

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU**

Milan A. Markićević

**ZNAČAJ EKSPRESIJE, REGULISANE ESTROGENOM,
PROTEINA PS2 I KATEPSINA D U PRIMARNOM
OPERABILNOM KARCINOMU DOJKE**

- Doktorska disertacija -

Beograd, 2011.

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
"СВЕТОСЛАВ" БЕОГРАД
И. Бр. 167401



ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem **dr Dragici Nikolić-Vukosavljević, N. Sav.** na svesrdnoj stručnoj i ličnoj pomoći, kako pri izboru teme tako i u svim fazama izrade ovog rada.

Mentoru **prof. dr Goranu Bačiću** se zahvaljujem na strpljenju prilikom pregledanja ovog rada i sugestijama vezanim za ovu tezu.

Zahvaljujem se **doc. dr Milošu Mojoviću** na sugestijama prilikom pregledanja ovog rada.

Zahvaljujem se **Dr Zori Nešković-Konstantinović** na doprinosu vezanom za praćenje toka bolesti ispitivanih pacijenata kao i na sugestijama prilikom pregledanja ovog rada.

Zahvaljujem se **Dr Kseniji Kanjer** na reviziji histopatoloških nalaza ispitivanih pacijenata.

Zahvalnost dugujem i saradnicima i laboratorijskim tehničarima Laboratorije za receptore i biologiju malignih tumora koji su doprineli realizaciji ove teze.

Na kraju, zahvaljujem se i članovima moje porodice na razumevanju i podršci tokom izrade ove teze.

Ova doktorska disertacija je u celosti urađena u Laboratoriji za receptore i biologiju malignih tumora Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu, u okviru projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Srbije pod nazivom: "Molekularni biomarkeri rasta, invazivnosti i metastatičnosti karcinoma dojke: biološki i klinički aspekti".

Značaj ekspresije, regulisane estrogenom, proteina pS2 i katepsina D u primarnom operabilnom karcinomu dojke

Apstrakt

Karcinom dojke je najzastupljenije maligno oboljenje i jedan od vodećih uzroka smrtnosti od malignih oboljenja među ženama u industrijski-razvijenim zemljama, u najvećoj meri zbog sklonosti primarnih karcinoma dojke da metastaziraju do limfnih čvorova u pazušnoj jami i udaljenih mesta u organizmu. Tok bolesti ranog karcinoma dojke u prve 3 godine praćenja toka bolesti se karakteriše pojavom maksimalnog broja udaljenih metastaza koji je nezavisan od primenjene terapije (hirurška, hirurška i hemio-, hirurška i hormonska terapija). Identifikacija karakteristika tumora/domaćina tumora (biološka ili klinička) koje bi preciznije ukazale na pacijente sa niskim/visokim rizikom za pojavu metastatske bolesti predstavlja važan predmet istraživanja. Kao potencijalni faktori prognoze/predikcije toka bolesti su predloženi brojni molekularni biomarkeri ili zato što su direktna meta terapije ili zato što njihova ekspresija predstavlja sekundarni fenomen u mehanizmu delovanja terapije. Studije su pokazale da je visoka koncentracija katepsina D nezavisan pokazatelj loše prognoze za pacijentkinje obolele od karcinoma dojke, kao i da je visoka koncentracija pS2 u karcinomu dojke povezana sa povoljnijim tokom bolesti i da predstavlja koristan faktor za predviđanje odgovora pacijentkinja na delovanje adjuvantne hormonske terapije. U ovom istraživanju su ispitivani estrogenom-indukovani molekularni biomarkeri, pS2 i katepsin D, sa ciljem određivanja granične vrednosti za definisanje povišenih vs. bazičnih koncentracija, odnosno za definisanje „statusa“ biomarkera u karcinomu dojke. Cilj istraživanja je bio i da se identifikuju grupe pacijentkinja sa niskim/visokim rizikom za relaps, u zavisnosti od statusa pS2, odnosno katepsina D koji bi bili definisani na osnovu prethodno određenih graničnih vrednosti za njihove ekspresije u karcinomu dojke. Analiza povezanosti klasičnih i biohemijskih faktora prognoze/predikcije toka bolesti sa koncentracijama pS2 i katepsina D je omogućila definisanje graničnih vrednosti, za ekspresiju pS2 (15 ng/mg) i za ekspresiju katepsina D (39 pmol/mg) u karcinomu dojke, koje imaju ne samo statistički, već i biološki značaj, u smislu definisanja estrogen-zavisne vs. estrogen-nezavisne ekspresije. Pregled literature pokazuje da granične vrednosti za ekspresije pS2 i katepsina D, do sada, nisu određivane na način predstavljen u ovom istraživanju. Analiza toka bolesti pacijentkinja na osnovu statusa katepsina D, u periodu od 3 godine nakon hirurške terapije, je ukazala na biološki značaj proteina u karcinomu dojke, tj. na ulogu proteina u procesima proliferacije i apoptoze, i omogućila da se odredi njegov klinički značaj, tj. da se definišu visoko-rizične grupe (pN+ pT2 CD-, pN+ III CD-, I CD+), kao i nisko-rizična grupa pacijentkinja (I CD-), bez obzira na primenjenu terapiju. Analiza toka bolesti pacijentkinja na osnovu statusa pS2, u periodu od 3 godine nakon hirurške terapije, je ukazala na

biološki značaj proteina u karcinomu dojke, tj. na anti-proliferativnu i anti-apoptotsku, kao i ulogu ovog proteina u rasejavanju malignih ćelija, i omogućila da se odredi njegov klinički značaj, tj. da se definišu visoko-rizične (post pN+ pS2-, pT2 III pS2-, pre II ER+ PR+ pS2+) i nisko-rizične grupe pacijentkinja (post II ER+ PR+ pS2+, pre II ER+ PR+ pS2-), bez obzira na primenjenu terapiju.

Ključne reči: karcinom dojke, estrogenom-regulisani proteini, pS2, katepsin D, granična vrednost, nisko-rizične grupe pacijentkinja, visoko-rizične grupe pacijentkinja;

The relevance of estrogen-regulated expression of pS2 and cathepsin D proteins in primary operable breast carcinoma

Abstract

Breast carcinoma is the most common malignancy and one of the leading causes of death from cancer among women in industrial countries, mainly due to the propensity of the primary breast carcinoma to metastasize to lymph nodes in the armpit and remote places in the body. During the first 3 years of follow-up, early breast carcinoma is characterized by the maximum number of distant metastases, independent of applied therapy (surgery, surgery and chemotherapy, surgery and hormonal therapy). Identification of the tumor/tumor-host characteristics (clinical or biological) that would specifically indicate patients with low/high risk for metastatic disease represents an important research goal. Numerous molecular biomarkers have been suggested as potential prognostic/predictive factors for breast carcinoma either because they are direct targets of therapy or because their expression is a secondary phenomenon in the mechanism of therapy. Studies have shown that high concentrations of cathepsin D represent an independent indicator of poor prognosis for breast carcinoma patients as well as high concentrations of pS2 in breast carcinoma are associated with a favorable course of the disease and represent a useful predictive factor for patients' response to adjuvant hormonal therapy. Estrogen-induced molecular biomarkers, pS2 and cathepsin D, were investigated in order to determine the cut-off values for defining elevated vs. basic concentrations, i.e. to define the status of biomarkers in breast carcinoma. The aim of this study was to identify the groups of patients with low/high risk for relapse, on the basis of pS2 and cathepsin D status that would be defined according to the cut-off values for their expression in breast carcinoma.

Analysis of the relationship of classical and biochemical prognostic/predictive factors with concentrations of pS2 and cathepsin D allowed us to define the cut-off values for the expression of pS2 (15 ng/mg) and cathepsin D (39 pmol/mg) in breast carcinoma that have not only statistical but also biological relevance, in terms of defining the estrogen-dependent vs. estrogen-independent expression. Literature review shows that the cut-off values for the expression of pS2 and cathepsin D, so far, have not been determined in the manner done in this study. Analysis of the patients' follow-up on the basis of cathepsin D status, during a period of 3 years after surgical treatment, indicated the biological relevance of the protein in breast carcinoma, i.e. the role of the protein within the processes of proliferation and apoptosis, and allowed us to determine its clinical significance, i.e. to define high-risk groups (pN + pT2 CD-, pN + III CD-, I CD +) and low-risk group of patients (I CD-), regardless of applied therapy. Analysis of the patients' follow-up on the basis of pS2 status, during a period of 3 years after surgical treatment, indicated the biological

relevance of pS2 protein in breast carcinoma, i.e. the anti-proliferative and anti-apoptotic as well as the role of this protein in dissemination of malignant cells, and allowed us to determine its clinical significance, i.e. to define high-risk (post pN + pS2-, pT2 III pS2-, pre II ER+ PR+ pS2+) and low-risk groups of patients (post II ER+ PR+ pS2+, pre II ER+ PR+ pS2-), regardless of applied therapy.

Key words: breast carcinoma, estrogen-regulated proteins, pS2, cathepsin D, cut-off value, low-risk groups of patients, high-risk group of patients;

1. UVOD	1
1.1. Nastanak malignog tumora dojke	3
1.1.1. Model klonske selekcije.....	3
1.1.2. Model „stem“ ćelije kancera.....	5
1.2. Nastanak metastaza - metastatska kaskada	5
1.2.1. Uspavanost tumora.....	8
1.2.2. Epitelno-mezenhimalni prelaz.....	11
1.3. Faktori prognoze/predikcije toka bolesti za primarni karcinom dojke	12
1.3.1. Klasični faktori prognoze/predikcije toka bolesti.....	14
1.3.1.1. Parametri domaćina tumora - godine i status menopauze.....	14
1.3.1.2. Parametri tumora.....	15
1.3.1.2.1. Status limfnih čvorova pazušne jame.....	15
1.3.1.2.2. Veličina tumora.....	15
1.3.1.2.3. Histološki tip tumora.....	16
1.3.1.2.4. Histološki gradus tumora.....	17
1.3.2. Biohemijski faktori prognoze/predikcije toka bolesti - status receptora za estrogen i receptora za progesteron.....	19
1.4. Katepsin D	20
1.4.1. Osnovne informacije o katepsinu D.....	20
1.4.2. Gen za katepsin D.....	21
1.4.3. Sinteza i post-translaciona obrada katepsina D.....	22
1.4.4. Ekspresija katepsina D.....	25
1.4.5. Funkcija katepsina D.....	25
1.4.5.1. Fiziološka funkcija katepsina D.....	25
1.4.5.2. Patološka funkcija katepsina D - funkcija u progresiji kancera.....	26
1.4.5.2.1. Funkcija katepsina D u proliferaciji ćelija kancera.....	27
1.4.5.2.2. Funkcija katepsina D u invaziji ćelija kancera i nastanku metastaza.....	28
1.4.5.2.3. Funkcija katepsina D u angiogenezi.....	29
1.4.5.2.4. Funkcija katepsina D u apoptozi.....	30
1.4.5.2.4.1. Funkcija katepsina D u stimulanju apoptoze.....	30
1.4.5.2.4.2. Funkcija katepsina D u sprečavanju apoptoze.....	31
1.4.6. Katepsin D kao faktor prognoze/predikcije toka bolesti.....	32
1.5. pS2	34
1.5.1. Osnovne informacije o pS2.....	34
1.5.2. Gen za pS2.....	35
1.5.2.1. Struktura gena za pS2.....	35
1.5.2.2. Regulacija transkripcije gena za pS2.....	36
1.5.3. Struktura proteina pS2.....	37
1.5.4. Ekspresija pS2.....	39
1.5.4.1. Ekspresija pS2 u normalnim tkivima.....	39
1.5.4.2. Ekspresija pS2 u patološkim tkivima.....	39
1.5.5. Funkcija pS2.....	40
1.5.5.1. Funkcija pS2 vezana za ćelijsku pokretljivost.....	40
1.5.5.2. Funkcija pS2 u polimerizaciji sluzokože.....	40
1.5.5.3. Funkcija pS2 u proliferaciji/diferencijaciji ćelije.....	40
1.5.5.4. Funkcija pS2 kao neuropeptida.....	41
1.5.6. pS2 kao faktor prognoze/predikcije toka bolesti.....	41
2. CILJ RADA	43
3. MATERIJAL I METODE	44
3.1. Pacijentkinje sa primarnim operabilnim karcinomom dojke.....	44
3.2. Određivanje koncentracija ER i PR - biohemijska metoda.....	45
3.3. Određivanje koncentracija pS2 i katepsina D - imunoradiometrijski esej (IRMA).....	49
3.4. Statističke metode za obradu rezultata.....	51
4. REZULTATI	52
4.1. Raspodela koncentracija.....	52

4. 1. 1.	Raspodela koncentracija katepsina D.....	52
4.1.1.1.	Raspodela učestalosti koncentracija katepsina D.....	52
4.1.1.2.	Raspodela koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora.....	53
4.1.1.3.	Raspodela koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim parametrima tumora	54
4.1.1.4.	Raspodela koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim statusom ER i/ili PR	56
4.1.1.5.	Raspodela koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim kombinovanjem parametara domaćina tumora, tumora i statusa ER i/ili PR.....	57
4.1.1.6.	Raspodela statusa katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, tumora ili statusima ER i/ili PR.....	60
4. 1. 2.	Raspodela koncentracija pS2.....	61
4.1.2.1.	Raspodela učestalosti koncentracija pS2.....	61
4.1.2.2.	Raspodela koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora.....	62
4.1.2.3.	Raspodela koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim parametrima tumora	63
4.1.2.4.	Raspodela koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim statusima ER i/ili PR	65
4.1.2.5.	Raspodela koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim kombinovanjem parametara domaćina tumora, tumora i statusa ER i/ili PR.....	66
4.1.2.6.	Raspodela statusa pS2 u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, tumora i statusima ER i/ili PR.....	68
4. 2.	Verovatnoća za DFI.....	69
4. 2. 1.	Verovatnoća za DFI na osnovu statusa katepsina D.....	72
4.2.1.1.	Verovatnoća za DFI na osnovu statusa katepsina D - u grupama pacijentkinja definisanim statusom limfnih čvorova	72
4.2.1.2.	Verovatnoća za DFI na osnovu statusa katepsina D - u grupama pacijentkinja definisanim histološkim gradusom tumora	75
4. 2. 2.	Verovatnoća za DFI na osnovu statusa pS2.....	77
4.2.2.1.	Verovatnoća za DFI na osnovu statusa pS2 - u grupama pacijentkinja definisanih statusom limfnih čvorova	77
4.2.2.2.	Verovatnoća za DFI na osnovu statusa pS2 - u grupama pacijentkinja definisanim histološkim gradusom tumora.....	78
5.	DISKUSIJA	82
5. 1.	Raspodela koncentracija.....	86
5. 2.	Raspodela koncentracija katepsina D.....	87
5. 3.	Raspodela koncentracija pS2.....	90
5. 4.	Verovatnoće za DFI.....	91
5. 4. 1.	Verovatnoće za DFI na osnovu statusa katepsina D - u grupama pacijentkinja definisanim statusom limfnih čvorova.....	95
5. 4. 2.	Verovatnoće za DFI na osnovu statusa katepsina D - u grupama pacijentkinja definisanim histološkim gradusom.....	96
5. 4. 3.	Verovatnoće za DFI na osnovu statusa pS2 - u grupama pacijentkinja definisanim statusom limfnih čvorova.....	97
5. 4. 4.	Verovatnoće za DFI na osnovu statusa pS2 - u grupama pacijentkinja definisanim histološkim gradusom	98
6.	ZAKLJUČCI.....	101
7.	LITERATURA.....	103
8.	SPISAK SKRAĆENICA.....	118
9.	SPISAK PRILOGA	120
9. 1.	Spisak slika.....	120
9. 2.	Spisak tabela	121

1. UVOD

Kancer predstavlja vrstu oboljenja u kome se grupa ćelija karakteriše nekontrolisanim rastom, sposobnošću invazije u okolna tkiva i potencijalom za metastaziranje, odnosno za rasejavanje do udaljenih tkiva i organa putem limfe ili krvi i stvaranja depozita metastatskih ćelija (metastaza). Najveći deo humanih kancera nastaje kao rezultat akumulacije genetskih i epigenetskih promena. Ove promene mogu da se ispolje u vidu velikog broja promena ćelijske morfologije, strukture i funkcije što uslovljava: a) da je kancer dovoljan sam sebi u pogledu stvaranja signala za rast, b) neosetljivosti na signale inhibitora rasta, c) izbegavanja apoptoze, d) neograničen potencijal za reprodukovanje, e) aktiviranje signalnih puteva koji dovode do neoangiogeneze, invazije i nastanka metastaza (1).

Karcinom predstavlja medicinski termin koji se odnosi na maligni tumor, sastavljen od transformisanih epitelnih ćelija. Karcinom dojke je najzastupljenije maligno oboljenje i jedan od vodećih uzroka smrtnosti od malignih oboljenja među ženama u industrijski-razvijenim zemljama (2), u najvećoj meri zbog sklonosti primarnih karcinoma dojke da metastaziraju do limfnih čvorova u pazušnoj jami i udaljenih mesta u organizmu, kao što su pluća, jetra, kosti i centralni nervni sistem (3). Procena Američkog društva za kancer je da se, godišnje, očekuje oko 1 milion novih slučajeva karcinoma dojke u svetu (2).

Ukoliko, prilikom dijagnostikovanja karcinoma dojke, nema uočljivih znakova prisustva udaljenih metastaza u organizmu, smatra se da je bolest u ranoj ili početnoj fazi (tzv. rani karcinom dojke) i više od 90 % novih slučajeva karcinoma dojke se dijagnostikuje u ovoj fazi bolesti (4). Pretpostavljeno je da primarni maligni tumori dojke, već u ranoj fazi bolesti, rasejavaju maligne ćelije u krvotok (5) tako da u trenutku detekcije bolesti, osim primarnog tumora, mogu da postoje i udaljene pojedinačne maligne ćelije i udaljeni depoziti malignih ćelija (6). Uprkos značajnom napretku u dijagnostici i kliničkom lečenju, kao i razumevanju molekulske osnove biologije karcinoma dojke, oko 30 % pacijenata obolelih od karcinoma dojke u ranoj fazi, koji nisu lečeni adjuvantnom sistemskom terapijom, se suoči sa ponovnom pojavom simptoma bolesti, odnosno doživi relaps u toku dužeg perioda praćenja toka bolesti (~ 10 god.) (2). Ukoliko se, prilikom postavljanja dijagnoze, utvrdi prisustvo udaljenih metastaza u organizmu, smatra se da je bolest u kasnoj ili uznapredovaloj fazi (tzv. uznapredovali kancer dojke).

Prisustvo rasejanih ćelija malignog tumora na udaljenim mestima u organizmu je povezano sa kraćim periodom bez ponovne pojave bolesti (DFI) i sa kraćim periodom ukupnog preživljavanja (OS) pacijenata obolelih od malignog tumora dojke (7). Ako se primarni tumor



detektuje i ukloni u ranoj fazi bolesti, pre nego što nastanu metastaze, prognoza toka bolesti pacijenta može da bude povoljna i verovatnoća za preživljavanje bez ponovne pojave bolesti je velika. Što je duži vremenski period u kome pacijent nema simptome ponovne pojave bolesti, to bi i ukupan vremenski period do smrtnog ishoda, usled kancera, trebalo da bude duži. Iako pacijenti sa rasejanim tumorskim ćelijama imaju veći rizik za ponovnu pojavu bolesti, neće se, tokom perioda praćenja toka bolesti, kod svih tih pacijenata stvoriti udaljene metastaze, odnosno razviti metastatska bolest (8). Naime, posle hirurške terapije se, uglavnom, primenjuje adjuvantna sistemska terapija (citotoksična hemioterapija ili manje toksična hormonska terapija), da bi se sprečilo ili odložilo moguće nastajanje udaljenih metastaza. Međutim, i nakon primljene adjuvantne sistemske terapije, oko 15-20 % pacijenata sa primarnim karcinom dojke, i dalje, u sebi nosi rasejane maligne ćelije (9), koje imaju nisku ili uopšte nemaju proliferativnu aktivnost (10). Deo ovih rasejanih malignih ćelija može da nastavi da postoji u stanju tzv. „uspavanosti“, sve dok se ne vrate u aktivnu fazu i iniciraju nastanak metastaza. Na aktiviranje malignih ćelija utiču različiti faktori koji obuhvataju genetske predispozicije „uspavanih“ ćelija, kao i imunološki i angiogeni uticaj okruženja.

Lečenje karcinoma dojke u ranoj fazi često biva neuspešno zbog toga što u toku 15-20 godina, a najčešće u toku prvih 5 godina nakon hirurške terapije, dolazi do ponovne pojave simptoma bolesti, odnosno relapsa, usled razvoja metastatske bolesti (4). Analiza zavisnosti pojave relapsa od vremenskog perioda koji je protekao od uklanjanja primarnog tumora (hirurška terapija) do pojave relapsa, u okviru tzv. „prirodnog“ toka bolesti pacijenata obolelih od karcinoma dojke, je pokazala da se na krivoj koja odgovara funkciji rizika za ponovnu pojavu bolesti mogu razlikovati 2 pika, pri čemu se prvi pik uočava u širokom vremenskom opsegu do 3 godine, a drugi, uglavnom, između 3. i 5. godine nakon hirurške terapije (7, 11-12). Postojanje 2 pika na krivoj funkcije rizika je uočeno za različite podgrupe pacijenata, bez obzira na faktore prognoze/predikcije toka bolesti (status menopauze, status limfnih čvorova pazušne jame, veličinu tumora, status receptora za estrogen) što upućuje na biološki fenomen. Jednom od hipoteza, kojom bi se mogao objasniti uočeni oblik funkcija rizika za ponovnu pojavu bolesti, se pretpostavlja da uklanjanje primarnog tumora hirurškom terapijom može da indukuje promene unutar mikro-metastatskih žarišta, odnosno da stimuliše proliferaciju i/ili angiogenezu ćelija tumora (13-14). Transformacija malignih ćelija iz stanja bez deobe ćelija u stanje rasta bez krvnih sudova, kao i iz poslednjeg stanja u fazu stvaranja kapilara i daljeg rasta predstavlja transformaciju mikrometastatskih žarišta u angiogenezni fenotip što rezultuje iznenadnim ubrzanjem metastatskog procesa i odgovara prvom piku na krivoj rizika za ponovnu pojavu bolesti. Drugi pik na krivoj je pripisan aktiviranju mikrometastatskih depozita koje se, usled „uspavanosti“ tumora, može desiti nekoliko godina nakon hirurške terapije (15). Lečenje

metastatske bolesti se, još uvek, svodi na ublaživanje tegoba (paliјativno lečenje), sa obzirom na to da je mogućnost izlečenja veoma ograničena ili praktično ne postoji (16).

