsenijevic S, Dimitrijevic A, Mitrovic S, Stankovic V, **Milosavljevic M**, Kastratovic T, Djuric J. Co-overexpression of bcl-2 and c-myc in uterine cervix carcinomas and premalignant lesions. *Eur J Histochem* 2011; 55(1): e8. **M23=3 points**
4. **Milosavljevic M**, Mitrovic S, Vujadinovic M, Acimovic Lj, Mrvic S, Milisavljevic S. Giant dumbbell tumor of the posterior mediastinum. *Vojnosanit Pregl* 2009; 66(11): 909-913. **M23=3 points**

## 8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS

The published papers in extenso in international journals:

1. **Milosavljevic M**, Jovanovic I, Pejnovic N, Mitrovic S, Arsenijevic N, Simovic Markovic B and Lukic ML. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(14): 18106-18115. **M21=8 бодова**
2. Krstic V, **Milosavljevic M**, Mitrovic S, Azanjac G, Knezevic M, Konstantinovic V, Nedovic J. Synovial sarcoma of carotid space. *Cent Eur J Med* 2012; 7(4): 497-502. **M23=3 бода**
3. Protrka Z, Arsenijevic S, Dimitrijevic A, Mitrovic S, Stankovic V, **Milosavljevic M**, Kastratovic T, Djuric J. Co-overexpression of bcl-2 and c-myc in uterine cervix carcinomas and premalignant lesions. *Eur J Histochem* 2011; 55(1): e8. **M23=3 бода**
4. **Milosavljevic M**, Mitrovic S, Vujadinovic M, Acimovic Lj, Mrvic S, Milisavljevic S. Giant dumbbell tumor of the posterior mediastinum. *Vojnosanit Pregl* 2009; 66(11): 909-913. **M23=3 бода**



## 8.6. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

|   |
|---|
| <b><i>I. Аутор</i></b>  |
| Име и презиме: МИЛОШ З. МИЛОСАВЉЕВИЋ  |
| Датум и место рођења: 14.04.1977.г., КРАГУЈЕВАЦ   |
| Садашње запослење: Лекар на специјализацији из патологије, Клинички центар Крагујевац   |
| <b><i>II. Докторска дисертација</i></b>   |
| Наслов: УТИЦАЈ СИГНАЛНОГ ПУТА IL-33/ST2 НА РАЗВОЈ НЕКРОЗЕ КОД КАРЦИНОМА ДОЈКЕ   |
| Број страница: 273  |
| Број слика: 12  |
| Број библиографских података: 780   |
| Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу   |
| Научна област (УДК): МЕДИЦИНА   |
| Ментор: ПРОФ. ДР ИВАН ЈОВАНОВИЋ   |
| <b><i>III. Оцена и одбрана</i></b>  |
| Датум пријаве теме: 13. 11. 2015.   |
| Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:   |
| Комисија за оцену подобности теме и кандидата:<br><ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник</li><li>2. Проф. др Славица Кнежевић Ушај, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Патолошка анатомија, члан</li><li>3. Доц. др Гордана Радосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан</li></ol> |
| Комисија за оцену докторске дисертације:<br><ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник</li><li>2. Проф. др Славица Кнежевић Ушај, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Патолошка анатомија, члан</li><li>3. Доц. др Гордана Радосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан</li></ol>       |
| Комисија за одбрану докторске дисертације:<br><ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник</li><li>2. Проф. др Славица Кнежевић Ушај, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Патолошка анатомија, члан</li><li>3. Доц. др Гордана Радосављевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан</li></ol>     |
| Датум одбране дисертације: 31.01.2017.  |