Kliničko lečenje karcinoma dojke se, dodatno, komplikuje činjenicom da invazivni karcinomi dojke pokazuju širok opseg molekulskih profila, morfoloških tipova i kliničkog ponašanja. Ne samo da postoji velika heterogenost u prirodi tipova ćelija između različitih tumora, već se u okviru jednog tumora može uočiti značajna heterogenost feno- i geno-tipova (17). Stoga je glavni izazov, za istraživače u translacionim studijama, unapređenje znanja o molekulskim uzrocima takve heterogenosti. Nova saznanja o uzrocima heterogenosti tumora dojke su od velike važnosti ne samo za bolje razumevanje biološke osnove nastanka malignog tumora dojke i rasejavanja metastaza, već i za razvoj novih terapijskih pristupa, a sve u cilju poboljšanja ishoda bolesti pacijenata.

1. 1. Nastanak malignog tumora dojke

Maligni tumor dojke je, čak i u ranoj fazi, heterogena bolest u kojoj, pored genetskih i epigenetskih mutacija, interakcije između tumorskih ćelija i njihovog mikrokruženja (stroma, inflamatorne ćelije i krvni sudovi) imaju značajan uticaj na proces tumorigeneze, u smislu da utiču na rast, progresiju i metastatski potencijal tumora (6, 18). Pored postojanja različitih podtipova tumora, ćelije u okviru jedne tumorske populacije, često, ispoljavaju funkcionalnu heterogenost, pri čemu ćelije ispoljavaju različite kapacitete za proliferaciju i diferencijaciju (18). Da bi se objasnilo zašto svaka ćelija unutar tumora nije sposobna da inicira i/ili održi rast tumora, predložena su dva modela za heterogenost ćelija tumora, kojima se objašnjava i nastanak kancera (19-20):

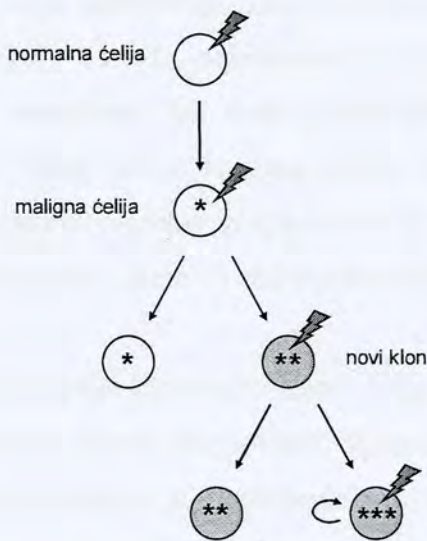
- model klonske selekcije i
- model „stem“ ćelije kancera.

1. 1. 1. Model klonske selekcije

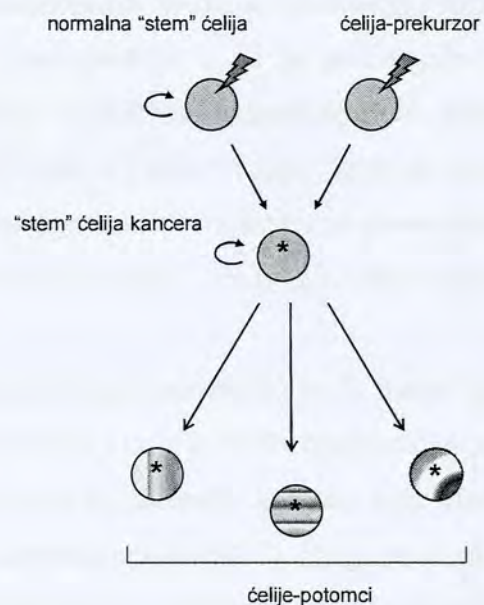
Dva aspekta modela klonske selekcije (slika 1.1. A), koji je 1976. godine prvi predložio Nowell (19), jesu: a) heterogenost u okviru tumora, usled genetske nestabilnosti i b) postepena prirodna selekcija ćelija koje imaju najpodesniji (najagresivniji) fenotip. Model klonske selekcije pretpostavlja da svaka ćelija u tumoru ima potencijal da inicira tumor. Genetske mutacije obezbeđuju datim ćelijama selektivnu prednost pri rastu, u odnosu na okolne normalne ćelije,

tako da će ćelije sa mutacijama biti dominantne u odnosu na sve druge ćelije u tumoru i stvorice novi klon. Ćelije-potomci novo-stvorenog klona će biti okarakterisane novim karakteristikama, između ostalog i različitim potencijalom za diferencijaciju, u odnosu na druge ćelije tumora, a sličnim potencijalima za inicijaciju rasta tumora, u okviru novo-stvorene populacije (20). Sa jedne strane, ove ćelije mogu da stvore veliki broj potomaka, a sa druge, nove mutacije mogu da omoguće prednost pri rastu, u odnosu na druge tumorske ćelije, kao što je otpornost na apoptozu. Prema modelu, svaka ćelija kancera, potencijalno, može da postane invazivna i da izazove nastanak metastaze ili da postane otporna na terapije i izazove ponovnu pojavu bolesti.

A) Model klonske selekcije



B) Model „stem“ ćelije kancera



Slika 1.1. - Dva predložena modela za inicijaciju i progresiju tumora, odnosno heterogenost tumora. A) Po modelu klonske selekcije, svaka normalna ćelija, potencijalno, može da pretrpi transformaciju. Nastala maligna ćelija (bela boja) može da stekne dodatnu mutaciju i stvori novi klon ćelija (siva boja), dok druge maligne ćelije ostaju bez dodatne mutacije. Ovaj proces može da se ponavlja beskonačno i neke mutacije mogu da dovedu do novih osobina, kao što su diferencijacija i sposobnost za samo-obnavljanje. Ćelije sa mutacijama će imati prednosti u toku rasta i biće dominantne u tumoru. B) Po modelu „stem“ ćelije kancera, mutacije koje izazivaju kancer se, verovatno, događaju u normalnim „stem“ ćelijama (siva boja), koje se samo-obnavljaju, ili u ćelijama-prekursorima (siva boja). Od ovih ćelija potiču tzv. „stem“ ćelija kancera (siva boja) koje mogu da se samo-obnavljaju i diferencijuju tako da stvore sve druge ćelije tumora, ali isto tako mogu i dodatno da mutiraju. Ćelije-potomci (šrafirano) su genetski identične „stem“ ćelijama kancera, ali nisu sposobne da se samo-obnavljaju. U A) i B) - krugovi predstavljaju ćelije, munja predstavlja mutagenezu, zvezdice predstavljaju mutacije, pri čemu prva zvezdica u svakom krugu predstavlja višestruke mutacije koje su neophodne da bi se normalna ćelija transformisala u malignu.

1. 1. 2. Model „stem“ ćelije kancera

Model „stem“ ćelije kancera je, kao model karcinogeneze, bio opisan još 30-ih godina prošlog veka, ali je tek nedavno proširen na solidne tumore, pri čemu je dokazano da "stem" ćelije kancera mogu da postoje i u tumorima dojke (21). Prema modelu (slika 1.1. B), određena populacija ćelija kancera, nazvanih „stem“ ćelije kancera¹, reguliše inicijaciju, progresiju i ponovnu pojavu tumora (22). Ove ćelije su nazvane „stem“ ćelijama kancera kako bi se naglasile njihove osobine, slične osobinama „stem“ ćelije normalnog tkiva, i sposobnost da kontinualno održe proces tumorigeneze. Po definiciji, "stem" ćelije kancera su sposobne da se neograničeno samo-obnavljaju i da diferentuju, što dovodi do stvaranja svih (tumorigenih i ne-tumorigenih) tipova ćelija koje sačinjavaju ostatak tumora. Pretpostavlja se da se učestalost "stem" ćelije kancera razlikuje između pojedinačnih tumora istog podtipa i da je potencijalno veća u agresivnijim tumorima. Još uvek nisu obezbeđeni definitivni eksperimentalni dokazi koji pokazuju da "stem" ćelije kancera potiču od normalnih „stem“ ćelija tkiva sa kancerskim fenotipom ili od ćelija-prekurzora, koje su diferentovanjem stekle kapacitet za samo-obnavljanje, ili, pak, od spajanja „stem“ i mutiranih ćelija što bi, teorijski, omogućilo dalju akumulaciju mutacija.

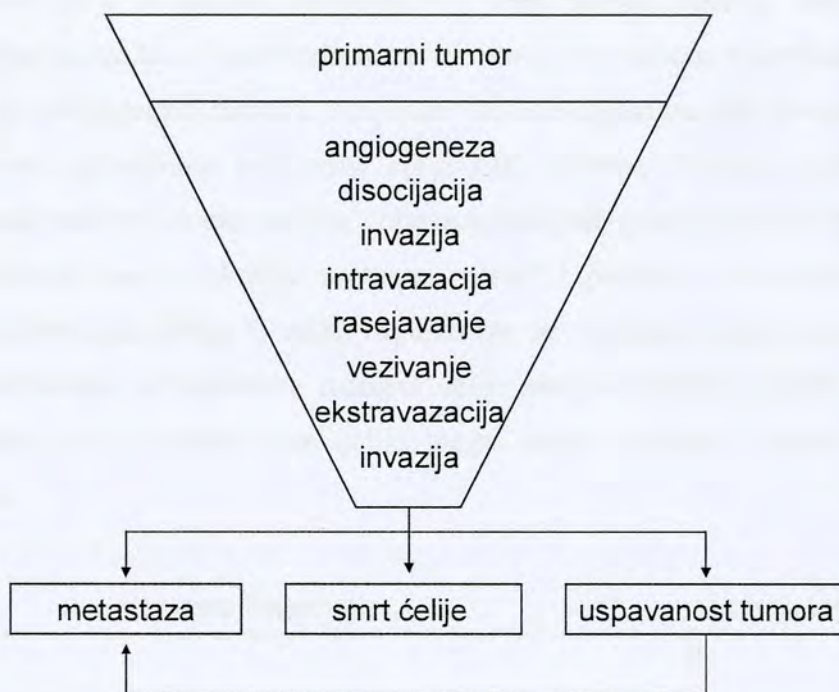
Modeli selekcije klonova i "stem" ćelija kancera imaju zajedničko to da tumor nastaje od pojedinačne ćelije koja je akumulirala višestruke mutacije i koja je stekla neograničen potencijal za proliferaciju. Važno je napomenuti da dva modela nastanka kancera nisu međusobno isključiva jer same "stem" ćelije kancera podležu klonskoj selekciji (23). Stoga se karakteristike "stem" ćelije kancera mogu promeniti tokom tumorigeneze i, eventualno, može nastati posebna, dominantnija "stem" ćelija kancera.

1. 2. Nastanak metastaza - metastatska kaskada

Metastatska bolest, kao posledica nastanka udaljenih metastaza, je uzrok preko 90 % smrtnih ishoda među pacijentima obolelim od kancera (24). Metastaze predstavljaju depozite malignih ćelija koji nastaju kao posledica rasejavanja ćelija tumora sa mesta nastanka primarnog tumora do udaljenih mesta u tkivima/organima, odnosno do sekundarnih tumora (3). Metastaziranje tumora je veoma složen i dinamičan biološki proces tokom koga se dešavaju brojne interakcije između samih ćelija tumora, kao i između ćelija tumora i tkiva koje okružuje

¹ Mezenhimalne stem ćelije su multipotentne stem ćelije koje imaju visok kapacitet za samo-obnavljanje i koje mogu da diferentuju u mnoštvo specijalizovanih tipova ćelija.

tumor. Pri tome je nastanak metastaza „pritajeni“ proces koji se dešava unutar organizma i kao takvog ga je teško detektovati. Trajanje bolesti na niskom, odnosno klinički-nedetektabilnom nivou (tzv. „minimalna rezidualna bolest“) je česta osobina karcinoma dojke, što je potvrđeno sve većim brojem pacijenata sa karcinomom dojke, čak i bez indikacija o metastatskom širenju, koji imaju pojedinačne maligne ćelije u krvi (25).

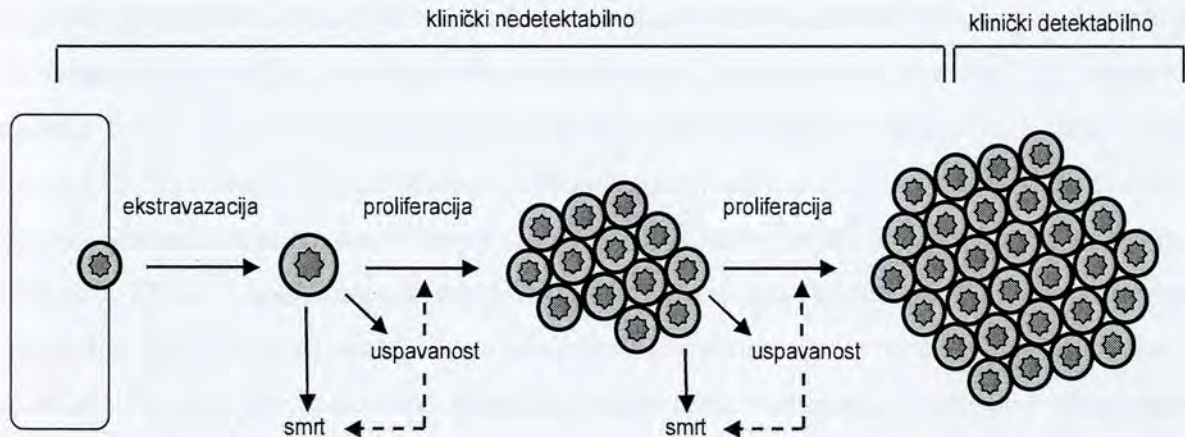


Slika 1.2. - Različiti koraci u okviru metastatske kaskade. Sužavanje figure ukazuje na sve veći gubitak tumorskih ćelija tokom metastatske kaskade.

Uprkos svom kliničkom značaju, ćelijski i molekularni mehanizmi kojima nastaju metastaze u kanceru još nisu dovoljno poznati. Utvrđeno je da proces nastanka metastaza, tzv. metastatska kaskada (slika 1.2.), obuhvata nekoliko uzastopnih bioloških procesa (3, 26). Tokom rasta, primarni tumor mora da razvije sistem za dovoz krvi koji će da zadovolji njegove metaboličke potrebe - proces koji se naziva angiogeneza. Ključni događaj u formiranju metastaza je proces invazije malignih ćelija u okolno tkivo. Da bi došlo do invazije, neophodno je odvajanje pojedinačne maligne ćelije od primarnog tumora (disocijacija), kao i složena i pravovremeno-regulisana interakcija sa tkivom koje okružuje datu ćeliju. Preduslov za prodiranje odvojenih malignih ćelija u vanćelijski matriks i okolno tkivo je njihova sposobnost tzv. „aktivne promene mesta“ što, takođe, predstavlja višestepeni proces. Da bi migrirale kroz vanćelijski matriks, maligne ćelije moraju da se privremeno vežu za pojedine komponente tog

matriksa, uz posredstvo receptora na površini ćelije koji su specifični za odgovarajuće substrate. Potom, maligne ćelije moraju da prođu kroz intersticijalni² matriks, što se dešava posredstvom proteolize. Utvrđeno je da mnogi maligni tumori pokazuju povišene nivoe proteolitičke aktivnosti i smatra se da je proteolitička degradacija vanćelijskog matriksa preduslov da bi maligne ćelije mogle uspešno da prodru u ciljno tkivo (27).

Nakon što uspešno prođu kroz vanćelijski matriks, maligne ćelije ulaze u krvotok i/ili u limfni sistem - proces koji se naziva intravazacija³. Ovaj proces, takođe, zahteva dobro koordinisanu sekvencu proteolize i „aktivne promene mesta“. Po ulasku u krvotok, maligne ćelije se rasejavaju do sekundarnih mesta u udaljenim tkivima/organima, gde bivaju vezane u kapilarima, na osnovu ograničenja veličinom ćelije (28). Potom, maligne ćelije aktivno napuštaju sistem krvnih sudova (ekstravazacija⁴) putem uzastopnih procesa proteolize, adhezije između ćelija i substrata, kao i „aktivne promene mesta“ i prodiru u ciljna tkiva/organe (invazija). Prodiranje malignih ćelija u ciljni organ/tkivo ne rezultuje, obavezno, razvojem klinički-očigledne metastaze jer invazivne maligne ćelije mogu da budu ubijene od strane imunog sistema (slika 1.3.). Takođe, ove ćelije mogu ostati „ugašene“, usled fenomena „uspavanosti“ tumora.



Slika 1.3. - *Moguće sudbine malignih ćelija na sekundarnom mestu. Maligne ćelije mogu da postoje kao pojedinačne ćelije, kao male pre-angiogene metastaze ili kao velike metastaze sa krvnim sudovima. Pri svakom koraku, samo mali deo ćelija će nastaviti proces, pri čemu preostale ćelije ili mikro-metastaze mogu ili da uđu u stanje uspavanosti ili da dožive smrt. Samo deo metastaza sa krvnim sudovima je klinički detektabilan dok su pojedinačne ćelije i mikro-metastaze klinički nedetektabilne. Smatra se da su procesi proliferacije i apoptoze blokirani u „uspavanim“ pojedinačnim ćelijama, dok su u „uspavanim“ pre-angiogenim mikro-metastazama ovi procesi uravnoteženi, što rezultuje ograničenom veličinom ovih mikro-metastaza.*

² Intersticijalni matriks - prazan prostor ili šupljina, koji se nalaze između prostora popunjenih strukturom ili materijom.

³ Intravazacija - proces ulaska molekula u krvni sud.

⁴ Ekstravazacija - proces izlaska molekula iz krvnog suda u okolno tkivo.

Kada se nalaze na novom, sekundarnom mestu, maligne ćelije moraju da ponovo započnu i da održe svoj rast, da bi formirale pre-angiogene mikrometastaze. Prema tzv. hipotezi „semena i podloge“ (eng. „*seed and soil*“), koju je prvi put predložio Paget 1889. godine (29), maligne ćelije mogu da prežive i kolonizuju samo ona sekundarna mesta na kojima mikro-okruženje može da promeni ekspresije gena u tumorskim ćelijama u značajnoj meri i da time utiče na stvaranje novih krvnih sudova u mikro-metastazama. Ovaj proces neovaskularizacije mikro-metastaza omogućava njihov dalji rast i nastanak makroskopskog tumora. No, nemaju ni sve ćelije u tumoru sposobnost da metastaziraju. Metastatski potencijal zavisi od više faktora koji određuju ukupan rast, preživljavanje, angiogenezu i invaziju tumorskih ćelija. Smatra se da bi samo visoko-maligne ćelije, tj. ćelije sa visokim proliferativnim indeksom i sa skoro potpuno izostalom ćelijskom adhezijom, trebalo da budu sposobne da napuste primarni tumor i da metastaziraju, odnosno dovedu do nastanka metastaza (30).

Stvaranje metastaza će biti uspešno samo ako je pojedinačna maligna ćelija sposobna da preživi svaki pojedinačan korak metastatske kaskade (28). Iako se u krvotoku pacijenata obolelih od karcinoma dojke mogu detektovati stotine ili hiljade pojedinačnih, rasejanih malignih ćelija, uočena frekvencija metastaza ostaje značajno manja od očekivane jer manje od 0,05 % malignih ćelija u cirkulaciji uspeva da preživi sve korake metastatske kaskade (31). Na osnovu ove činjenice se može smatrati da je nastanak metastaza veoma neefikasan proces. Sa obzirom na to da je, na osnovu studija, zaključeno da su rani koraci u metastatskom procesu - od trenutka kada maligne ćelije uđu u krvotok pa dok ne napuste krvotok i uđu u sekundarne organe - potpuno efikasni (5, 32), razlog za neefikasnost metastaziranja može da bude regulacija rasta malignih ćelija na sekundarnom mestu, odnosno rast mikro-metastaza i njihovo održavanje/rast do makro-metastaza (33-34). Ipak, neprekidno ponavljanje metastatske kaskade će, u jednom trenutku, obezbediti dovoljan broj malignih ćelija koje su sposobne da prevaziđu sve prepreke i da uspešno dovedu do nastanka klinički-detektabilnih metastaza, odnosno detektabilnog metastatskog tumora .

1. 2. 1. Uspavanost tumora

Studije ukazuju da model usporenog rasta malignih ćelija nije verovatan, kada se govori o stanju uspavanosti tumora, i radije se favorizuje model diskontinualnog rasta, koji podrazumeva postojanje perioda mirovanja malignih ćelija (33, 35). Trenutno postoje 2 hipoteze kojima se objašnjava uzrok uspavanosti malignih ćelija:

- I - uspavanost rasejanih malignih ćelija predstavlja njihov odgovor na nepovoljno mikro-okruženje,
- II - uspavane rasejane maligne ćelije predstavljaju „stem“ ćelije kancera koje su pronašle/stvorile novo specifično mikro-okruženje, tzv. „tumorsko utočište“, gde se ove ćelije sklanjaju da ne bi proliferisale (36).

Na osnovu eksperimentalnih modela sa ćelijskim kulturama i sa životinjama, hipotetiše se o postojanju dva stanja uspavanosti tumora:

- I - Stanje uspavanosti pojedinačne ćelije - Pojedinačne uspavane ćelije su definisane kao ćelije koje ne podležu deobi (37). Ove ćelije su okarakterisane produženom G0-fazom ćelijskog ciklusa, u kojoj su i proliferacija i apoptoza blokirane, i ovo stanje mirovanja, verovatno, pruža ćelijama zaštitu od mnogih konvencionalnih citotoksičnih lekova koji ciljaju samo ćelije sa aktivnim ćelijskim ciklusom (37-38).
- II - Stanje uspavanosti mikrometastaza - Dokazano je da postoje pre-angiogene mikrometastaze koje ne mogu da narastu više od 1-2 mm u prečniku (34). U ovim mikrometastazama je potencijalno visoka proliferativna aktivnost malignih ćelija uravnotežena povećanom brzinom apoptoze, tako da nema ukupnog povećanja veličine mikrometastaza. Ravnoteža je regulisana faktorima stimulacije i inhibicije koji se luče od strane mikrookruženja, imunih ćelija i samih tumorskih ćelija.

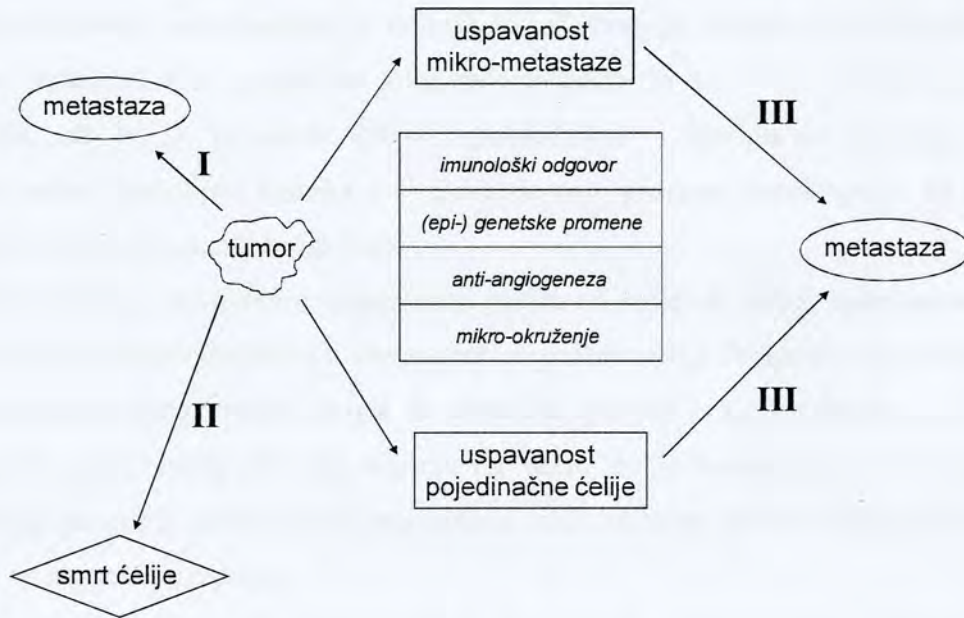
Smatra se da su uspavanost pojedinačnih malignih ćelija i uspavanost mikro-metastaze prekurzori metastatske bolesti, ali da su to različite vrste uspavanosti.

Maligne ćelije se, na sekundarnom mestu, prilagođavaju novom tkivu/organu i bivaju organizovane kao pojedinačne ćelije ili kao grupe ćelija (mikro-metastaze) i to je prvo biološko stanje, koje se može označiti kao S1 (39). Sa obzirom na to da većina malignih ćelija u stanju S1 mogu da budu ćelije koje ne proliferišu, ovo stanje mirovanja odgovara prvom uspavanom stanju. Faza rasta, koja sledi nakon stanja S1, može da bude indukovana kako genetskim promenama u ćeliji tako i promenama u mikro-okruženju i može da ima različite ishode, u zavisnosti od sposobnosti mikro-metastaza da indukuju angiogenezu. Smatra se da promene u regulaciji angiogeneze imaju najvažniju ulogu u molekulskim mehanizmima koji indukuju prelaz iz stanja uspavane mikro-metastaze u klinički-detektabilnu metastazu (slika 1.3.). Izostanak angiogeneze sprečava rast ne-angiogenih mikro-metastaza preko određene, mikroskopske veličine (tzv. „kancer bez bolesti“) (40), te nastaju „žarišta“ mikro-metastaza bez krvnih sudova, što predstavlja drugo uspavano stanje - S2. Mikro-metastaze mogu da izađu iz stanja uspavanosti preko bar 2 mehanizma (30):

- I - uklanjanje inhibitora angiogeneze može da oslobodi one mikro-metastaze koje su već sposobne da indukuju stvaranje novih krvnih sudova (tzv. Folkman-ov efekat),

II - subpopulacija malignih ćelija unutar mikro-metastaza može da se transformiše iz ne-angiogenog u angiogeni fenotip;

Ova faza rasta može da se označi kao S3. Pretpostavlja se da uklanjanje primarnog tumora hirurškom terapijom može da ima neželjeni efekat u vidu iznenadnog ubrzavanja metastatskog procesa na taj način što će se značajno povećati verovatnoća prelaza iz stanja S1 u stanje S2 (tzv. Fisher-ov efekat) (41) i iz stanja S2 u stanje S3, što umanjuje značaj ranog otkrivanja bolesti (6).



Slika 1.4. - Sudbina rasejanih tumorskih ćelija. Tumorske ćelije se rasejavaju na sekundarno mesto i mogu da dožive jednu od tri moguće sudbine: I) mogu da prolifериšu, što rezultuje ranim relapsom, II) mogu da podlegnu apoptozi, tj programiranoj ćelijskoj smrti i III) mogu da ostanu „uspavane“. Moguća su dva stanja uspavanosti tumora: a) uspavanost pojedinačne ćelije - tumorske ćelije su u stanju mirovanja (zaustavljene u G0-fazi ćelijskog ciklusa) i mogu da budu reaktivirane usled (epi-)genetskih ili promena u mikro-okruženju; b) uspavanost mikro-metastaze - tumorske ćelije prolifериšu i rastu kao mikro-metastaze, do određene veličine, usled toga što je njihov rast regulisan delovanjem angiogenih i imunoloških faktora.

Obeležje uspavanosti tumora je reverzibilna promena, tzv. epitelno-mezenhimalni prelaz, kojim se maligne ćelije, koje ne prolifериšu, transformišu u ćelije koje aktivno prolifериšu (42). Stoga, bez obzira na uspavanost tumora, maligne ćelije su sposobne da nastave ćelijski ciklus, u bilo kom trenutku, i da dovedu do stvaranja klinički-detektabilnih udaljenih metastaza. Kao posledica uspavanosti tumora, udaljene metastaze se mogu razviti decenijama nakon primarnog lečenja (43-44).

1. 2. 2. Epitelno-mezenhimalni prelaz

Sa obzirom na to da "stem" ćelije kancera, još uvek, nisu potpuno definisane, ne može se definitivno proveriti prisustvo ovih ćelija u karcinomu dojke. Zbog toga se u obzir moraju uzeti druge, alternativne hipoteze kojima se mogu objasniti neke od zbunjujućih karakteristika određenih populacija malignih ćelija. Jedna od tih alternativnih hipoteza je ona kojom je obuhvaćen reverzibilni epitelno-mezenhimalni prelaz (EMT). Epitelno-mezenhimalni prelaz predstavlja regulisan niz događaja u kojima se: a) menjaju interakcije ćelija-ćelija i ćelija-vanćeljski matriks, da bi se epitelne ćelije oslobodile iz tkiva koje ih okružuje, b) preuređuje citoskeleton, da bi se povećala ćeljska pokretljivost i omogućilo kretanje ćelije kroz trodimenzionalni vanćeljski matriks, i c) indukuje novi program transkripcije, da bi se održao mezenhimalni fenotip „stem“ ćelije (45).

Smatra se da je, za maligne tumore koji potiču od epitelnih ćelija, epitelno-mezenhimalni prelaz jedan od ključnih događaja u metastatskom procesu (42). Pretpostavka je da bi indukcija epitelno-mezenhimalnog prelaza mogla da stimuliše epitelne ćelije karcinoma dojke da steknu karakteristike „stem“ ćelija (46), što sugeriše da "stem" ćelije kancera nisu različiti entiteti, već da su to epitelne ćelije tumora koje, privremeno, stiču osobine „stem“ ćelije, što im povećava potencijal za nastanak metastaza.

Pretpostavljeno je i da je sposobnost tumora da metastazira karakteristika koja je svojstvena jednoj podpopulaciji "stem" ćelija kancera. Tokom progresije tumora, "stem" ćelije kancera koje podležu epitelno-mezenhimalnom prelazu mogu dovesti do pojave metastatskih „stem“ ćelije kancera, koje imaju sposobnost samo-obnavljanja i koja eksprimiraju različite površinske markere, u odnosu na "stem" ćelije kancera (47). Metastatske "stem" ćelije kancera mogu ili da uđu u u krvotok, kolonizuju udaljena tkiva/organe i iniciraju sekundarni tumor, ili da ostanu „uspavane“. Ove ćelije zadržavaju većinu genetskih programa koje su stekle na mestu primarnog tumora putem samo-obnavljanja, što objašnjava fenotipske sličnosti između primarnih i metastatskih kancera. Međutim, metastatske "stem" ćelije kancera su, na sekundarnom mestu rasta, sposobne da nezavisno evoluiraju putem akumulacije dodatnih genetskih promena, koje ih čine otpornim na terapije koje su efikasne protiv primarnih tumora (48).



1. 3. Faktori prognoze/predikcije toka bolesti za primarni karcinom dojke

U trenutku postavljanja dijagnoze, kod mnogih pacijenata obolelih od primarnog karcinoma dojke u ranoj fazi su prisutne mikro-metastaze u organizmu zbog čega postoji određena verovatnoća za nastanak udaljenih metastaza, a samim tim i za razvoj metastatske bolesti i smrtni ishod (49). Stoga je suštinski važno da se, za svakog pojedinačnog pacijenta, predvidi rizik za pojavu udaljenih metastaza. Nakon primarne hirurške terapije, mnogi pacijenti oboleli od primarnog karcinoma dojke bivaju lečeni adjuvantnom sistemskom terapijom, sa ciljem da se unište udaljene metastaze. Međutim, adjuvantna sistemska terapija sa sobom nosi i prateći rizik i zato bi bilo korisno da se optimalno odaberu pacijenti koji će, najverovatnije, imati koristi od iste, odnosno da se odabere optimalna adjuvantna terapija za pojedinačnog pacijenta (50). U tom smislu se bilo koja merljiva karakteristika tumora/domaćina tumora (biološka ili klinička), ili njihova kombinacija, koja bi preciznije ukazala na pacijente sa visokim/niskim rizikom za ponovnu pojavu bolesti, smatra značajnom. Stoga, identifikacija klinički-korisnih faktora prognoze/predikcije toka bolesti za primarni karcinom dojke predstavlja važan predmet istraživanja.

Faktor prognoze toka bolesti je bilo koji merljivi parametar, dostupan u trenutku hirurške terapije, koji je povezan sa tokom bolesti pacijenta kada nije primenjena adjuvantna terapija, u užem smislu, odnosno ne uzimajući u obzir primenjenu adjuvantnu terapiju, u širem smislu. Faktori prognoze su povezani sa metastatskim i/ili potencijalom brzine rasta primarnog tumora i, stoga, odražavaju sposobnost tumora da proliferiše, izvrši invaziju tkiva i metastazira (51). Važno je razlikovati faktore prognoze od faktora predikcije toka bolesti. Faktor predikcije toka bolesti je bilo koje merljiv parametar, dostupan u trenutku hirurške terapije, koji je povezan sa odgovorom, odnosno relativnom osetljivošću i/ili rezistencijom pacijenta na određenu vrstu terapije (51). U širem smislu, faktor predikcije može da opisuje bilo šta što utiče na rizik pacijenta za razvoj bolesti.

Brojni su teorijski i praktični razlozi koji opravdavaju ispitivanje i upotrebu faktora prognoze/predikcije toka bolesti:

- Prognoza/predikcija toka bolesti

Analiza faktora prognoze toka bolesti, u odnosu na parametre toka bolesti, omogućava da se odredi tzv. „prirodan“ tok bolesti pacijenata. Ukoliko između dve grupe pacijenata, definisanih prema statusu faktora prognoze, postoji značajna razlika u toku bolesti, bez obzira na to da li su pacijenti lečeni ili ne nekom dodatnom terapijom, faktori prognoze toka

bolesti omogućavaju da se identifikuju pacijenti sa povoljnim od onih sa nepovoljnim tokom bolesti (52).

Analiza faktora predikcije toka bolesti, u odnosu na parametre toka bolesti, omogućava da se odredi tzv. „klinički“ tok bolesti pacijenata. Ukoliko između dve grupe pacijenata postoji značajna razlika u toku bolesti, usled primene određene terapije za koju dati faktor predviđa osetljivost ili rezistenciju, faktori predikcije toka bolesti omogućavaju da se identifikuju pacijenti sa povoljnim od onih sa nepovoljnim tokom bolesti (51).

- Definisanje podgrupa pacijenata sa različitim rizicima

Moguće je definisati podgrupe pacijenata (tzv. „grupe rizika“) koje će imati uporedive verovatnoće za ponovnu pojavu bolesti, odnosno za efikasnost određene vrste terapije (6). Pri tome, treba imati na umu studije u kojima je, na osnovu unapređenih statističkih modela, ustanovljeno da prognostička/prediktivna vrednost prihvaćenih i predloženih faktora nije konstantna tokom perioda praćenja toka bolesti i da se menja u zavisnost od dužine perioda praćenja toka bolesti pacijenata (53).

- Odabir terapije

Faktori prognoze/predikcije mogu da stvore osnovu za odabir između alternativnih terapija za pojedinačnog pacijenta ili za podgrupe pacijenata (50). Sledstveno, faktori predikcije toka bolesti mogu poboljšati kliničko ispitivanje i ukazati na faktore kojima se može meriti uspeh ili neuspeh određenih terapija. Pored toga, moguće je identifikovati podgrupe pacijenata za koje je potrebno primeniti agresivnije modalitete terapije (49).

- Razumevanje bolesti

Studije o faktorima prognoze/predikcije toka bolesti imaju za cilj da, direktno ili indirektno, objasne značajnu heterogenosti koja je uočena između karakteristika pacijenata i tumora, sa jedne, i ishoda bolesti pacijenata, sa druge strane. Faktori prognoze/predikcije toka bolesti su promenljive koje se određuju za pojedinačne pacijente i koje, samostalno ili u međusobnoj kombinaciji, objašnjavaju deo ove heterogenosti. Stoga, oni faktori prognoze/predikcije za koje se ustanovi da su značajni, eventualno, mogu da obezbede uvid u proces bolesti.

- Dizajn ispitivanja (studija)

Faktori prognoze/predikcije toka bolesti mogu biti upotrebljeni u dizajniranju kliničkih trajala ili drugih studija na način da definišu kriterijum izbora, odnosno podesnost pacijenata ili da razdvoje pacijente prema grupama rizika na način da neravnotežna raspodela ne utiče na primarnu terapiju, kao i da obezbede smernice za buduće studije (6).

Klasični prognostički faktori, koji se trenutno koriste u kliničkoj praksi, obuhvataju parametre (godine i status menopauze) domaćina tumora i parametre (status limfnih čvorova, veličina

tumora, histološki tip i histološki gradus) tumora. Standardni prediktivni faktori, pored statusa receptora za estrogen (ER) i receptora za progesteron (PR), koji se koriste u svrhu odabira endokrine terapije, obuhvataju i umnožavanje gena i/ili prekomernu ekspresiju HER2/*neu*, koji se koriste za kliničke trajale u adjuvantnom lečenju, kao i za odabir pacijenata za primenu leka Trastuzumab u lečenju metastatske bolesti (50).

1. 3. 1. Klasični faktori prognoze/predikcije toka bolesti

1.3.1.1. Parametri domaćina tumora - godine i status menopauze

Analiza parametara domaćina tumora, kao prognostičkih parametara primarnog karcinoma dojke, je pokazala značajnu neusaglašenost rezultata (52, 54-55). Istaknuta je potreba za definisanjem međusobnog odnosa godina i statusa menopauze domaćina tumora, kao i potreba za napuštanjem pojednostavljenih analiza godina i statusa menopauze domaćina tumora koja se ogledaju u podeli pacijentkinja na mlađe, odnosno starije od 50 godina, kao i na pre-, odnosno post-menopauzne (52). Starost pacijentkinja je direktno povezana sa statusom menopauze pacijentkinja. Tako su pacijentkinje mlađe od 45 godina uglavnom premenopauzne, a one starije od 59 godina postmenopauzne, dok pacijentkinje starosne dobi između 45 i 59 godina mogu biti i premenopauzne i postmenopauzne.

Pretpostavlja se da su karcinomi dojke, koji se pojavljuju u mlađoj i starijoj životnoj dobi, biološki različiti entiteti, i da se, stoga, i „prirodan“ tok bolesti kod mlađih i starijih pacijentkinja značajno razlikuje (56). Određeni rezultati ukazuju na pacijentkinje mlađe od 35 godina, kao poseban entitet, za koje je ustanovljeno da imaju izrazito nepovoljniju prognozu toka bolesti (57).

Uzrok za neusaglašenost rezultata koja se odnosi na prognostičku vrednost parametara domaćina tumora je, jednim delom, u činjenici da su parametri domaćina tumora ispitivani kao nezavisni parametri prognoze, odnosno da su zanemarivani rezultati koji pokazuju međusobnu zavisnost parametara domaćina tumora i parametara tumora (58).

1.3.1.2. Parametri tumora

1.3.1.2.1. Status limfnih čvorova pazušne jame

Prilikom histo-patološkog pregleda, prisustvo malignih ćelija u limfnim čvorovima pazušne jame pruža dokaz o tome da su se maligne ćelije rasejale do udaljenih mesta u organizmu i, stoga, ima određen prognostički značaj (59). Međutim, značajnija prognostička informacija se dobija na osnovu broja limfnih čvorova u kojima su detektovane maligne ćelije nego na osnovu samog prisustva/odsustva metastaza u regionalnim limfnim čvorovima. Naime, u većini sprovedenih studija je pokazano da postoji povezanost između broja limfnih čvorova u kojima su detektovane maligne ćelije i verovatnoće za ponovnu pojavu bolesti, kao i između ovog broja i verovatnoće za preživljavanje, odnosno smrtni ishod (60-62).

U većini kliničkih istraživanja, pacijenti se, prema broju limfnih čvorova u kojima su detektovane maligne ćelije, razvrstavaju u 4 nodalne grupe, koje su definisane na osnovu podataka NSABP studije (skr. od eng. *The National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*): 0 čvorova, 1-3 pozitivna čvora, 4-9 pozitivnih čvorova, 10 i više pozitivnih čvorova (50, 61). Status limfnih čvorova (pN) se definiše prema tome da li su u limfnim čvorovima detektovane maligne ćelije (pN+, pozitivan status, bez obzira na broj limfnih čvorova) ili ne (pN0, negativan status). Ovaj parametar predstavlja najuticajniji pojedinačni indikator za ponovnu pojavu bolesti i smrtni ishod i koristi se pri odlučivanju o primeni adjuvantne sistemske terapije (63).

I dok su, u slučaju operabilnih pacijenata, metastaze u pazušnoj jami najvažnija determinanta prognoze toka bolesti, činjenica da približno 25 % pacijenata bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima ne bude izlečena lokalno-regionalnom terapijom, kao i činjenica da su brojni pacijenti sa metastazama živi i da su dobro, nekoliko godina nakon hirurške terapije, ukazuju na to da je status limfnih čvorova nepotpun pokazatelj sistemske bolesti (64-65).

1.3.1.2.2. Veličina tumora

Histopatološka veličina tumora (pT) predstavlja najveću dimenziju tumora, izmerenog duž tri ose, i na osnovu nje se tumori mogu svrstati u pT1 ($T \leq 2$ cm), pT2 ($2 < T \leq 5$ cm) i pT3 ($T > 5$ cm) tumore (66). Veličina tumora je direktno povezana sa prisustvom i sa povećanim prosečnim brojem limfnih čvorova u kojima su detektovane maligne ćelije, odnosno sa povećanom verovatnoćom za nastanak regionalnih metastaza (59, 62). Pri tome, i broj udaljenih

metastaza raste sa povećanjem veličine tumora, te je veličina tumora u direktnoj korelaciji sa povećanom verovatnoćom za ponovnu pojavu bolesti i smrtni ishod (67). Na osnovu toga se može pretpostaviti da veličina tumora predstavlja funkciju vremena tokom koga tumor raste, odnosno funkciju brzine rasta tumora. Tumori koji su veličine 1 cm ili manji imaju izrazito nizak rizik, odnosno malu verovatnoću za ponovnu pojavu bolesti i smrtni ishod (59). Međutim, tumori iste veličine ne moraju imati istu agresivnost, brzinu rasta i proliferativne karakteristike malignih ćelija (55).

Veličina tumora je od posebnog interesa u grupi pacijentkinja sa negativnim statusom limfnih čvorova. Na osnovu baze podataka SEER (skr. od *eng. Surveillance, Epidemiology and End Results*) studije, za više od 13 000 pacijentkinja sa negativnim statusom limfnih čvorova, ustanovljeno je da su pacijentkinje sa tumorima manjim od 1 cm imale ukupno preživljavanje (OS) od skoro 99 %, u periodu od 5 godina, u poređenju sa 89 %, za one sa tumorima između 1 i 3 cm, i 86 %, za one sa tumorima između 3 i 5 cm (60). Za pacijente sa negativnim statusom limfnih čvorova, veličina tumora je najmoćniji, nezavisan faktor prognoze i rutinski se koristi pri odlučivanju o primeni adjuvantne sistemske terapije. Studije podržavaju hipotezu da pacijenti koji imaju negativan status limfnih čvorova i prečnik tumora 1 cm ili manji predstavljaju grupu pacijenata sa najpovoljnijom prognozom toka bolesti, koji ne bi imali značajne koristi od primene adjuvantne sistemske terapije (54). Generalno, pacijenti sa tumorima većim od 1-2 cm se uzimaju u obzir za primenu adjuvantne terapije jer se kod više od 20 % ovih pacijenata razvijaju udaljene metastaze (50). Kliničke studije su pokazale da u slučaju kada su maligne ćelije prisutne u limfnim čvorovima, veličina tumora nije nezavisan parametar prognoze (68).

1.3.1.2.3. Histološki tip tumora

U skladu sa preporukama eksperata Svetske zdravstvene organizacije u oblasti histopatologije malignih tumora dojke (69), invazivni karcinomi se, na osnovu porekla malignih ćelija, mogu podeliti na:

- invazivne duktalne (IDC) i
- invazivne lobularne (ILC) karcinome;

Treba napomenuti da uprkos sugestiji koju nameće podela tumora na histološke tipove, maligni tumori oba tipa nastaju iz iste regije dojke - terminalne duktalno-lobularne jedinice (70).

Brojne studije o prognostičkom značaju histološkog tipa karcinoma dojke su dale kontradiktorne rezultate (71-72). Za uobičajene tipove karcinoma dojke, kao što su IDC i ILC, upotreba histološkog gradusa kao faktora prognoze toka bolesti je bila ograničena zbog

subjektivnog uticaja histopatologa u klasifikaciji tumora (73). Dok za karcinome dojke, koji su bili okarakterisani kao IDC ili ILC, nije nađena korelacija sa pojavom udaljenih metastaza, za nekoliko specifičnih histoloških tipova karcinoma dojke (mucinozni, tubularni, medularni i papilarni) je pokazano da uslovljavaju manji rizik za rasejavanje malignih ćelija i za izazivanje smrtnog ishoda, te da imaju povoljniju prognozu toka bolesti (74-77). Ovi specifični tipovi karcinoma predstavljaju malu grupu karcinoma koja obuhvata manje od 6 % svih invazivnih karcinoma (78).

1.3.1.2.4. Histološki gradus tumora

Usled nesavršenosti dostupnih faktora prognoze/predikcije toka bolesti, postalo je evidentno da je neophodno uvođenje nekih ne-anatomskih faktora da bi se optimalno procenila prognoza toka bolesti i planiralo lečenje pacijenata. Histološki gradus tumora je uveden u kliničku upotrebu sa ciljem da se poboljša prognoziranje toka bolesti pacijenata koje je, prvenstveno, bilo zasnovano na statusu limfnih čvorova i veličini tumora (79).

Histološki gradus tumora obuhvata dve, međusobno nezavisne osobenosti malignih ćelija - proliferativnost i diferentovanost (73, 80). Proliferativnost je izražena kroz prisustvo malignih ćelija u mitozima⁵, prisustvo ćelija sa hiperhromatizmom⁶ i prisustvo ćelija koje pokazuju pleomorfizam⁷. Posebna pažnja je bila usmerena na diferentovanost tumora kao morfološkog pokazatelja agresivnosti tumora. Diferentovanost je izražena kroz prisustvo/odsustvo sposobnosti malignih ćelija da obrazuju tkivo (tubularne strukture) dojke (81).

U pokušaju da se poboljša neusaglašenost koje je bila prisutna između nalaza različitih histopatologa, predloženi su višegradni sistemi za gradiranje tumora. Najšire prihvaćen sistem za gradiranje tumora je tzv. Scarff-Bloom-Richardson (SBR) klasifikacija (82). Ovaj sistem je, kasnije, modifikovan od strane Elston-a i Ellis-a (83), koji su uzeli u obzir indeks mitoze, diferencijaciju i pleomorfizam, tako da se ove promenljive ocenjuju od 1 do 3, ocene za svaku promenljivu se sabiraju, te se na osnovu dobijenih vrednosti, odnosno stepena proliferativnosti i diferentovanosti malignih ćelija, mogu razlikovati tri grupe tumora:

- sa ocenama 3 do 5 su dobro-diferentovani tumori (niska proliferativnost i visoka diferentovanost malignih ćelija) - gradus I,

⁵ Mitoza - faza ćelijskog ciklusa u kojoj dolazi do deobe ćelija.

⁶ Hiperhromatizam - proces kondenzacije hromatina u jedru.

⁷ Pleomorfizam - pojava dve ili više strukturnih formi tokom životnog ciklusa.

- sa ocenama 6 do 7 su umereno-diferentovani tumori (niska proliferativnost i niska diferentovanost ili visoka proliferativnost i visoka diferentovanost malignih ćelija) - gradus II,
- sa ocenama 8 do 9 su slabo-diferentovani tumori (visoka proliferativnost i niska diferentovanost malignih ćelija) - gradus III;

Koristeći SBR klasifikaciju i druge sisteme gradiranja, u većini studija je potvrđeno da pacijenti čiji su tumori visokog gradusa (slabo-diferentovani) imaju veći rizik za relaps od onih čiji su tumori niskog gradusa (dobro-diferentovani) (84).

Histološki gradus je značajan faktor za prognozu ukupnog preživljavanja i smrtnosti kako za pacijente sa pozitivnim tako i za pacijente sa negativnim statusom limfnih čvorova (61). Histološki gradus je zavisan od statusa limfnih čvorova i veličine tumora kao prognostičkih karakteristika (85). Loš, odnosno visok histološki gradus može da ukaže na odgovor pacijenta na adjuvantnu hemioterapiju jer je ustanovljeno da ova terapija dovodi do značajnog poboljšanja toka bolesti i u grupi pacijenata sa negativnim i u grupi pacijenata sa pozitivnim statusom limfnim čvorovima, koji imaju slabo-diferentivane tumore, u poređenju sa odgovarajućim pacijentima koji imaju dobro-diferentovane tumore (86).

Povezivanje stadijuma bolesti sa histološkim gradusom tumora omogućava identifikovanje dve dijametralno-suprotne grupe pacijenata u pogledu prognoze toka bolesti, odnosno procene vremenskog perioda za ponovnu pojavu bolesti:

- grupa sa najmanjim rizikom - pacijenti sa tumorima manjim od ili jednakim 2 cm, bez malignih ćelija u limfnim čvorovima i histološkog gradusa I,
- grupa sa najvećim rizikom - pacijenti sa tumorima većim od 5 cm, sa malignim ćelijama u četiri ili više limfnih čvorova i histološkog gradusa III;

Najveći broj primarnih operabilnih malignih tumora dojke obuhvata intermedijarni stadijum bolesti, te intermedijarni histološki gradus tumora, oko 66 % (87). Rezultati studija su kontradiktorni i uslovljavaju značajnu protivrečnost koja se odnosi na prognozu toka bolesti za pacijente sa tumorima histološkog gradusa II. Sa obzirom na nedovoljno poboljšanje prognoze/predikcije toka bolesti na osnovu histološkog gradusa tumora, predložena je upotreba dodatnih biomarkera - biohemijskih faktora prognoze/predikcije toka bolesti.

1. 3. 2. Biohemijski faktori prognoze/predikcije toka bolesti - status receptora za estrogen i receptora za progesteron

Receptor za estrogen, tačnije receptor za estrogen alfa (obeležava se i kao ER- α) i receptor za progesteron su najviše izučavani biohemijski parametri prognoze/predikcije toka bolesti pacijenata obolelih od karcinoma dojke (88-89). Poznato je da 50 - 80 % pacijenata obolelih od karcinoma dojke sadrže merljive koncentracije ER (92). PR se, uglavnom, eksprimira zajedno sa i pri višim koncentracijama ER, a ustanovljeno je i da približno 5 % pacijenata obolelih od karcinoma dojke ima tumore sa merljivim koncentracijama PR u kojima, istovremeno, nije eksprimiran i ER (90).

Značaj ekspresije ER i PR u prognozi i predikciji toka bolesti pacijenata obolelih od karcinoma dojke je ispitivan poslednjih tridesetak godina, uglavnom, u okviru "pozitivnog" i "negativnog" statusa receptora (90-92). Sa obzirom na to da je granična vrednost za definisanje pozitivnog/negativnog statusa steroidnih receptora arbitrarna i da obuhvata interval od 3 do 20 fmol/mg proteina malignog tumora dojke, kao i da su niske koncentracije steroidnih receptora (do 50 fmol/mg proteina) najzastupljenije u raspodeli koncentracija steroidnih receptora (90), razumljiva je i neusaglašenost rezultata u objavljenim radovima koja se tiče njihovog značaja.

Status ER i PR u karcinomu dojke predstavlja i faktor prognoze i faktor predikcije toka bolesti pacijenta. Prognostički značaj ER i PR u karcinomu dojke se može ispitivati u slučajevima kada su pacijenti oboleli od karcinoma lečeni samo hirurškom terapijom (50). U NSABP studiji, jednoj od najznačajnijih studija o prognostičkom značaju ER, u okviru koje pacijentkinje obolele od kancera dojke u ranoj fazi nisu primale adjuvantnu sistemsku terapiju (93), utvrđeno je da su pacijentkinje sa pozitivnim statusom ER u tumorima imale verovatnoću od 0,74 za DFI i verovatnoću od 0,92 za OS, u toku prvih 5 godina praćenja toka bolesti, dok su one sa negativnim statusom ER u tumorima, u istom periodu, imale odgovarajuće verovatnoće od 0,66 i 0,82, respektivno. Važno je naglasiti da za sve pacijentkinje u ovoj studiji, koje nisu ispoljile udaljene metastaze, period praćenja toka bolesti nije bio isti (5 godina) za sve pacijentkinje. Studije sa dužim intervalom praćenja toka bolesti su ukazale da se povoljna prognoza toka bolesti, koja je povezana sa tumorima sa pozitivnim statusom ER, ne održava tokom vremena. Tako je Hilsenbeck ustanovio da je prognoza toka bolesti pacijenata sa pozitivnim statusom ER povoljnija tokom prve 3 godine praćenja toka bolesti, ali ne i posle 3 godine (94). Studije ukazuju da je status ER slab pokazatelj prognoze toka bolesti i da, kada se statusi ER i PR analiziraju zajedno, status PR ne doprinosi značajno povećanju prognostičke vrednosti statusa ER (88).

Status ER/PR u karcinomima dojke je, međutim, moćan faktor predikcije toka bolesti pacijenata koji ukazuje na efikasnost adjuvantne hormonske terapije (50). Klinički značaj ER se odnosi principijelno na činjenicu da njegovo prisustvo identifikuje tumore koji su osetljivi na delovanje estrogena. Ustanovljeno je da približno 55 % pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke, koje imaju pozitivan status ER, povoljno odgovaraju na adjuvantnu hormonsku terapiju (95), u smislu da pacijentkinje sa pozitivnim statusom ER u tumorima imaju produžen interval bez ponovne pojave bolesti nakon primarne terapije, duže preživljavanje nakon ponovne pojave bolesti i značajno bolje ukupno preživljavanje, u poređenju sa pacijentkinjama koje imaju tumore sa negativnim statusom ER. Ukoliko tumori pacijentkinja, pored ER, sadrže i PR, odgovor na neku vrstu adjuvantne hormonske terapije je prisutan kod 75 - 80 % pacijentkinja (90, 96). Dakle, optimalna upotreba statusa steroidnih receptora je kao faktora predikcije za efikasnost adjuvantne hormonske terapije (tamoksifen) (97). Sve pacijentkinje sa pozitivnim statusom steroidnih receptora, koje je opravdano lečiti adjuvantnom sistemskom terapijom, bi trebalo da budu lečene hormonskom terapijom, osim ako postoje kontraindikacije.

Kao potencijalni faktori prognoze/predikcije toka bolesti, predloženi su brojni molekularni biomarkeri ili zato što su oni direktna meta terapije ili zato što njihova ekspresija predstavlja sekundarni fenomen u mehanizmu delovanja terapije (63).

1. 4. Katepsin D

1. 4. 1. Osnovne informacije o katepsinu D

U zavisnosti od amino-kiseline koja se nalazi na aktivnom mestu, katepsini se mogu podeliti u 3 grupe (98):

- serinske proteaze - katepsini A i G;
- cisteinske proteaze - katepsini B, C, H, F, K, L, O, S, V, i W,
- aspartatske proteaze - katepsini D i E;

Generalna uloga katepsina je da učestvuju u katabolizmu proteina, tačnije da razgrađuju proteine i peptide u lizozimima, pri kiselom pH . Eksperimenti su ukazali da katepsini imaju i druge, specifične funkcije, kao što su:

- neovaskularizacija endotelnih ćelija prekursora (99),
- aktiviranje prekursora proteina do njihovih biološki-aktivnih formi (100),
- omogućavanje delovanja antigena i hormona (101),
- rast ćelije i homeostaza tkiva (102),

- razaranje vanćelijskog matriksa ili pobuđivanje invazivnog rasta fibroblasta, kada su izlučeni u vanćelijski matriks, i izvršavanje programirane ćelijske smrti (apoptoze), kada su izlučeni u citosol (101, 103),
- relativno visoka koncentracija katepsina D koja je nađena u mleku sugerije još nepoznatu funkciju (104).

Wilstatter i Bamman (105) su 1928. godine uveli termin katepsin da bi definisali enzim koji je imao proteolitičku aktivnost u ekstraktima tkiva. Potom je, 1960. godine, Press sa saradnicima (106) upotrebio termin katepsin D da bi razlikovao ovaj enzim od drugih endo- i egzo-proteaza. Westly i Rochefort (107) su 1980. godine bili prvi koji su opisali katepsin D u karcinomu dojke kao enzim od 52 kDa čija je ekspresija indukovana estrogenom u MCF-7 ćelijskoj liniji, a koji se eksprimira i u onim ćelijskim linijama karcinoma dojke koje ne odgovaraju na dejstvo estrogena. Studije su ukazale da katepsin D postoji u vidu tri izoforme (108):

- neaktivna izoforma, pro-katepsin D (52 kDa),
- intermedijarna, aktivna izoforma (48 kDa) i
- stabilna, aktivna izoforma koja se sastoji od teškog (34 kDa) i lakog lanca (14 kDa).

Katepsin D je gliko-protein, član A1 familije aspartatskih proteaza, familije kojoj pripada većina aspartatskih endo-proteaza prisutnih u čovečijem telu (109). Opšti katalitički mehanizam, zajedno sa optimalnim pH koji je potreban za njihovu katalitičku aktivnost, kao i visok nivo sličnosti primarne i tercijarne strukture su razlozi zbog kojih katepsin D pripada ovoj familiji aspartatskih peptidaza. Važna karakteristika katepsina D je da je prisutan u skoro svim ćelijama, tkivima i organima, tačnije unutar kiselih odeljaka lizozoma i različitih pre-lizozomskih i endozomskih vezikula ćelija većine sisara, ali ne i u zrelih eritrocitima, koji ne sadrže lizosome (109-110). Zbog svoje rasprostranjenosti, katepsin D je jedna od proteaza koje su najviše proučavane među hidrolazama prisutnim u lizozomima. Najveći deo katepsina D je nađen u rastvorljivim delovima humanih ćelija, dok je oko 20 % molekula vezano za membrane (46). Za razliku od drugih tkivnih proteaza, kod sisara nije poznat endogeni inhibitor katepsina D, ako se izuzme propeptid katepsina D koji se odvaja tokom aktivacije enzima (111).

1. 4. 2. Gen za katepsin D

Gen za katepsin D se nalazi na kraju kratke ruke hromozoma 11, u regionu p15,5, u blizini onkogena za H-ras (106). Gen se sastoji od 9 egzona i sadrži 11 106 baznih parova. Gen ima kombinovanu strukturu sa opštim karakteristikama tzv. „housekeeping“ gena (112) i regulisanih

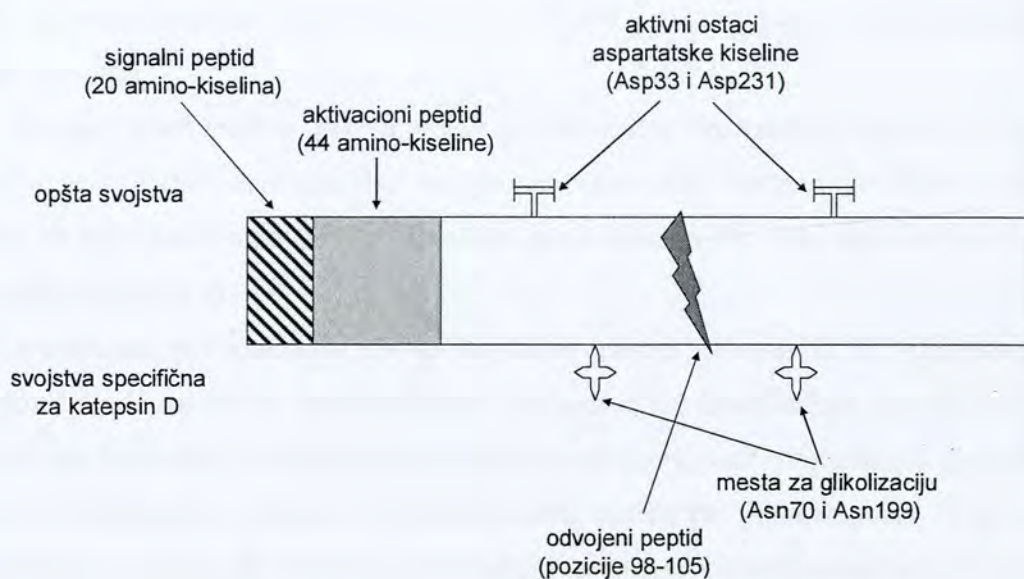
gena koji sadrže TATAA sekvencu (43). Karakteristično za tzv. „housekeeping“ gene je da se konstitutivno eksprimiraju, da imaju visok sadržaj guanina i citozina, kao i potencijalna vezivna mesta za transkripcioni faktor Sp1.

Transkripcija gena može biti započeta sa pet pozicija koje obuhvataju 52 bazna para (113). U ćelijskim linijama karcinoma dojke sa pozitivnim statusom ER, estrogen stimuliše transkripciju gena za katepsin D samo sa pozicije za početak transkripcije koje se nalazi nizhodno od TATAA sekvence, odnosno sa pozicije -20. U ćelijskim linijama karcinoma dojke sa negativnim statusom ER su nađeni niski udeli transkripcije, odnosno tzv. konstitutivna ekspresija, što je sugerisalo da i drugi faktori, različiti od estrogena, mogu da stimulišu transkripciju gena koja zavisi od TATAA sekvenci (114). Utvrđeno je da ekspresiju gena za katepsin D, pored estrogena, regulišu i faktori rasta IGF-1, TNF- α , EGF i bFGF (107, 115-116), kao i retinoična kiselina (117).

1. 4. 3. Sinteza i post-translaciona obrada katepsina D

Transkripcija gena za katepsin D dovodi do stvaranja molekula informacione RNK (iRNK) koji sadrži 1988 baza (118). Katepsin D se sintetiše u obliku pre-pro-katepsina D, posredstvom iRNK koja je vezana za hrapavi endoplazmatični retikulum (119). Humani pre-pro-katepsin D se sastoji od 412 amino-kiselinskih ostataka, sa pre-peptidom koji sadrži 20 amino-kiselina i pro-peptidom koji sadrži 44 amino-kiseline (120).

Tokom svog ćelijskog života, katepsin D podleže različitim proteolitičkim promenama. Posle prvog proteolitičkog cepanja, koje podrazumeva uklanjanje signalnog peptida sa pre-pro-katepsina D pomoću signalnih peptidaza, nastaje pro-katepsin D koji se, potom, glikolizuje (118). Molekul pro-katepsina D se sastoji od 392 amino-kiseline, ima molekulsku masu od 52 kDa i, pod normalnim uslovima, glikolizovan je na dva Asn ostatka - mesta za glikolizaciju, slika 1.5. (109). Deo molekula pro-katepsina D koji predstavlja šećer se sastoji od dva oligosaharidna lanca koji su međusobno spojeni na jednom kraju i, istovremeno, povezani pomoću N-glikozidne veze sa ostatkom proteina (121). Katepsin D sadrži osam različitih vrsta oligosaharidnih lanaca u okviru molekula. Pet oligosaharidnih lanaca se vezuje za amino-kiselinski ostatak Asn70 na lakom lancu katepsina D i sadrži 3, 5, 6 ili 7 ostataka manoze. Tri oligosaharidna lanca se vezuju za ostatak Asn199 na teškom lancu katepsina D i sadrže 5 ostataka manoze.



Slika 1.5. - Šematski prikaz strukture aspartatskih peptidaza. Katepsin D se transformiše u dvolančani enzim odvajanjem malog peptida, između pozicija 98 i 105.

Glikolizovani pro-enzim se, iz endoplazmatičnog retikuluma, transportuje do Goldžijevog aparata (122). U trans-zoni Goldžijevog aparata, terminalni ostaci manoze podležu fosforilaciji do manoze-6-fosfata (M6P) (123). U zavisnosti od vrste ćelije, katepsin D može biti usmeren ka lizozomima na, bar, 2 načina:

- I) Posredstvom M6P-ostataka, fosforilisani pro-katepsin D se vezuje za receptor za M6P (M6P-R), koji transportuje hidrolaze od Goldžijevog aparata do lizozoma i prisutan je u dve forme (121). Delovanje M6P-R od 46 kDa zavisi od prisustva dvovalentnih katjona, dok delovanje M6P-R od 300 kDa nije zavisno od tih katjona (124). Ovi receptori su prisutni na površini plazma membrane, pri čemu katjon-nezavisan M6P-R sprečava katepsin D, ili pro-katepsin D, da napusti ćelijsko okruženje i sposoban je da veže vanćelijski pro-katepsin D i da ga uvuče u ćeliju putem endocitoze, dok je manji receptor neefikasan u endocitozi. U trans-Goldžijevom aparatu, oba receptora, pri odgovarajućoj koncentraciji, vezuju lizozomske enzime, formiraju komplekse i premeštaju se, u obliku vezikule, do lizozoma, endozoma i drugih kiselih odeljaka ćelije (121-122, 125).
- II) Nekoliko studija je ukazalo na alternativno usmeravanje pro-katepsina D do lizozoma u makrofagama (46) i ćelijama karcinoma dojke (126) koje ne zavisi od M6P-R i, uprkos obimnim istraživanjima, nije potpuno razjašnjeno. Istraživanja sugerišu da određenu ulogu u ovom transportu ima interakcija pro-katepsina D sa proteinom od 68 kDa, koji je

identifikovan kao prosasponin (109). Dva molekula formiraju kompleks i transportuju se zajedno do kiselih odeljaka ćelije (primarnih lizozoma). Pretpostavljeno je da N-terminalni deo pseudo-katepsina D može da bude uključen u ovu interakciju između pro-katepsina D i prosaponina.

U oba slučaja, usled niskog pH (4,5-5,5) u primarnim lizozomima, dolazi do disocijacije kompleksa te se oslobođeni molekul receptora/prosaponina vraća u Goldžijev aparat i biva dostupan za transportovanje novog molekula pro-katepsina D, dok slobodni pro-katepsin D podleže defosforilaciji (118).

Pro-sekvenca pro-katepsina D se uopšteno naziva pro-peptid ili aktivacioni peptid. Aktivacioni peptid sadrži 44 amino-kiseline i savijen je u i iznad džepa aktivnog mesta (127). Aktivacija pro-katepsina D je posledica uklanjanja pro-peptida autoproteolizom ili proteolitičkim delovanje lizozomskih peptidaza. Autokatalitička aktivacija pro-katepsina D se događa u primarnim lizozomima, pri kiselom pH. Isključivo tokom autoaktivacije se stvara takozvani pseudo-katepsin D u kome je C-terminalni deo aktivacionog peptida povezan sa zrelim enzimom (109, 120). Puna aktivacija, odnosno puna funkcionalnost katepsina D se može postići samo uz proteolitičko delovanje drugih, uglavnom cisteinskih lizozomskih peptidaza (128). Tako nastaje aktivna intermedijarna, jednolančana izoforma katepsina D koja se sastoji od 348 amino-kiselinskih ostataka, približne molekulske mase od 48 kDa (109). Intermedijarna izoforma katepsina D se, odvajanjem malog peptida od 7 amino-kiselina između pozicija 98 i 105, transformiše u dvolančani molekul. Teški (C-terminalni) lanac sadrži 204, a laki (N-terminalni) 137 amino-kiselinskih ostataka, pri čemu su laki i teški lanac povezani hidrofobnom interakcijom (129). Ova izoforma katepsina D se, pod fiziološkim uslovima, dalje transformiše do krajnje, enzimski-zrele izoforme dvolančanog katepsina D, koja je sastavljena od 337 amino-kiselinskih ostataka. U teškom lancu se nalazi 196 amino-kiselinskih ostataka (34 kDa), dok se u lakom lancu nalazi 141 amino-kiselinski ostatak (14 kDa).

Ukupan oblik, kao i mnogi detalji strukture članova familije aspartatskih peptidaza su veoma slični. Naime, uočena je simetrija na nivou primarne, sekundarne i tercijarne strukture. Veoma slične, ali ne i identične, su sekvence aktivacionih peptida. Aspartatske peptidaze imaju strukturu sastavljenu od 2 podjedinice, pri čemu su oba dela peptidaze strukturno slična (130). Ova činjenica sugerira postojanje zajedničkog pretka, dimernog molekula sastavljenog od 2 identične podjedinice koji je, usled duplikacije i spajanja gena, evoluirao u monomernu, dvodelnu strukturu (131). Sve peptidaze iz familije A1 sadrže dubok aktivni džep, koji formiraju zidovi obe podjedinice proteina. Na dnu ovog džepa se nalazi katalitičko mesto katepsina D koje čine dva ostatka aspartatske kiseline, Asp33 i Asp231, na lakom i teškom lancu, respektivno (132). 3D analiza X-zracima je pokazala da aspartatske peptidaze mogu da prihvate supstrat

veliĉine do 9 amino-kiselina u procep svog aktivog mesta (130, 132), pri ĉemu dve podjedinice proteina zajedno pozicioniraju substrat i aktiviraju njegovu hidrolizu.

1. 4. 4. Ekspresija katepsina D

U fiziološkom stanju se mogu naći samo tragovi pro-katepsina D jer se najveći deo (oko 90 %) transformiše u intermedijarnu izoformu i, potom, u zreo, dvolanĉani enzim (133). Maligno tkivo dojke je, usled prekomerne ekspresije gena za katepsin D, okarakterisano visokim koncentracijama ovog pro-enzima. Rezultati dobijeni različitim metodama (imunohistohemijska metoda, *in situ* hibridizacija, imunoesej u citosolu, „*Northern blot*“ i „*Western blot*“) su ukazali da je koncentracija katepsina D u ćelijama karcinoma dojke od 2 do 50 puta veća u odnosu na koncentraciju u benignom tumoru dojke i ćelijama normalne dojke (134-137). Usled preopterećenja transportnih puteva ka lizozomima, znaĉajan deo pro-enzima se prerusmerava sa normalne putanje obrade što se manifestuje kao vanćelijsko luĉenje pro-katepsina D (46, 135, 138-139). Katepsin D se prekomerno eksprimira u karcinomima dojke, kako sa pozitivnim tako i sa negativnim statusom ER (112).

1. 4. 5. Funkcija katepsina D

1.4.5.1. Fiziološka funkcija katepsina D

Katepsin D je proteaza za koju je pretpostavljeno da ima brojne fiziološke funkcije jer razgrađuje iskorišćene i denaturisane unutarćelijske proteine i peptide, ali i one koji pokazuju abnormalne strukture i one koji su ušli u ćeliju putem endocitoze (140-142). Proteolitiĉka degradacija proteina zapoĉinje tako što proteaza prekida peptidne veze unutar proteina, prvenstveno u hidrofobnim amino-kiselinama (118, 143). Na taj naĉin se proteini cepaju u velike fragmente usled ĉega su njihove peptidne veze pristupaĉnije za dodatno cepanje. Nastali peptidi se, dalje, razgrađuju, pomoću drugih lizozomskih peptidaza, do dipeptida i, krajnje, do amino-kiselina koje bivaju dostupne za sinteze novih proteina. Katepsin D, takođe, uĉestvuje i u ograniĉenoj proteolizi pojedinaĉnih peptidnih veza pri ĉemu cepanje svake pojedinaĉne peptidne veze u molekulu proteina mođe da izazove strukturnu denaturaciju i funkcionalnu deaktivaciju proteina (144). Tokom ograniĉene proteolize, katepsin D mođe da aktivira prekuzore enzima, da aktivira i degradira polipeptidne hormone i faktore rasta, da obradi aktivatore i inhibitore enzima, kao i da reguliše programiranu ćelijsku smrt - apoptozu (120, 145-147). Kao posledica

ovakvog delovanja, katepsin D može da učestvuje u proteolitičkoj kaskadi, pri čemu su proteolitičke aktivnosti jedno- i dvo-lančane izoforme katepsina D jednake (118). Hidroliza peptidne veze, usled katalitičkog delovanja katepsina D, se dešava u dve faze, a mutacija na jednom od 2 aspartatska ostatka aktivnog mesta je dovoljna da onemogući enzimsku aktivnost (148).

Proteolitička aktivnost katepsina D je regulisana različitim faktorima unutar lizozoma, kao što su pH, proizvodi metabolizma, hormoni, faktori rasta i specifični inhibitori (149). Iako neki istraživači nisu uspeali da detektuju proteolitičku aktivnost proteaze pri pH većem od 5,5 (150), drugi su ustanovili da katepsin D pokazuje značajnu aktivnost pri pH većem 6,5 (151-152), što je potvrdilo pretpostavku da katepsin D može proteolitički da cepa substrate i izvan lizozomskog odeljka (153). Eseji u *in vitro* uslovima su pokazali da je humani katepsin D stabilan u opsegu pH od 1 do 9 (152) pri čemu je, u većini studija, ustanovljeno da je katepsin D optimalno aktivan prema većini supstrata u opsegu pH od 3 do 5 (154). Vrednost pH manja od 5,5 se retko može naći u vanćelijskom okruženju normalnog tkiva iako ovaj pH može da varira u zavisnosti od prirode substrata i okolnih molekula, kao što su membranski lipidi. Međutim, poznato je da je pH u tumoru, izvan ćelija, kiseo (155). Pretpostavlja se da više mehanizama doprinosi tome da pH mikro-okruženja *in vivo* bude kiseo. Zakiseljavanje citosola je dobro dokumentovan fenomen u apoptozi (156). Studije ukazuju da ćelije karcinoma dojke i makrofage u kanceroznom tkivu imaju visok potencijal da oslobode protone u vanćelijsko okruženje, preko protonske pumpe H⁺-ATP-aze, na plazma membrani (157). Anoksija, koja je karakteristika mnogih kancera, može, takođe, da doprinese stvaranju kiselog okruženja u tumorima (158). Pored toga, β-podjedinica mitohondrijalne ATP-sinteaze je detektovana na površini ćelija kancera i može da doprinese održavanju kiselog vanćelijskog pH putem stvaranja vanćelijskog ATP-a (159).

1.4.5.2. Patološka funkcija katepsina D - funkcija u progresiji kancera

Brojne studije su ispitivale ulogu katepsina D u različitim patološkim procesima (npr. Alchajmerova bolest, ateroskleroza), a najveći deo tih studija se odnosio na njegovu ulogu u kanceru. Progresija malignog tumora predstavlja proces koji zahteva neprestan razvoj interakcija između tumorskih (neoplastičnih) ćelija i njihovog mikro-okruženja, sastavljenog od vanćelijskog matriksa, strome (endotelnih ćelija i fibroblasta), masti i ćelija imunog sistema, kao i mešavine citokina i faktora rasta (160). U karcinomu dojke, uticaj mikro-okruženja ćelija se, putem parakrinog provođenja signala, prenosi između epitelnih ćelija karcinoma i okolnih fibroblasta strome (161). Tokom transformacije od normalnog tkiva do *in situ* i invazivnog

karcinoma, epitelne ćelije karcinoma i ćelije strome mogu da razmenjuju brojne enzime, faktore rasta i citokine koji menjaju lokalni vanćelijski matriks, stimulišu migraciju i invaziju, olakšavaju proliferaciju i preživljavanje i indukuju selekciju i rasejavanje malignih ćelija (162). Sa obzirom na to da je katepsin D, odnosno pro-katepsin D, prekomerno eksprimiran u karcinomu dojke i da se luči van ćelija tumora, njegovo izlučivanje utiče na više faza progresije tumora.

1.4.5.2.1. Funkcija katepsina D u proliferaciji ćelija kancera

Nekoliko studija je ukazalo na to da izlučeni katepsin D, za razliku od drugih proteaza, ima mitogeni efekat na ćelije karcinoma dojke, odnosno da može da stimuliše proliferaciju epitelnih ćelija malignog tumora dojke (163). Da bi se objasnilo mitogeno delovanje katepsina D, pretpostavljeni su različiti mehanizmi. Prvobitno je bilo pretpostavljeno da bi izlučeni pro-katepsin D morao da bude transformisan u aktivni enzim, sa obzirom na to da je vanćelijski pH u tumoru umereno kiseo (157). U tom slučaju bi delovanje katepsina D kao mitogena moglo da bude posledica njegove proteolitičke aktivnosti koja potpomaže oslobađanje i/ili aktiviranje faktora rasta, ili njihovih receptora, odnosno deaktiviranje inhibitora rasta ili sprečavanje njihovog lučenja (40, 101, 145, 164-166). U mnogim studijama, međutim, mitogena aktivnost pro-katepsina D nije bila povezana sa njegovom proteolitičkom aktivnošću. U jednoj od studija, mitogena aktivnost nije bila detektovana kada je u eksperimentima korišćen katepsin D (167) dok je, u drugoj studiji, proliferativno dejstvo pro-katepsina D bilo detektovano i u prisustvu pepstatina A, inhibitora katepsina D u *in vitro* uslovima (168). Nedavne studije su pokazale da i mutirane, enzimski-neaktivne izoforme pro-katepsina D stimulišu rast ćelija tumora *in vitro* i *in vivo* jednako efikasno kao i tzv. „wild type“ pro-katepsin D (169). Štaviše, istraživanjima je utvrđeno da sam aktivacioni peptid pro-katepsina D stimuliše rast ćelija kancera dojke *in vitro* i *in vivo* jer je pokazano da se vezivanje pro-katepsina D za ćelije kancera i njegova mitogena aktivnost mogu blokirati antitelima koja su usmerena protiv aktivacionog peptida pro-katepsina D (146, 163, 167).

Pri neutralnom ili baznom pH, aktivacioni peptid pro-katepsina D stvara petlju tako da se veći deo N-terminalne polovine enzima vezuje elektrostatičkim silama za aktivno mesto enzima i, time, blokira pristup supstrata aktivnom mestu enzima (130, 132). Istovremeno, veći deo C-terminalne polovine enzima se nalazi na površini molekula što sugeriše da bi C-terminalni deo enzima mogao da interaguje sa drugim molekulima (170). U pojedinim studijama je bilo sugerisano da se mitogena aktivnost pro-katepsina D ostvaruje posredstvom jednog određenog

dela aktivacionog peptida (168, 171-173). Utvrđeno je da se region, odgovoran za vezivanje pro-katepsina D za površinu ćelije kancera i njegovu mitogenu aktivnost, nalazi između amino-kiselina na pozicijama 27 i 44, u okviru aktivacionog peptida pro-katepsina D (167, 171).

Sa obzirom na to da je pokazano da se izlučeni pro-katepsin D vezuje za površinu ćelija karcinoma dojke (171), postavljena je hipoteza da se pro-katepsin D vezuje za receptor, prisutan na površini ćelije, koji učestvuje u provođenju signala. Receptori za M6P su jedini poznati receptori koji se vezuju za pro-katepsin D jer prepoznaju marker za M6P na brojnim glikoproteinima. Međutim, utvrđeno je da antitela usmerena protiv M6P ili M6P-R ne blokiraju mitogeni niti potencijal za vezivanje pro-katepsina D (169, 174). Pored toga, sprečavanje glikolizacije pro-katepsina D, mutacijom na jednom ili oba mesta za glikolizaciju, ili uklanjanje saharidnih lanaca, upotrebom glikozidaza, samo neznatno smanjuje mitogenu i pro-invazivnu aktivnost pro-katepsin D *in vitro* i *in vivo* (109, 168-169). Ovi nalazi ukazuju na to da delovi molekula pro-katepsina D koji sadrže šećere nisu značajni za ulogu pro-katepsina D u proliferaciji ćelija tumora i da receptori za M6P nisu uključeni u posredovanje mitogenog delovanja pro-katepsina D.

Nedavno je utvrđeno da pro-katepsin D mitogeno deluje i na fibroblaste strome (103). Naime, ustanovljeno je da enzim, izlučen od strane epitelnih ćelija tumora, može da bude zarobljen od strane ćelija strome i da, stoga, deluje kao parakrini faktor (175). Pri tome, enzim može da stimuliše proliferaciju, preživljavanje, pokretljivost i invazivni kapacitet fibroblasta. Dejstvo pro-katepsina D na epitelne ćelije tumora i/ili fibroblaste strome indukuje signal usled čega dolazi do aktivacije signalnog puta ras-MAPK (103) (176) i ekspresije različitih gena koji su uključeni u progresiju, preživljavanje, adheziju, angiogenezu i invaziju ćelija karcinoma dojke i nastanak metastaza (20). Uprkos značajnom naporu, pretpostavljeni receptor za pro-katepsin D na površini ćelije kancera, još uvek, nije identifikovan.

1.4.5.2.2. Funkcija katepsina D u invaziji ćelija kancera i nastanku metastaza

Invazija je ključni aspekt procesa progresije tumora jer je neophodan uslov za sistematsko rasejavanje malignih ćelija i nastanak metastaza. Da bi došlo do invazije malignih ćelija, neophodan je doprinos proteaza koje su sposobne da razgrade vanćelijski matriks i komponente bazalne membrane (177). Prvobitno se verovalo da ovakvo delovanje proteza predstavlja njihovu glavnu ulogu u procesu progresije tumora (177). Kasniji dokazi su sugerisali da su proteaze i ključni regulatori rasta tumora, kako na mestu primarnog tumora, tako i na mestima nastanka metastaza (168-169, 178-180). Studije su pokazale da pro-katepsin D, pored mitogenog

delovanja na ćelije kancera, ima ulogu i u procesu invazije (181) i nastanka metastaza (182). Mehanizam odgovoran za stimulaciju nastanka metastaza usled delovanja pro-katepsina D, najverovatnije, ima pozitivan efekat na proliferaciju malignih ćelija, favorizujući rast mikro-metastaza, pre nego povećanje invazivnog potencijala (169, 179, 182-184).

1.4.5.2.3. Funkcija katepsina D u angiogenezi

Poznato je da rast tumora zavisi i od procesa angiogeneze⁸ (185), koji je kontrolisan ravnotežom između pozitivnih i negativnih faktora angiogeneze. Imunohistohemijske studije su pokazale da katepsin D, nezavisno od svoje katalitičke aktivnosti, stimuliše i angiogenezu tumora (184).

U jednoj od prvih studija, Briozzo i sar. su pretpostavili da katepsin D može da stimuliše angiogenezu oslobađanjem pro-angiogenog molekula bFGF iz vanćelijskog matriksa (40). Međutim, pretpostavljeno je i da bi pro-katepsin D mogao da bude odgovoran za stvaranje angiostatina koji je specifični inhibitor angiogeneze *in vivo* (186). Neki istraživači su sugerisali da je katepsin D uključen u regulaciju formiranja krvnih sudova, naročito u solidnim tumorima, i ustanovljeno je da postoji značajna povezanost između ekspresije katepsina D od strane ćelija strome i gustine krvnih sudova u karcinomima dojke (187).

Mehanizam delovanja katepsin D u procesu angiogeneze, za razliku od drugih proteolitičkih enzima, ne podrazumeva njegovo proteolitičko dejstvo i razaranje vanćelijskog matriksa jer je pokazano da je katalitički-neaktivan katepsin D bio potentant, isto kao i tzv. „wild-type“ katepsin D, u izazivanju angiogeneze (184). Benes i sar. su uočili da se nekoliko regulatora angiogeneze eksprimira nakon što se epitelne ćelije karcinoma dojke tretiraju sa aktivacionim peptidom katepsina D (176). Pored toga, pretpostavljeno je da katepsin D može da stimuliše i rast endotelnih ćelija karcinoma (175), putem parakrinog mehanizma, tako što kao ligand interaguje, bilo direktno ili indirektno, sa neidentifikovanim receptorom koji može da bude prisutan i na površini epitelnih ćelija tumora, što je ranije sugerisano (169), i na površini endotelnih ćelija tumora (184).

⁸ Angiogeneza je bitan korak u transformaciji tumora, od latentnog do malignog stanja, i predstavlja fiziološki proces koji podrazumeva rast novih krvnih sudova, na osnovu već postojećih.

1.4.5.2.4. *Funkcija katepsina D u apoptozi*

Ustanovljeno je da, pored prethodno-navedenih, katepsin D ima ulogu i u regulaciji programirane ćelijske smrti, odnosno apoptoze. Apoptoza može biti realizovana preko dve osnovne putanje: unutrašnje i spoljašnje (188). Spoljašnja putanja apoptoze (tzv. putanja „receptora smrti“) dovodi do aktiviranja kaspaze-8, zatim kaspaze-10 i na kraju kaspaze-3 (189). Aktiviranje kaspaze-3, kao „izvršioca“ apoptoze, može biti indukovano i dodatnim aktiviranjem kaspaze-9, preko unutrašnje putanje apoptoze (179). Naime, kaspaza-8 može, takođe, da izazove i proteolizu Bid-a što dovodi do toga da se nastali skraćeni Bid (tBid) transportuje do membrane mitohondrije gde izaziva oligomerizaciju Bax-a, koji se umeće u spoljnu membranu mitohondrije, praveći u njoj kanale, usled čega dolazi do gubitka potencijala membrane mitohondrije (189). Disfunkcija mitohondrije, usled gubitka potencijala membrane, inicira unutrašnju putanju apoptoze (tzv. mitohondrijalna putanja) u okviru koje se u citosol otpuštaju mitohondrijalni apoptoski faktori, kao što su citohrom c (190), Smac/DIABLO (247), AIF (248). Otpuštanje citohroma c, kao primarnog aktivatora kaspaza, rezultira aktivacijom kaskade kaspaza, odnosno aktiviranjem kaspaze-9 (249) koja, zatim, aktivira „izvršne“ kaspaze-6, -7 i -3 (250). Aktivacija ovih „izvršnih“ kaspaza stvara rastuću kaskadu proteolitičke aktivnosti koja dovodi do razgradnje hromozomske DNK i strukturnih proteina u citoplazmi, omogućavajući time razaranje ćelije.

U svakoj fazi kaskade apoptoze je neophodna saradnja mnogih, različitih proteina. Najvažniji proteini u procesu apoptoze su kaspaze, koje predstavljaju klasu proteaza, i njihova aktivnost je striktno regulisana inhibitorima proteina apoptoze (IAP) (191). No, i druge grupe proteina su, takođe, odgovorne za regulaciju apoptoze u njenim različitim fazama, te su glavni regulatori apoptoze su: familija bcl-2 proteina, TNF- α i p53 (192). Značajnu ulogu imaju i proteaze koje nisu kaspaze, a koje obuhvataju i katepsine. Deiss je, sredinom 70-tih godina prošlog veka, prvi pokazao da katepsin D učestvuje u regulaciju apoptoze (188). Studije su pokazale da katepsin D može da ima dvojaku ulogu u apoptozi.

1.4.5.2.4.1. *Funkcija katepsina D u stimulisanoj apoptozi*

Katepsin D može da bude ključni posrednik u apoptozi koja je indukovana pomoću nekog od brojnih apoptotskih agenasa (videti (193)). Pepstatin A, inhibitor aspartatskih proteaza, može delimično da odloži apoptozu koja je indukovana pomoću različitih apoptotskih stimulusa (135, 152, 188) na osnovu čega je zaključeno da katepsin D ima ulogu u apoptozi posredstvom svoje

katalitičke funkcije. Katepsin D je jedan od lizozomskih enzima koji zahteva kiseli pH da bi bio proteolitički aktivan. Prvobitno je bilo prihvaćeno stanovište da, *in vitro*, katepsin D može da razgradi svoje substrate sve do pH 6,2, ali ne preko te vrednosti, zbog deprotonizacije oba aktivna mesta (194). Stoga je bilo opravdano pretpostaviti da bi proteolitička aktivnost katepsina D u citosolu bila drastično umanjena pri nepovoljnim uslovima pH, onima koji ne pogoduju njegovoj katalitičkoj funkciji. Međutim, eksperimentalno je pokazano da katepsin D ima ulogu u apoptozi time što učestvuje u: a) aktivaciji pro-kaspaza (153, 195), b) *in vitro* cepanju Bid-a, pri pH 6,2 (179) i c) aktivaciji Bax-a, nezavisno od cepanja Bid-a (117), što potvrđuje pretpostavke da katepsin D može proteolitički da cepa substrate i izvan lizozomskog odeljka.

Nasuprot dokazima o ulozi katepsina D u apoptozi posredstvom svoje katalitičke funkcije, postoje istraživanja u kojima je pokazano da katepsin D potpomaže apoptozu, indukovanu apoptotskim agensima, nezavisno od svoje katalitičke funkcije. Poznato je da procesi u koje su uključeni apoptotski stimuli (deterdženti, oksidacioni stres, lekovi protiv kancera), generalno, dovode do destabilizacije, propustljivosti, pa i razaranja lizozomske membrane, što rezultira brzim otpuštanjem katepsina D u citosol (196-197). Ustanovljeno je da se ne samo katalitički-aktivan, tzv. „wild type“ katepsin D, već i njegova mutirana izoforma, koja je katalitički neaktivna, brzo otpuštaju u citosol kao odgovor na delovanje apoptotskog agensa (193). Posledica otpuštanja katepsina D u citosol je otpuštanje apoptotskih faktora, prvenstveno citohroma c, iz mitohondrija u citosol kao i aktiviranje apoptotskih procesa koji rezultuju aktivacijom kaspaze-9 i kaspaze-3 (101, 152-153, 195-196).

1.4.5.2.4.2. Funkcija katepsina D u sprečavanju apoptoze

Dvojna uloga katepsina D u apoptozi je naglašena kontradiktornim rezultatima koji su dobijeni u studijama sa ćelijskim linijama 3Y1-Ad12. Jedna od uloga katepsina D u apoptozi se ogleda u njegovoj zaštiti od apoptoze. Katepsin D može da spreči apoptozu, što je pokazano u eksperimentalnim i fiziološkim uslovima, ali i u patološkim uslovima kao što je kancer (102, 193, 198-199). Zanimljivo je da su Liaudet-Coopman i sar. prvobitno ustanovili da je prekomerno eksprimirani katepsin D sprečavao apoptozu u ćelijskoj liniji 3Y1-Ad12 na način koji je zavisio od njegove katalitičke funkcije (184). Međutim, druga studija ovih autora (193), izvedena sa istim ćelijskim linijama, koje su tretirane sa hemioterapeutskim agensima, je ukazala na stimulaciju apoptoze nezavisno od katalitičke aktivnosti katepsina D.

1. 4. 6. Katepsin D kao faktor prognoze/predikcije toka bolesti

Rano dijagnostifikovanje karcinoma dojke je doprinelo velikom povećanju broja pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke sa negativnim statusom limfnih čvorova (200). Ova populacija pacijentkinja se sastoji od nekoliko podgrupa pacijentkinja koje se razlikuju po kliničko-patološkim karakteristikama tumora i po verovatnoći za ponovnom pojavom bolesti nakon hirurške terapije primarnog karcinoma dojke. Sa obzirom na to da klasični i biohemijski faktori prognoze/predikcije toka bolesti, koji su prihvaćeni i koriste se u kliničkoj praksi, ne mogu dovoljno precizno da identifikuju pacijente koji će imati povoljan/nepovoljan tok bolesti, odnosno pacijente koji će imati, ili ne, korist od adjuvantne terapije, identifikacija novih, bioloških markera prognoze/predikcije, koji su povezani sa različitim kliničko-patološkim karakteristikama tumora, predstavlja jedan od značajnih ciljeva u onkologiji. Proteini koji se prekomerno ekspimiraju i luče iz malignih ćelija predstavljaju ne samo moguće prognostičke/prediktivne faktore, već i mete za terapijske tretmane. Sa obzirom da su proteolitički enzimi bitni za proliferativni, invazivni i metastatski kapacitet tumora, ispituje se njihova moguća upotreba kao klinički-relevantnih, prognostičkih/prediktivnih faktora za mnoge solidne kancere, uključujući i karcinom dojke. Prve studije su, pre 20-ak godina, pokazale da ćelije karcinoma dojke prekomerno ekspimiraju glikolizovani katepsin D, koji se pre izlučuje nego što se transportuje do lizozoma (137, 201), a što dovodi do povećanih nivoa katepsina D u tkivu. Pretpostavljeno je da bi na osnovu koncentracije katepsina D, a u kombinaciji sa drugim biološkim i/ili klasičnim kliničko-patološkim faktorima, mogla tačnije da se predvidi verovatnoća za ponovnu pojavu bolesti, odnosno za nastanak metastaza u malignom tumoru dojke (110, 201).

Mnoge nezavisne kliničke studije su pokazale da je koncentracija katepsina D u citosolu primarnog karcinoma dojke nezavisan prognostički/prediktivni parametar (136-137, 139, 197, 201-205) i da je pokazatelj loše prognoze za pacijentkinje obolele od karcinoma dojke (139, 204-209). Naime, pokazano je da je visoka koncentracija katepsina D u tkivu tumora dojke povezana sa povećanom verovatnoćom za invazivni rast tumora i za nastanak kliničkih metastaza, verovatno usled toga što katepsin D stimuliše rast mikrometastaza na udaljenim mestima, pre nego lokalnu invaziju putem razaranja bazalne membrane (136, 201, 204, 210-213). Shodno tome, u većini studija je prekomerna ekspresija katepsina D bila povezana sa kraćim DFI i sa kraćim OS pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke (139, 201, 203-206, 213-216). Ovi rezultati su dobijeni kako na osnovu studija u kojima su korišćene standardizovane i kvantitativne metode za određivanje koncentracije katepsina D u citosolnom ekstraktu ćelija

tumora (ELISA - skr. od *eng. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, IRMA - skr. od *eng. ImmunoRadioMetric Assay*) (139, 182-183, 205-206, 217), tako i na osnovu nestandardizovanih i nekvantitativnih metoda, kao što su imunohistohemijska metoda i „*western blotting*“ (218-219).

Castiglioni (220), Niskanen (221) i Aziz (222) sa sar., koristeći imunohistohemijsku metodu, nisu uspjeli da pokažu da je katepsin D koristan prognostički pokazatelj u humanom kanceru dojke dok su Winstanley i sar. (223) našli povezanost prekomerne ekspresije katepsina D od strane ćelija tumora sa lošim preživljavanjem u univarijantnoj, ali ne i u multivarijantnoj analizi. Istraživanjem koje je sprovedeno u grupi od 270 pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke, Gohring (224) je ustanovio da imunohistohemijska analiza katepsina D pruža bolje prognostičke informacije nego imunoradiometrijska analiza. Rezultati koje su dobili Bevilacqua i sar. (225) su ukazali da je katepsin D koristan prognostički pokazatelj u ranom stadijumu karcinoma dojke.

Aaltonen i sar. (226) su ustanovili da je prekomerna ekspresija katepsina D povezana sa kraćim OS i kraćim DFI dok je Okamura sa sar. (227) ustanovio da povećane koncentracije katepsina D, koji su bile određene imunohistohemijskim putem, korelišu sa smanjenim OS, ali ne i sa smanjenim DFI. Naročito je studija Foekens-a i sar. (205), koja je obuhvatila veliki broj (2810) pacijentkinja tokom dugog perioda praćenja toka bolesti (88 meseci), dala ubedljive argumente u korist prognostičke vrednosti katepsina D, koji je određivan pomoću IRMA eseja. Foekens je ustanovio da su visoke ili srednje koncentracije katepsina D u citosolu ćelija primarnog karcinoma dojke, kada se analizira ukupno ili preživljavanje bez relapsa, povezane sa nepovoljnim tokom bolesti u grupi pacijentkinja kako sa negativnim tako i sa pozitivnim statusom limfnih čvorova, a nezavisno od drugih, klasičnih prognostičkih parametara. Studija Billgren-a (216), koja je obuhvatila 1851 pacijentkinju, a u kojoj je koncentracija katepsina D određivana u citosolnomekstraktu, putem IRMA eseja, je potvrdila rezultate Foekensa.

Jedan broj studija je bio fokusiran na pacijentkinje obolele od karcinoma dojke koje su imale negativan status limfnih čvorova i u njima je nađeno da je katepsin D nezavisan prognostički faktor i da postoji značajna povezanost između visokih koncentracija katepsina D i kraćeg ukupnog i preživljavanja bez ponovnog javljanja bolesti (213, 228). Ravdin i sar. su, u restrospektivnoj studiji koja je obuhvatila 927 pacijentkinja, ustanovili da katepsin D nije koristan za prognoziranje toka bolesti, kada se određuje pomoću „*western blotting*“-a ili imunohistohemijske metode (229). Sa druge strane, Ferno i sar. su, u studiji sa 623 pacijentkinje, našli da određivanje koncentracije katepsina D imunoradiometrijskim esejom ima prognostički značaj samo za one pacijentkinje obolele od karcinoma dojke koje su imale pozitivan status limfnih čvorova (230). U drugoj studiji je pokazano da je prekomerna ekspresija katepsina D u kanceru dojke, u vidu intenzivnijeg bojenja imunohistohemijskih preparata,

povezana sa dužim preživljavanjem pacijentkinja sa pozitivnim statusima limfnih čvorova i steroidnih receptora (231).

U pojedinim studijama se polemicalo da bi analiza koncentracija izoforme katepsina D od 34 kDa trebalo da obezbedi korisnije prognostičke informacije od analize kojom se određuje koncentracija ukupnog katepsina D i ne pravi razlika između aktivnih i neaktivnih izoformi enzima (134, 208). Brouillet i sar. (232) su ustanovili da je koncentracija pro-katepsina D u citosolu ćelija kancera dojke bila manje korisna kao prognostički marker od koncentracije ukupnog katepsina D, što ide u prilog stanovištu da neaktivnu prekuzorsku formu katepsina D ne bi trebalo uzeti u obzir kada se katepsin D koristi kao prognostički marker. Brojne kliničke studije su ustanovile da odnos koncentracija enzimski-aktivnog i -neaktivnog katepsina D (pro-katepsin D/katepsin D) predstavlja nezavisan prognostički faktor u različitim vrstama kancera (136, 174, 233) i da je indikator loše prognoze za kancer dojke. Pokazano je da je ovaj odnos koncentracija u citosolu karcinoma dojke povezan sa veličinom tumora i sa visokim rizikom za nastanak metastaza (136, 138-139, 205, 217).

Na osnovu nekih studija je sugerisano da katepsin D koji je detektovan u ćelijama strome ima bolju prognostičku vrednost nego onaj detektovan u epitelnim ćelijama tumora (187, 211, 234-237). Međutim, u studiji u kojoj je ispitivana ekspresija katepsina D u epitelnoj i stromalnoj komponenti tumora pomoću imunohistohemijske metode (238), komponenta epitelnog tumora je bila značajno povezana sa OS i DFI. Rezultati mnogih studija koje su koristile imunohistohemijsku metodu sugerišu da katepsin D koji ekspimiraju ne samo ćelije tumora, već i ćelije strome i makrofage, utiče na prognozu toka bolesti.

Sa obzirom na promenljiv značaj biomarkera tokom vremena, treba naglasiti da dosadašnje studije o prognostičkoj/prediktivnoj vrednosti katepsina D nisu ispitivale relevantnost biomarkera u zavisnosti od perioda praćenja toka bolesti.

1. 5. pS2

1. 5. 1. Osnovne informacije o pS2

Gen za pS2 je identifikovan početkom 80-ih godina prošlog veka, tokom potrage za genima koji su regulisani estrogenom u MCF-7 ćelijskoj liniji humanog karcinoma dojke, gajenoj uz i bez prisustva estrogena (239). Kasnije je iz ove ćelijske linije, koja se karakteriše pozitivnim statusom ER, izolovan protein pS2 (240).

Protein pS2 pripada porodici sekretornih detelinastih faktora (TFF, skr. od *eng. TreFoil Factor*). Poznata su 3 humana detelinasta proteina (241):

- TFF1, odnosno pS2, (označava se i kao BCE1, pNR-2, Md2) peptid koji je indukovano estrogenom i povezan sa karcinomom dojke,
- TFF2, spazmolitični protein (SP),
- TFF3, crevni detelinasti faktor (ITF);

Detelinasti faktori su mali, stabilni proteini, molekulske mase 6-10 kDa, za koje je zajedničko da imaju jedan karakterističan domen (242). Taj domen, koji se naziva detelinasti, trolisti ili P-domen, čini jednostavna, ali očuvana sekvenca amino-kiselina, koja podseća na detelinu sa tri lista. Detelinasti faktori sadrže promenljiv broj (1-6) detelinastih domena (240, 243). pS2 je identifikovan u čoveku (239), mišu (244) i pacovu (245).

1. 5. 2. Gen za pS2

1.5.2.1. Struktura gena za pS2

Citogenetske studije su pokazale da su geni koji kodiraju 3 humana detelinasta proteina locirani na hromozomu 21q22,3 (246), pri čemu su ovi geni sadržani unutar jednog fragmenta DNK, veličine 55 kb (247). Gen za humani pS2 je dugačak približno 4,5 kb i sastoji se od 3 egzona sa 125, 153 i 212 baznih parova, između kojih se nalaze 2 introna - A (3,1 kb) i B (0,77 kb) (240). Gen za pS2 ima složen promotorski region koji sadrži elemente klasičnog estrogen-osekljivog gena, što podrazumeva TATAA sekvencu, CAAT sekvencu i nepravilan element odgovora na delovanje estrogena (ERE) između pozicija -405 i -393 (248). Ustanovljeno je da u 5' regionu gena za pS2, postoji složen, uzvodni pojačivački region sa specifičnim sekvencama koje regulišu ekspresiju gena usled delovanja EGF, bFGF, tumor-promotora TPA, onkoproteina c-Ha-ras i c-jun (249) (250). Takođe je ustanovljeno i da između pozicija -338 i -332 postoji element odgovora na delovanje proteina aktivacije AP-1, usled čega se transkripcija gena za pS2 može izazvati i pomoću IGF-1 (251). Između pozicija -12 i -7 je identifikovana i sekvenca koji sadrži puno guanina i citozina, koja interaguje sa transkripcionim faktorom Sp1 i koja reguliše efikasnost transkripcije gena sa različitim promotora (252).

Istraživanja su pokazala da gen za pS2 sadrži 2 mesta za početak transkripcije, označena kao pS2B1 i pS2B2. Sa obzirom na to da je u MCF-7 ćelijskoj liniji karcinoma dojke detektovan molekul iRNK koji odgovara mestu za početak transkripcije označenom kao pS2B1, pretpostavlja se da je, uglavnom, aktivno samo jedno od ta dva mesta (253).

1.5.2.2. Regulacija transkripcije gena za pS2

Struktura histona⁹ i aktivnost brojnih transkripcionih faktora, koji su povezani sa promotorom gena za pS2, zajedničkim delovanjem regulišu nivo transkripcije ovog gena (254). Pretpostavlja se da preuređenje histona reguliše ekspresiju gena za pS2 putem 2 mehanizma:

- I) putem direktnog preuređenja strukture hromatina, tako da mesta na kojima se transkripcioni faktori vezuju za DNK postanu dostupna;
- II) putem stvaranja nove površine za specifično vezivanje proteina koji regulišu strukturu hromatina i transkripciju;

Poznato je da estrogen, koji deluje preko nuklearnih receptora ER- α i ER- β (255), i faktori rasta (IGF-1, IGF-2, EGF, TGF- α), čije je dejstvo posredovano transmembranskim receptorima tirozin-kinaze (256), kontrolišu ekspresiju različitih gena i proliferaciju ćelija karcinoma dojke.

U klasičnom modelu delovanja ER, receptor se vezuje kao homodimer (257) ili kao heterodimer (258) za ERE, u okviru promotora gena koji odgovaraju na delovanje estrogena (249). Kada je prisutan na promotoru takvih gena, ER vezuje za sebe grupu transkripcionih kofaktora, u kojoj mogu biti i koaktivatori i korepresori transkripcije gena (259). Kofaktori poseduju aktivnost za preuređenje hromatina, pa se dostupnosti vezivnih mesta za transkripcione faktore u nativnom hromatinu može izmeniti, a, pored toga, kofaktori interaguju sa drugim transkripcionim faktorima, uključujući komponente opšteg transkripcionog mehanizma (259-260). Posredstvom klasičnog signalnog puta ER, estrogen indukuje brzu promenu hromatina u okviru promotora gena za pS2 u karcinomu dojke i direktno aktivira transkripciju jedne kopije gena za pS2 (248). Na taj način se indukuje iRNK pS2, što rezultira povećanom koncentracijom iRNK i izlučenog proteina, putem mehanizma koji je nezavisan od *de novo* sinteze proteina (239-240, 261).

ER može da bude aktiviran i nezavisno od vezivanja liganda, odnosno pomoću faktora rasta (262). Pri tome, ER reguliše transkripciju gena za pS2 putem indirektno interakcije sa DNK, odnosno interakcijom sa drugim transkripcionim faktorima. Rezultati studija pokazuju da je za aktivaciju transkripcije gena za pS2, koja ne zavisi od estrogena, neophodno prisustvo kompleksa AP-1 na promotoru gena (263). Da bi došlo do pune interakcije između 2 transkripciona faktora, nakon stimulacije pomoću IGF-1, potrebni su elementi odgovora i na delovanje AP-1 i na delovanje ER (TRE i ERE, respektivno) (263). Iako ER i kompleks AP-1 deluju zajednički tokom aktivacije transkripcije, oni imaju različite funkcije. Kompleks AP-1 se sastoji od različitih kombinacija Jun (c-Jun, JunB, JunD) i Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB)

⁹ Histoni predstavljaju glavne proteinske komponente hromatina oko kojih se namotavaju molekuli DNK i formiraju osnovne strukturne jedinice hromatina, nukleozome.

proteina, pri čemu različite kombinacije hetero- i homodimera određuju koji geni će biti regulisani posredstvom AP-1 (264). Po vezivanju za promotor gena za pS2, tačnije za TRE sekvencu, AP-1 vezuje faktor za preuređivanje (Brg1) i indukuje preuređenje strukture hromatina (263). ER nema nikakvu ulogu u preuređenju hromatina, koje prethodi započinjanju transkripcije gena, već je uključen u kasnije korake transkripcije. Povećanje koncentracije c-Jun proteina i njegova fosforilacija omogućavaju da se veći broj molekula ER, preko interakcije sa AP-1, veže za ERE sekvencu. Na taj način, ER može da privuče i veže koaktivatore i zadrži visok nivo transkripcije gena za pS2.

Značajno je istraživanje Oduroa i sar. (254) koje je dovelo do pretpostavke da visok stepen modifikacija histona može da nadvlada delovanje ER u regulisanju ekspresije gena za pS2 i da omogući intenzivnije vezivanje drugih transkripcionih faktora, što dovodi do visoke konstitutivne transkripcije. Ovakva regulacija transkripcije može da ima važne posledice za patologiju karcinoma dojke imajući u vidu čest gubitak zavisnost ekspresije gena i proliferacije ćelija od delovanja estrogena. Veliki broj modifikacija histona u genomu bi, u slučaju gena koji su regulisani posredstvom ER, moglo da doprinese signalnim putevima koji dovode do razvoja hormon-nezavisnih karcinoma dojke.

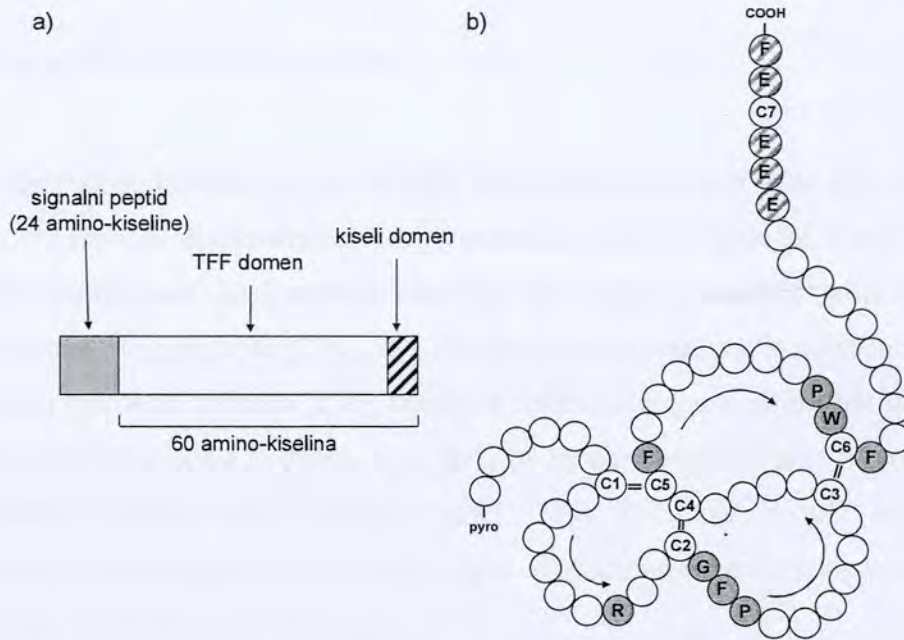
Pored regulacije na genskom nivou, ekspresija pS2 je, takođe, zavisna i od epigenetskih faktora. Na promotoru gena za pS2 je prisutno nekoliko CpG ostrva¹⁰ (265). Pretpostavlja se da je metilacija CpG ostrva, koja se nalaze unutar 5' regiona gena za pS2, uključena u kontrolu ekspresije gena (265).

1. 5. 3. Struktura proteina pS2

Humani gen za pS2 kodira iRNK od 600 baza (239) koja se translira u mali prekurzorski protein od 84 amino-kiseline, sa molekulskom masom od 9,14 kDa (240). Prisustvo N-terminalne glutaminske kiseline ukazuje na to da prekurzorski protein sadrži signalni peptid, koji je karakterističan za sekretorne proteine i koji se oslobađa nakon delovanja signalne peptidaze (240). Nakon obrade, prekurzorski protein se cepa do polipeptida od 60 amino-kiselina (6,4 kDa) kojeg luče ćelije humanog karcinoma dojke i normalne ćelije sluzokože želudca (248), slika 1.6..

Izlučena, zrela forma proteina pS2 sadrži ostatak piro-glutaminske kiseline na N-terminalnom kraju, detelinasti (TFF) domen u središnjem delu molekula i kiseli domen na C-terminalnom kraju (248). Detelinasti domen sadrži 39 amino-kiselinskih ostataka, uključujući 6

¹⁰ CpG ostrvo je genomski region, dužine tipično 300 - 3 000 baznih parova, koji ima visok sadržaj dinukleotida citozin-guanin i tipično je prisutan na ili u blizini mesta za početak transkripcije gena.



Slika 1.6. - Prikaz strukture proteina pS2/TTF1: a) primarna struktura proteina pS2/TTF1 sa naznačenim signalnim peptidom, TFF domenom i kiselim domenom; b) Dvodimenziona struktura u obliku deteline. Konzervirane amino-kiseline su označene latiničnim slovima. C1-C6 i sivi krugovi predstavljaju amino-kiseline u okviru TFF domena. C7 i šrafirani krugovi predstavljaju amino-kiseline u okviru kiselog domena. = ukazuje na di-sulfidne veze između amino-kiselinskih ostataka.

cisteinskih ostataka koji formiraju karakterističnu strukturu sa di-sulfidnim petljama, nalik detelini sa 3 lista, pri čemu di-sulfidi povezuju cisteine 1 i 5, 2 i 4 i 3 i 6 (266). Pored cisteina, detelinasti domen sadrži i druge očuvane amino-kiselinske ostatake. Uočeno je da je su detelinasti proteini otporni na povišenu temperaturu, kao i na proteinaze koje su prisutne u gastrointestinalnom traktu (267). Smatra se da su ove osobine rezultat kompaktne strukture detelinastog domena. Kiseli domen čini 6 amino-kiselinskih ostataka na C-terminalnom kraju proteina. Ovaj domen je važan za homodimerizaciju pS2 (268).

Amino-kiselinska sekvenca pS2 ima sličnosti sa sekvencom spazmolitičkog polipeptida svinjskog pankreasa (pSP) i sa sekvencom IGF-1 i IGF-2 (266, 269). Sekundarna struktura pS2 se sastoji od β -ploča, heliksa i nasumičnog kalema, koji se nalazi između pozicija 53 i 60 (269). Elementi sekundarne strukture pS2 su veoma slični onima koji su nađeni u domenima proteina pSP i pretpostavka je da će domeni imati sličnu i tercijernu strukturu (269). Članovi familije detelinastih proteina sadrže do 6 detelinastih domena, pri čemu pS2 sadrži jedan takav domen (240). Protein pS2 postoji kao monomer i stvara dimere koji su povezani pomoću di-sulfida, preko cisteina na poziciji 58.

1. 5. 4. Ekspresija pS2

1.5.4.1. Ekspresija pS2 u normalnim tkivima

Analizom normalnog humanog tkiva odraslih osoba ustanovljeno je da se pS2 eksprimira u želudcu, gde su detektovane visoke koncentracije proteina, dok u tkivu dojke, kao i u materici, mišićima, plućima, bubrezima, jetri, mozgu, crevima, srcu, koži i pankreasu nisu detektovane značajne koncentracije ovog proteina (270-271). Detaljnijim ispitivanjima je utvrđeno da je pS2, pretežno, prisutan u sluzokoži želuca (272), tačnije u epitelnim ćelijama sluzokože gornjeg dela želuca, u oblasti gde ćelije podležu diferencijaciji da bi dovele do obnavljanje oštećenog tkiva, odnosno do nastanka funkcionalne sluzokože (243, 272). Pri tome je pS2 detektovan u citoplazmi ćelija koje ekspimiraju ovaj protein, gde se akumulirao u peri-nuklearnom prostoru, između unutrašnje i spoljašnje membrane jedra (272).

1.5.4.2. Ekspresija pS2 u patološkim tkivima

Klinička istraživanja su pokazala da se pS2 ektopično¹¹ eksprimira u toku oboljenja koja se odnose na čitav humani gastrointestinalni trakt, pri čemu je prisustvo proteina bilo detektovano u regenerativnom tkivu (272-273). Utvrđeno je da je pS2 ektopično ekspimiran i u brojnim humanim, primarnim karcinomima, kao i u njihovim metastazama (274). pS2 je detektovan u karcinomima dojke (275), pankreasa (276), debelog creva (276), pluća (277), mokraćne bešike (274), prostate (278) i jajnika (276), što pokazuje da se pS2 prvenstveno eksprimira u karcinomima koji su povezani sa gastrointestinalnim traktom i endokrinim organima. Pri tome, prisustvo proteina je bilo detektovano u citoplazmi epitelnih ćelija malignih tumora, kao što je to slučaj i u normalnim ćelijama želuca (272).

Ekspresija pS2 je detektovana u 30-70 % primarnih karcinoma dojke, u zavisnosti od studija i metoda koje su u njima korišćene (279). Upotrebom specifičnih antitela, usmerenih prema proteinu pS2 (280), ustanovljeno je da se pS2 pretežno eksprimira u primarnim karcinomima dojke koji su okarakterisani pozitivnim statusom ER (275). U humanom gastrointestinalnom tkivu, koje normalno eksprimira visoke koncentracije pS2, je uočeno da maligne epitelne ćelije mogu da budu lišene prisustva pS2 (276, 281), tj. da malignitet može da dovede do gubitka ekspresije pS2. Mehanizam koji je uključen u ovaj proces nije poznat.

¹¹ Ektopična ekspresija je ekspresija gena na neuobičajenom mestu u organizmu. Može biti uzrokovana bolešću ili izazvana veštačkim putem.

1. 5. 5. Funkcija pS2

1.5.5.1. Funkcija pS2 vezana za ćelijsku pokretljivost

Kada nastane oštećenje sluzokože gastrointestinalnog trakta, epitelne ćelije u okruženju migriraju ka oštećenom mestu da bi se ponovo uspostavila celovitost epitelnog tkiva. Na osnovu eksperimenata sa životinjama, pretpostavljeno je da detelinasti proteini mogu da regulišu migraciju ćelija i pokazano je da pS2 može da utiče i na pokretljivost malignih ćelija (282), što je biološki aspekt direktno povezan sa agresivnošću tumora i pretpostavljeno je da pS2 ima ulogu u rasejavanju tumora (283). Rezultati studija ukazuju da su detelinasti proteini uključeni u obnavljanje epitela gastrointesinalnog trakta preko mitogene funkcije, u okviru signalnog puta koji je nezavisan od TGF- β (284).

1.5.5.2. Funkcija pS2 u polimerizaciji sluzokože

U sluzokoži želudca i creva su nađene visoke koncentracije pS2 koje sugerišu moguću ulogu u zaštiti od delovanja proteaza (270). Neke studije su ukazale na to da je pS2, kao sastojak želudačnog soka, uključen u polimerizaciju proteina mukusa¹², odnosno u stabilizaciju fizičkih osobina i održavanju celovitosti mucinoznog sloja koji prekriva epitel čitavog gastrointestinalnog trakta (270, 285).

1.5.5.3. Funkcija pS2 u proliferaciji/diferencijaciji ćelije

Sa obzirom na ektopičnu ekspresiju pS2 u većini humanih karcinoma, prvobitno je bilo pretpostavljeno da ovaj protein ima funkciju faktora rasta (240, 266, 270). Pretpostavka je bila podržana činjenicom da je to mali molekul koji pokazuje strukturne sličnosti sa drugim faktorima rasta, kao što su EGF, IGF-1 i IGF-2 (270). Uprkos brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama, nije dokazano da pS2 potpomaže proliferaciju, odnosno rast epitelnih ćelija bilo kancera gastrointestinalnog trakta bilo karcinoma dojke (284, 286). Naprotiv, pokazano je da pS2 ima anti-proliferativnu funkciju (287). Na osnovu *in vitro* i *in vivo* studija, pretpostavljena je funkcija pS2 kao tumor-supresor gena (276). Naime, odsustvo pS2 dovodi do intenzivne proliferacije i nepotpune diferencijacije epitelnih ćelija gastrointestinalnog trakta što pokazuje da

¹² U kičmenjacima, mukus je sluzava izlučevina koja sadrži različite proteine i neorganske soli, a koju stvaraju i kojom su pokrivene mukozne membrane.

pS2 može da bude uključen u proces zaustavljanja rasta ćelije i/ili proces rane diferencijacije (276, 281, 288).

Pored toga, pokazano je da pS2 ne indukuje apoptozu, kao što bi se očekivalo za tumor-supresor gen, već naprotiv, da ima sposobnost da spreči apoptozu koja je indukovana pomoću hemijskih agenasa ili Bad proteina u ćelijama gastrointestinalnog trakta (287). Pri tome je anti-apoptotska funkcija pS2 nezavisna od stimulansa apoptoze jer je usmerena ka aktivnoj izoformi kaspaze-9.

1.5.5.4. Funkcija pS2 kao neuropeptida

Pretpostavljeno je, takođe, da je pS2, slično većini drugih gastrointestinalnih peptida, neuropeptid sa obzirom na to da je detektovan u mozgu pacova i miša (289).

1. 5. 6. pS2 kao faktor prognoze/predikcije toka bolesti

Kao odgovor na delovanje estrogenog stimulansa na ćelije karcinoma dojke, detektovana je ekspresija pS2 (239), što je dovelo do pretpostavki da bi pS2 mogao biti gen/protein od kliničkog značaja. Poznato je da se pS2 eksprimira u 30-70 % karcinoma dojke. Poznato je i da se pS2 eksprimira u okviru metastaza u limfnim čvorovima, mozgu, kostima (356), a koje potiču od karcinoma dojke, tako da u slučaju karcinoma dojke postoji interesovanje za pS2, u smislu kliničkog značaja. Na osnovu eksperimentalnih nalaza i humanih studija je moguće pretpostaviti da pS2 može da bude koristan kao dijagnostički, prognostički i/ili terapijski faktor i u drugim malignim tumorima, kao i u patologiji gastrointestinalnog trakta.

Iako postoje kontraverze koje se odnose na povezanost ekspresije pS2 i ishoda bolesti pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke, u brojnim studijama je utvrđeno da pS2, odnosno njegova koncentracija u karcinomu dojke, ima značajnu prognostičku vrednost. Preliminarni rezultati studija su ukazali na to da je pozitivan status pS2 uglavnom povezan sa uzorcima karcinoma dojke u kojima je eksprimiran ER (276, 320). U većini studija je utvrđeno da je visoka koncentracija pS2, time i pozitivan status proteina, u karcinomu dojke direktno povezana sa povoljnijim tokom bolesti (304, 309, 322). U skladu sa tim rezultatima su i nalazi studija prema kojima niska koncentracija, odnosno negativan status pS2 ima prognostički značaj za pacijentkinje sa karcinomom dojke jer je utvrđeno da je negativan status pS2 povezan sa nepovoljnom prognozom toka bolesti u grupi pacijenata sa ER+/PR+ tumorima (290) i u grupi

pacijenata sa negativnim statusom limfnih čvorova (347). Prognostički značaj pS2 se nije uvek održao u okviru multivarijantne analize, što je zavisilo od parametara koji su bili obuhvaćeni analizom (313). U većini studija u kojima je za određivanje koncentracije pS2 korišćen esej sa citosolom, pacijentkinje sa pozitivnim statusom pS2 u karcinomima dojke su, i u okviru multivarijantne analize, imale povoljniju prognozu toka bolesti (291-292). Međutim, postoje i studije u kojima nije nađena povezanost između statusa pS2 i toka bolesti pacijenata, odnosno nije dokazan prognostički značaj pS2 i to su, uglavnom, studije u kojima je za određivanje ekspresije pS2 u tumorima dojke korišćena imunohistohemijska metoda (293-294).

Rezultati više studija su ukazali na mogućnost da je ekspresija pS2 u karcinomu dojke koristan faktor za predviđanje odgovora pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke na delovanje adjuvantne endokrine terapije (314, 384). Pored prediktivne vrednosti ekspresije proteina, u nekim studijama je i ekspresija iRNK pS2 omogućila predviđanje odgovora na adjuvantnu endokrinu terapiju (295). Prezentovani su rezultati koji su pokazali da je visoka koncentracija pS2 direktno povezana sa povoljnim odgovorom pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke na endokrinu terapiju (290, 296-297). U skladu sa tim nalazima, rezultati nekih studija su pokazali da su pacijentkinje obolele od karcinoma dojke, čiji tumori nisu eksprimirali pS2, imale kraći period trajanja odgovora na hormonsku terapiju i kraće preživljavanje nakon primene endokrine terapije (290, 298). Dosta se diskutovalo o tome da će estrogen-osetljivi tumori dojke eksprimirati i PR i pS2, zbog čega bi određivanje ekspresija oba proteina bilo suvišno. No, studije su pokazale da se na osnovu ekspresije pS2 mogu izdvojiti podgrupe pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke koje pokazuju različite odgovore na adjuvantne endokrine terapije i da prisustvo pS2 može da identifikuje one pacijentkinje za koje će se dobiti povoljan odgovor na anti-hormonsku terapiju, čak i u odsustvu ER ili PR (271, 290, 299). Iako ER, i ponekad PR, mogu biti superiorniji u odnosu na pS2 za predviđanje dužine trajanja i ukupnog odgovora na adjuvantnu hormonsku terapiju, u jednoj studiji je ustanovljeno, multivarijantnom analizom (ER, PR, pS2), da je i pS2, uz ER, imao prediktivnu vrednost za odgovor na adjuvantnu hormonsku terapiju, te je pretpostavljeno da pS2 može da pomogne u definisanju podgrupa pacijentkinja sa intermedijarnim koncentracija ER koje će verovatno odgovoriti na delovanje adjuvantne hormonske terapije (275, 300).

I u slučaju pS2 treba naglasiti da dosadašnje studije o prognostičkoj/prediktivnoj vrednosti ovog proteina nisu ispitivale relevantnost biomarkera tokom perioda praćenja toka bolesti.

2. CILJ RADA

Primarni cilj ovog rada je bio:

- da se, na osnovu povezanosti ekspresije katepsina D, odnosno pS2 sa klasičnim i biohemijskim faktorima prognoze/predikcije toka bolesti, odredi granična vrednost za ekspresiju katepsina D, odnosno za ekspresiju pS2 na osnovu koje bi bilo moguće definisati estrogen-zavisnu vs. estrogen-nezavisne ekspresije, odnosno status proteina u primarnom malignom tumoru dojke.

Sekundarni cilj ovog rada je bio:

- da se, u zavisnosti od statusa katepsina D, odnosno pS2 u malignom tumoru dojke, identifikuju grupe pacijenata sa niskim/visokim rizikom za ponovnu pojavu bolesti, definisanu pojavom udaljenih metastaza.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Pacijentkinje sa primarnim operabilnim karcinomom dojke

Studijom je bilo obuhvaćeno 226 pacijentkinja sa primarnim operabilnim karcinomom dojke. Sve pacijentkinje su operisane na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, u Beogradu. Reprerentativnost uzorka je planirana po principu "sistematskog uzorka". Parametri tumora su

Tabela 3.1. - Raspodela pacijentkinja po grupama definisanim parametrima domaćina tumora, tumora, statusom ER i/ili statusom PR.

Karakteristike pacijentkinja i tumora	Broj pacijentkinja	(%)
Ukupno	226	100
Godine		
< 45	39	17,3
45 - 59	96	42,5
>59	91	40,4
Status menopauze		
Pre-menopauza	77	34,1
Post-menopauza	144	63,7
Nepoznato	5	2,2
Status limfnih čvorova		
N0	92	40,7
N+	112	49,6
Nepoznato	22	9,7
Veličina tumora		
T1	100	44,2
T2	122	54
Nepoznato	4	1,8
Histološki gradus		
I	33	14,6
II	146	64,6
III	43	19
Nepoznato	4	1,8
Histološki tip		
IDC	112	49,6
ILC	80	35,4
Ostali	34	15
Status ER		
ER+	153	67,7
ER-	73	32,3
Status PR		
PR+	102	45,1
PR-	124	54,9
Kombinovani status ER i PR		
ER+ PR+	92	40,7
ER+ PR-	61	27
ER- PR+	10	4,4
ER- PR-	73	32,3

određivani od strane histopatologa, dok su podaci o domaćinu tumora bili dostupni na osnovu istorija bolesti pacijentkinja. U tabeli 3.1. je prikazan broj pacijentkinja u grupama koje su bile definisane na osnovu parametara domaćina tumora, tumora, statusa ER i/ili statusa PR. Treba napomenuti da su godine i status menopauze domaćina tumora bili međusobno povezani (χ^2 -test, $p < 0,001$) usled toga što su sve pacijentkinje mlađe od 45 godina bile premenopauzne, sve starije od 59 godina su bile postmenopauzne, dok su pacijentkinje srednje dobi bile pre- i postmenopauzne. Pored toga, veličina tumora je bila direktno povezana sa statusom limfnih čvorova (χ^2 -test, $p = 0,04$) jer je većina pacijentkinja sa pT1 tumorima imala negativan, a većina pacijentkinja sa pT2 tumorima pozitivan status limfnih čvorova.

Podaci vezani za tok bolesti pacijentkinja, u okviru perioda praćenja toka bolesti od 36 meseci, su bili dostupni za 201 pacijentkinju, među kojima je bila 41 pacijentkinja (20%) kod koje je potvrđeno prisustvo udaljenih metastaza, odnosno 140 pacijentkinja koje nisu imale udaljene metastaze u periodu praćenja toka bolesti. Pri tome, 20 pacijentkinja nije ispunjavalo kriterijume vezane za praćenje toka bolesti u periodu od 36 meseci, tako da ove pacijentkinje nisu uzete u obzir pri analizi verovatnoća za DFI.

3. 2. Određivanje koncentracija ER i PR - biohemijska metoda

Koncentracije steroidnih receptora, ER i PR, u tkivu karcinoma dojke su određivane biohemijskom metodom na osnovu stavova i preporuka EORTC (skr. od *eng. European Organization for Research and Treatment of Cancer*) (301). Metoda se bazira na vezivanju molekula estrogena i progesterona, obeleženih tricijumom (^3H), za molekule odgovarajućih receptora koji su prisutni u citosolnom ekstraktu tkiva karcinoma dojke. Ovom metodom mogu se detektovati samo slobodni receptori, tj. oni receptori za koje nisu vezani endogeni hormon. Biohemijska metoda za određivanje koncentracija steroidnih receptora obuhvata sledeće postupke:

- 1.) uzimanje i čuvanje uzoraka karcinoma dojke,
- 2.) homogenizaciju tkiva i izdvajanje frakcije citosola malignih ćelija,
- 3.) izbor hormona i izbor opsega koncentracije hormona,
- 4.) vezivanje hormona za receptore prisutne u citosolnom ekstraktu malignih ćelija,
- 5.) odvajanje viška nevezanog hormona,
- 6.) određivanje radioaktivnosti u β -scintilacionom brojaču,
- 7.) određivanje koncentracije proteina u uzorku,
- 8.) izračunavanje koncentracije ER i PR;

Pravilno uzimanje uzorka tumorskog tkiva, kao i njegovo čuvanje (302), je važno sa stanovišta istovremenog određivanja koncentracija različitih biomarkera u citosolnom ekstraktu tkiva karcinoma dojke. Neposredno po hirurškom odstranjenju tumora iz dojke, histopatolog izdvaja reprezentativni uzorak malignog tkiva, mase od 200 mg do 1 g, za određivanje koncentracije steroidnih receptora. Tkivo karcinoma dojke se čuva u tečnom azotu (-196°C) do trenutka određivanja koncentracije steroidnih receptora, sa obzirom da je utvrđeno da se u uzorcima tumora, koji su čuvani na ovaj način, kvantitativni sadržaj receptora za estrogen ne menja tokom vremena (303).

Pokazano je da je najefikasniji način za homogenizaciju uzorka tkiva karcinoma dojke sprasivanje uzorka, zaleđenog u tečnom azotu, koje se izvodi na temperaturi ledenog kupatila ($0-4^{\circ}\text{C}$) (13). Spraseni uzorak se homogenizuje u puferu, na temperaturi ledenog kupatila, u cilju dobijanja suspenzije. Prilikom određivanja koncentracija steroidnih receptora, preporučuje se korišćenje fosfatnog pufer sledećeg sastava: 5 mM fosfatni pufer, 10 % (v/v) glicerol, 1 mM monotioglicerol, 1,18 mM EDTA, pri $\text{pH} = 7,4 - 7,7$ (13, 301). Suspenzija se centrifugira na 800-1000 g (oko 3 500 obr/min), u toku 30 min, na temperaturi ledenog kupatila. Dobijeni supernatant predstavlja neprečišćenu frakciju citosola ćelija tumora. Nakon ultracentrifugiranja supernatanta na 100 000 g (37 000 obr/min, ultracentrifuga Beckman L5-50), u toku 60 min, na temperaturi ledenog kupatila, u supernatantu se izdvaja citosolna frakcija ćelija tumora.

U svrhu određivanja koncentracije ER korišćen je $17\text{-}\beta\text{-estradiol}$ (Amersham, Engleska), obeležen tricijumom, specifične aktivnosti 90 Ci/mmol (3,5 TBq/mmol). Kao kompetitivni hormon korišćen je sintetički estrogen, dietilstilbestrol. Pri određivanju koncentracije ER je potrebno da koncentracije "obeleženog" estrogena u ispitivanom uzorku budu u opsegu $2\text{-}32 \times 10^{-10}$ M, odnosno da koncentracije "neobeleženog" estrogena budu u opsegu $2\text{-}32 \times 10^{-8}$ M (302). Koncentracija PR je određivana u prisustvu sintetičkog progesterona ORG 2058 (Amersham, Engleska), obeleženog tricijumom, specifične aktivnosti 40 Ci/mmol (1,5 TBq/mmol). "Neobeleženi" progesteron, ORG 2058, je korišćen kao konkurentni hormon. Pri određivanju koncentracije PR je potrebno da koncentracije "obeleženog" progesterona u ispitivanom uzorku budu u opseg $4\text{-}64 \times 10^{-10}$ M, odnosno da koncentracije "neobeleženog" progesterona budu u opsegu $8\text{-}128 \times 10^{-8}$ M u ispitivanom uzorku (302). Izbor hormona-liganda mora da zadovolji dva neophodna uslova za određivanje koncentracija receptora za estrogen i receptora za progesteron. Prvi uslov je da hormon ima malu vrednost konstante disocijacije za reakciju hormona sa odgovarajućim receptorom, a drugi uslov je da hormon pokazuje specifičnost u pogledu biofunkcionalnosti. Navedeni opseg koncentracija hormona-liganda, u okviru konstanti disocijacija kompleksa hormona i njegovog receptora, omogućava određivanje koncentracije receptora u citosolnom ekstraktu ćelija malignog tumora dojke.

Citosol ćelija tumora dojke sadrži proteine sa visokim afinitetom vezivanja (ER i PR, $K_d < 1$ nM) i proteine sa niskim afinitetom vezivanja ($K_d > 30$ nM) za steroidne hormone (304-305). Ukupno vezivanje hormona (B_T) predstavlja vezivanje hormona kako za proteine sa visokim, tako i za proteine sa niskim afinitetom vezivanja. Nespecifično vezivanje hormona predstavlja vezivanje hormona za proteine koji imaju nizak afinitet vezivanja. Određivanje ukupnog i nespecifičnog vezivanja hormona zasniva se na kompetitivnoj inhibiciji, odnosno na međusobno isključivom vezivanju „obežženog“ ili „neobežženog“ hormona za molekule receptora. Razlika između ukupnog i nespecifičnog vezivanja hormona predstavlja specifično vezivanje hormona za odgovarajući receptor (B_S). Koncentracija „obežženog“ hormona, koji je nakon uspostavljanja ravnoteže ostao slobodan u rastvoru (F), može se odrediti jednostavnim oduzimanjem koncentracije ukupno-vezanog „obežženog“ hormona (B_T) od početne koncentracije „obežženog“ hormona (T). Uslovi koji moraju da budu zadovoljeni pri interakciji hormona i proteina u citosolu ćelija malignog tumora dojke se odnose na očuvanje biofunkcionalnosti receptora i omogućavanje uspostavljanja dinamičke ravnoteže između hormona, receptora i kompleksa hormon-receptor (302). Reakcija između ER, odnosno PR, i odgovarajućeg steroidnog hormona se izvodi na temperaturi ledenog kupatila, a vreme interakcije obuhvata interval od 18 do 24 sata jer je pokazano da je reakcija između estradiola i njegovog receptora zavisna od temperature i vremena (302).

Za razdvajanje molekula hormona vezanih za receptore od slobodnih molekula hormona se, po uspostavljanju ravnoteže između reaktanata i nastalih proizvoda, koristi aktivni ugalj (0,25 % norit A, Sigma, Nemačka) koji se oblaže šećerom (0,0025 % dekstran T-70, Pharmacia, Švedska) (306). Razdvajanje se zasniva na fizičko-hemijskoj adsorpciji slobodnih molekula hormona na čvrstoj fazi uglja. Aktivni ugalj se oblaže dekstranom da bi se sprečio pristup velikih molekula površini aktivnog uglja, odnosno da bi se dozvolilo samo malim molekulima da se adsorbuju. Adsorpcija slobodnih molekula hormona se dešava na temperaturi ledenog kupatila, u trajanju od 30 minuta, u 0,01 M TRIS puferu, pri pH 8, uz povremeno mešanje (13, 305). Taloženje aktivnog uglja, na kome je adsorbovan nevezani hormon, se postiže centrifugiranjem na 2000-3000 g (oko 3 500 obr/min), u toku 30 min, na temperaturi ledenog kupatila (302). U supernatantu ostaje hormon vezan za odgovarajući receptor.

Radioaktivnost uzorka se meri u alikvotu supernatanta, u scintilacionoj tečnosti (0,4 % PPO i 0,005 % POPOP rastvoreni u toluolu), pomoću β -scintilacionog brojača (Beckman LS 7000). Istovremeno se meri i početna radioaktivnost dodatog „obežženog“ hormona (T). Izmerenu relativnu aktivnost uzorka, izraženu kao broj detektovanih raspada u minuti (cpm - skr. od *eng. counts per minute*), je potrebno podeliti sa efikasnošću β -scintilacionog brojača, koja je bila između 0,45 i 0,6, da bi se odredila apsolutna aktivnost, izražena kao broj raspada u minuti

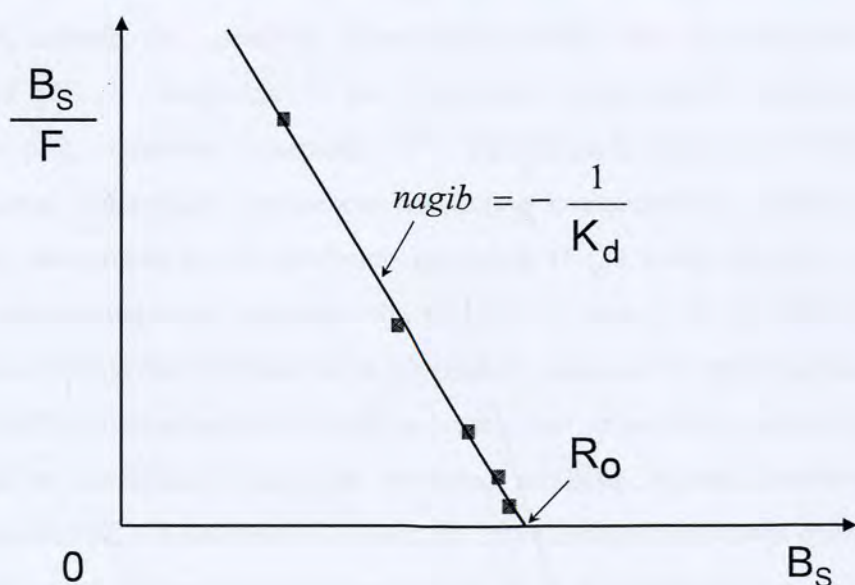
(dpm - skr. od *eng. desintegrations per minute*). Efikasnost brojača, tj. odnos broja raspada koje su detektovani pomoću brojača i broja raspada koji su se stvarno dogodili, se određuje na osnovu kalibracione krive za brojač koja se periodično određuje, korišćenjem radioaktivnih standarda koje isporučuje proizvođač β -scintilacionog brojača.

Koncentracija ukupnih proteina u citosolnom ekstraktu je određivana metodom po *Lowry-u* (307). Ova mikrometoda se bazira na dve hemijske reakcije: biuretskoj reakciji proteina sa jonom bakra u baznoj sredini i redukciji fosfo-molibdenskog-fosfo-volframovog reagensa (Folin-Ciocalteu-ev fenolni reagens) tirozinom i triptofanom prisutnim u citosolnom ekstraktu. Apsorbancija je merena spektrofotometrom (Boewe, Nemačka) na talasnoj dužini od 660 nm. Prilikom svakog merenja koncentracije ukupnih proteina u uzorcima, konstruisana je kalibraciona kriva za određivanje koncentracije proteina korišćenjem vodenih rastvora sa različitim koncentracijama goveđeg seruma albumina (BSA). Vrednosti koncentracije proteina u uzorcima, koje su bile očitane sa kalibracione krive, na osnovu izmerenih vrednosti apsorbancije, su bile korigovane za korišćena razblaženja i izražene u mg/ml.

Kada su poznate ravnotežne koncentracije slobodnog "obeženo" (F) i specifično-vezanog "obeženo" (B_s) hormona, pomoću *Scatchard-ove* jednačine (308):

$$\frac{B_s}{F} = -\frac{1}{K_d} B_s + \frac{R_0}{K_d}$$

se može odrediti koncentracija receptora za steroidni hormon (R_0) i konstanta disocijacije (K_d). Grafičkim predstavljanjem *Scatchard-ove* jednačine dobija se linearna zavisnost (slika 3.1.).



Slika 3.1. - Grafički prikaz *Scatchard-ove* jednačine

Ekstrapolacijom dobijene prave za uslov $BS/F=0$, odnosno iz preseka prave sa apscisom, može se odrediti ukupna koncentracija steroidnih receptora R_0 , dok se konstanta disocijacije K_d može odrediti iz nagiba prave kao negativna recipročna vrednost nagiba prave. Relativna greška određivanja je bila manja od 5% ($\delta < 0,05$). Koncentracija steroidnog receptora, određena na opisan način, je izražena u fmol/ml i potrebno je dobijenu vrednost podeliti sa koncentracijom ukupnih proteina da bi se dobila koncentracija steroidnog receptor izražena u fmol/mg ukupnih proteina.

Pokazano je da se, umesto biohemijske metode sa 5 koncentracija hormona, pouzdano može upotrebiti metoda sa jednom, maksimalnom koncentracijom hormona (309). Stoga su, za određivanje koncentracija steroidnih receptora biohemijском metodom sa jednom koncentracijom steroidnog hormona, korišćene maksimalne koncentracije steroidnih hormona koje su navedene u odeljku 3.2., a u skladu sa preporukama EORTC-a. Upotreba samo jedne koncentracije hormona je omogućila da se u citosolnom ekstraktu, istovremeno, odrede i kvantitativni sadržaji katepsina D i pS2.

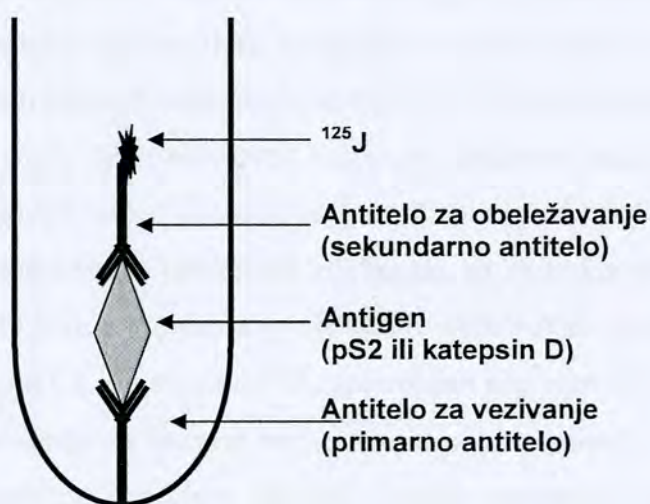
3. 3. Određivanje koncentracija pS2 i katepsina D - imunoradiometrijski esej (IRMA)

Citosolni ekstrakt, koji je bio korišćen za određivanje koncentracija steroidnih receptora biohemijском metodom, je korišćen i za određivanje koncentracija pS2 i katepsina D. Koncentracije pS2 i katepsina D su određivane IRMA metodom, tačnije korišćena je jedna varijanta ove metode, tzv. „sendvič“ imunoradiometrijski esej na čvrstoj fazi. Za određivanje koncentracija pS2 i katepsina D su korišćeni komercijalni kompleti za kvantitativno određivanje pS2, odnosno katepsina D (ELSA-pS2, odnosno ELSA-CATH-D, CIS BioInternational, Francuska). Upotrebom navedenog komercijalnog kompleta za katepsin D je bilo moguće detektovati sve tri izoforme katepsina D (34 kDa, 48 kDa i 52 kDa). Granica detekcije, odnosno najmanja koncentracija različita od nule koju je bilo moguće odrediti sa verovatnoćom 0,95, je bila 20 fmol/ml za katepsin D, odnosno 40 pg/ml za pS2.

„Sendvič“ imunoradiometrijski esej na čvrstoj fazi se zaniva na upotrebi dva monoklonska antitela koja se specifično vezuju za prostorno udaljene regione (epitope) na ispitivanom antigenu (molekul pS2 ili katepsina D). Antitelo za vezivanje predstavlja primarno antitelo, koje je već vezano za dno epruvete (čvrsta faza), i služi da se ispitivani antigen, prisutan u citosolnom ekstraktu, veže za antitelo i, samim tim, za čvrstu fazu. Sekundarno antitelo, tj. antitelo za obeležavanje, je obeleženo radioaktivnim jodom ^{125}J i specifično se vezuje za ispitivani

antigen, koji je već vezan za čvrstu fazu. Na taj način se antigen nalazi u „sendviču“ između primarnog i sekundarnog antitela (slika 3.2.). Nakon ispiranja viška nevezanog sekundarnog antitela, radioaktivnost, koja potiče od ^{125}J vezanog za antigen, se meri pomoću γ -scintilacionog brojača i proporcionalna je koncentraciji antigena vezanog između dva antitela u epruveti.

Preporuka proizvođača navedenih kompleta za IRMA esej je da koncentracija ukupnih proteina u citosolnom ekstraktu bude podešena na vrednost između 1 i 2 mg/ml pre izvođenja eseja. Za potrebe eseja, koji se izvodi na sobnoj temperaturi, kontrolni i ispitivane uzorke za analizu pS2 je potrebno razblažiti sa odgovarajućim rastvaračem u odnosu 1/20, a u slučaju katepsina D je potrebno razblažiti samo ispitivane uzorke u odnosu 1/40 i 1/80. U svaki epruvetu iz komercijalnog kompleta za određivanje je potrebno dodati po 200 μl monoklonskog antitela za pS2 obeleženog sa ^{125}J , odnosno po 300 μl monoklonskog antitela za katepsin D obeleženog



Slika 3.2. - Šematski prikaz principa na kome se zasniva tzv. „sendvič“ imunoradiometrijski esej na čvrstoj fazi. Antitelo za vezivanje (primarno antitelo) je, prethodno, vezano za čvrstu fazu i ono, preko odgovarajućeg regiona (epitopa), specifično vezuje antigen. Antitelo za vezivanje (sekundarno antitelo), koje je obeleženo molekulom radioaktivnog joda 125, se specifično vezuje za antigen preko drugog, prostorno udaljenog epitopa.

sa ^{125}J . Zatim je, u odgovarajuće epruvete, potrebno dodati po 200 μl standarda, razblaženog kontrolnog ili razblaženog ispitivanog uzorka, za analizu pS2, odnosno po 50 μl za analizu katepsina D. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi, u trajanju od 1 sata za analizu pS2, odnosno 3 sata za analizu katepsina D, potrebno je ukloniti višak nevezanog sekundarnog antitela putem nekoliko uzastopnih ispiranja, što predstavlja jedan od kritičnih koraka

Na osnovu izmerenih radioaktivnosti za standarde, moguće je konstruisati standardnu krivu sa koje se mogu odrediti nepoznate koncentracije antigena koje odgovaraju izmerenim aktivnostima uzoraka. Količnik nepoznate koncentracije antigena, izražene u ng/ml za pS2, odnosno u pmol/ml za katepsina D, koje su korigovane za odgovarajuća razblaženja, i ukupne

koncentracije proteina u uzorku, izražene u mg/ml ukupnih proteina, predstavlja koncentraciju antigena izraženu u ng/mg za pS2, odnosno u pmol/mg za katepsina D.

3. 4. Statističke metode za obradu rezultata

Sa obzirom da su vrednosti koncentracija i pS2 i katepsina D bile u širokom opsegu vrednosti, pomoću *Kolmogorov-Smirnov* testa (310) su analizirane raspodele vrednosti koncentracija ova dva molekularna biomarkera da bi se utvrdilo da li one odstupaju, ili ne, od normalne raspodele. Kako je utvrđeno da raspodele vrednosti koncentracija oba molekularna biomarkera statistički značajno odstupaju od normalne raspodele, za obradu rezultata su korišćeni neparametrijski statistički testovi:

- Za upoređivanje vrednosti koncentracija pS2, odnosno katepsina D, u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, tumora, statusom ER i/ili statusom PR je korišćen *Mann-Whitney-ev* U-test (311) ili *Kruskal-Wallis-ov* test (312).
- Upotrebom *Spearman-ovog* testa je određivan rang korelacije kao približna indikacija povezanosti između koncentracija ispitivanih proteina (313).
- Za upoređivanje učestalosti pacijenata sa pozitivnim/negativnim statusom pS2, odnosno katepsina D, u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, tumora, statusom ER i/ili statusom PR, upotrebljen je χ^2 -test (314).
- Verovatnoće za interval bez ponovne pojave bolesti u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, tumora, statusom ER i/ili statusom PR su određivane metodom *Kaplan-a* i *Meier-a* (315), na osnovu poznatog broja pacijentkinja kod kojih je potvrđeno prisustvo udaljenih metastaza, broja meseci nakon hirurške intervencije, za svaku od tih pacijentkinja, posle kojih je došlo do pojave udaljene metastaze, kao i broja pacijentkinja koje nisu imale metastaze, u periodu ukupnog praćenja toka bolesti od 36 meseci.
- Upotrebom tzv. „log-rank“ testa (316), koji je poznat i kao *Mantel-Cox-ov* test, ispitivano je da li se verovatnoće za interval bez ponovnog javljanja bolesti statistički značajno razlikuju između određenih grupa pacijentkinja u datom periodu praćenja toka bolesti.

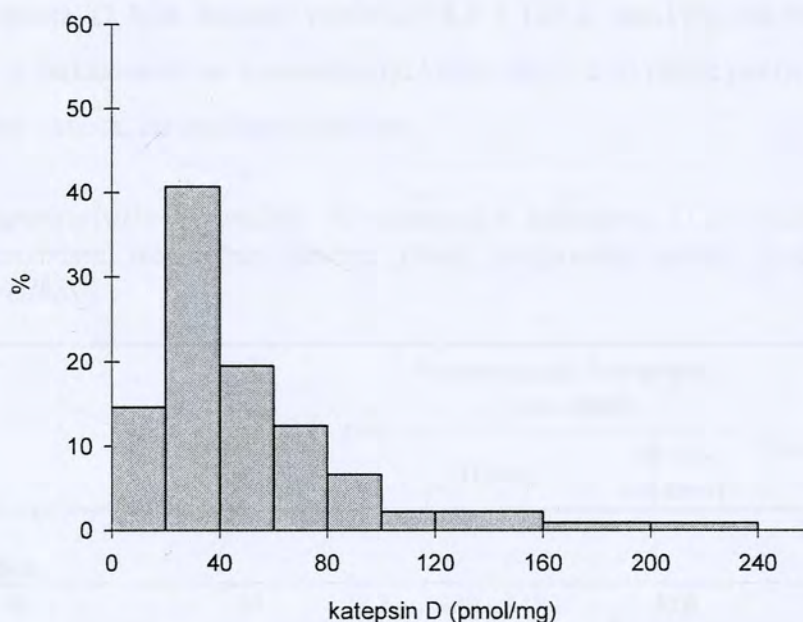
4. REZULTATI

4.1. Raspodela koncentracija

4.1.1. Raspodela koncentracija katepsina D

4.1.1.1. Raspodela učestalosti koncentracija katepsina D

U celoj grupi od 226 pacijentkinjica sa primarnim operabilnim karcinomom dojke, vrednosti koncentracija katepsina D su bile u opsegu od 8,3 do 237,8 pmol/mg, sa medijanom od 37,7 pmol/mg. Raspodela učestalosti koncentracija katepsina D, za 226 pacijentkinja sa primarnim operabilnim karcinomom dojke, je prikazana na slici 4.1..



Slika 4.1. - Raspodela učestalosti koncentracija katepsina D, za 226 pacijentkinja sa primarnim operabilnim karcinomom dojke (Kolmogorov-Smirnov test, $p < 0,001$), u intervalima od 20/40 pmol/mg.

Sa slike 4.1. se može videti da raspodela učestalosti koncentracija katepsina D u tumorima značajno odstupa od normalne raspodele, što to je potvrđeno i pomoću Kolmogorov-Smirnov testa ($p < 0,001$). Stoga su, u toku dalje analize, korišćeni neparametrijski testovi statističke analize.

4.1.1.2. Raspodela koncentracija Katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora

Na osnovu godina domaćina tumora, pacijentkinje su podeljene u tri grupe: a) pacijentkinje mlađe od 45 godina, b) pacijentkinje starosti između 45 i 59 godina i c) pacijentkinje starije od 59 godina, dok su, prema statusu menopauze, podeljene u dve grupe: a) premenopauzne i b) postmenopauzne pacijentkinje. Karakteristike raspodele koncentracija Katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, su prikazane u tabeli 4.1.

Koncentracije Katepsina D, u grupi pacijentkinja mlađih od 45 godina (n=39), su bile u opsegu od 15,4 do 143,2 pmol/mg, sa medijanom od 31,6 pmol/mg. U grupi pacijentkinja srednje dobi (n=96), koncentracije Katepsina D su bile u intervalu od 12,1 do 237,8 pmol/mg, pri čemu je medijana bila 39,4 pmol/mg. Pacijentkinje starije od 59 godina (n=91) su imale tumore u kojima su koncentracije Katepsina D bile između vrednosti 8,3 i 167,8 pmol/mg, sa medijanom od 38,7 pmol/mg. Analiza je pokazala da se koncentracije Katepsina D u tri grupe pacijentkinja, definisanih godinama domaćina tumora, ne razlikuju značajno.

Tabela 4.1. - Karakteristike raspodele koncentracija Katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora (broj pacijenata, opseg vrednosti i medijana koncentracije, p vrednost).

	Broj pacijenata	(%)	Koncentracija Katepsina D (pmol/mg)		p vrednost*
			Opseg	50 % - vrednost	
Godine					
< 45	39	17,2	15,4 - 143,2	31,6	0,3
45 - 59	96	42,5	12,1 - 237,8	39,4	
>59	91	40,3	8,3 - 167,8	38,7	
Status menopauze					
Pre-menopauza	77	34,1	12,1 - 237,8	35,9	0,9
Post-menopauza	144	63,7	8,3 - 207,2	38,8	
Nepoznato	5	2,2	11 - 73,8	26,5	

* Mann-Whitney ili Kruskal-Wallis test

Od ukupnog broja pacijentkinja, njih 77 je bilo definisano kao premenopauzne, a 144 kao postmenopauzne, dok za 5 pacijentkinja nije bio poznat status menopauze. U grupi premenopauznih pacijentkinja, koncentracije Katepsina D su bile u opsegu od 12,1 do 237,8 pmol/mg, pri čemu je medijana bila 35,9 pmol/mg. Za postmenopauzne pacijentkinje, koncentracije Katepsina D su imale

vrednosti između 8,3 i 207,2 pmol/mg. Medijana koncentracija Katepsina D, u ovoj grupi, je bila 38,8 pmol/mg. Koncentracije Katepsina D, u dve grupe definisane statusom menopauze domaćina tumora, se nisu značajno razlikovale.

4.1.1.3. Raspodela koncentracija Katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim parametrima tumora

U tabeli 4.2. su prikazane karakteristike raspodele koncentracija Katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim parametrima tumora. Pacijentkinje su, prema statusu limfnih čvorova, bile svrstane u dve grupe pacijentkinja: a) sa negativnim statusom limfnih čvorova, odnosno bez malignih ćelija u limfnim čvorovima (pN0) i b) sa pozitivnim statusom limfnih čvorova, odnosno sa malignim ćelijama u limfnim čvorovima (pN+). Za 22 pacijentkinje nije bio poznat status limfnih čvorova. Pacijentkinje sa negativnim statusom limfnih čvorova (n=92) su imale koncentracije Katepsina D u intervalu od 8,3 do 132,7 pmol/mg, sa medijanom od 20,3 pmol/mg, dok su one sa pozitivnim statusom limfnih čvorova (n=112) imale koncentracije Katepsina D u intervalu od 12,2 do 237,8 pmol/mg, sa medijanom od 43,2 pmol/mg. Analizom vrednosti koncentracija Katepsina D ustanovljeno je da su se one statistički značajno razlikovale (*Mann-Whitney test*, $p < 0,001$) u dve grupe, pri čemu su koncentracije Katepsina D u grupi pacijentkinja sa pozitivnim statusom limfnih čvorova imale veće vrednosti.

Na osnovu veličine tumora, pacijentkinje su bile svrstane ili u grupu pacijentkinja sa tumorima koji su manji od 2 cm (pT1, n=100) i u grupu pacijentkinja sa tumorima koji su jednaki ili veći od 2 cm (pT2, n=122). Veličina tumora je bila nepoznata za 4 pacijentkinje. Koncentracije Katepsina D su bile između 8,3 i 237,8 pmol/mg, u grupi pacijentkinja sa tumorima manjim od 2 cm, odnosno, između 12,2 i 189,3 pmol/mg, u grupi pacijentkinja sa tumorima jednakim ili većim od 2 cm. Odgovarajuće medijane koncentracija su bile 35 i 39,2 pmol/mg, respektivno. Vrednosti koncentracija Katepsina D, u grupama pacijentkinja definisanih prema veličini tumora, se nisu značajno razlikovale.

Histološki gradus tumora je bio nepoznat za 4 pacijentkinje. Tumori pacijentkinja su bili karakterisani koncentracijama Katepsina D u rasponu od 8,3 do 132,7 pmol/mg (medijana 27,7 pmol/mg), za tumore histološkog gradusa I (n=33), u rasponu od 10,4 do 237,8 pmol/mg (medijana 38,3 pmol/mg), za tumore histološkog gradusa II (n=146), i u rasponu od 12,2 do 167,8 pmol/mg (medijana 43,5 pmol/mg), za tumore histološkog gradusa III (n=43). Vrednosti koncentracija Katepsina D, u grupama pacijentkinja definisanih prema histološkom gradusu tumora, se nisu značajno razlikovale.

Tabela 4.2. – Karakteristike raspodele koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim parametrima tumora (broj pacijenata, opseg vrednosti i medijana koncentracije, p vrednost).

	Broj pacijenata	(%)	Koncentracija katepsina D (pmol/mg)		p vrednost*
			Opseg	50 % - vrednost	
Status limfnih čvorova					
pN0	92	40,7	8,3 - 132,7	30,4	< 0,001
pN+	112	49,6	12,2 - 237,8	43,2	
Nepoznato	22	9,7	10,4 - 131,5	42,2	
Veličina tumora					
pT1	100	44,2	8,3 - 237,8	35	0,4
pT2	122	54	12,2 - 189,3	39,2	
Nepoznato	4	1,8	11 - 78,4	47,2	
Histološki gradus					
I	33	14,6	8,3 - 132,7	27,7	0,2
II	146	64,6	10,4 - 237,8	38,3	
III	43	19	12,2 - 167,8	43,5	
Nepoznato	4	1,8	16,7 - 27,5	24	
Histološki tip					
IDC	112	49,6	10,4 - 237,8	39,6	0,3
ILC	80	35,4	12,8 - 120,3	37,7	
Ostali	34	15	8,3 - 110,8	29,3	

* Mann-Whitney ili Kruskal-Wallis test

U zavisnosti od histološkog tipa tumora, pacijentkinje su razvrstane u grupe sa: a) invazivnim duktalnim karcinomima (IDC), b) invazivnim lobularnim karcinomima (ILC) i c) ostalim tipovima karcinoma dojke. U grupi pacijentkinja sa IDC karcinomima dojke (n=112), koncentracije katepsina D su bile u opsegu od 10,4 do 237,8 pmol/mg, sa medijanom od 39,6 pmol/mg, dok su, u grupi pacijentkinja sa ILC karcinomima dojke (n=80), bile u opsegu od 12,8 do 120,3 pmol/mg, sa medijanom od 37,7 pmol/mg. U celoj grupi ispitivanih pacijentkinja, 34 pacijentkinje su imale retke tipove karcinoma dojke, koji nisu bili IDC ili ILC. Ustanovljeno je da se koncentracije katepsina D nisu značajno razlikovale između grupa pacijentkinja sa IDC i ILC karcinomima.

4.1.1.4. Raspodela koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim statusom ER i/ili PR

Karakteristike raspodele koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim statusom ER i/ili PR su prikazane u tabeli 4.3. U tumorima pacijentkinja sa pozitivnim statusom ER (n=153), koncentracije katepsina D su bile u opsegu od 10,4 do 237,8 pmol/mg, pri čemu je medijana bila 42,9 pmol/mg, i one su se statistički značajno razlikovale od koncentracija katepsina D u tumorima pacijentkinja sa negativnim statusom ER (n=73), koje su bile u opsegu od 8,3 do 107,9 pmol/mg, sa medijanom od 26,9 pmol/mg (*Mann-Whitney test*, $p < 0,001$). Koncentracije katepsina D su bile veće u grupi pacijentkinja sa pozitivnim statusom ER.

Koncentracije katepsina D su se statistički značajno razlikovale između grupa pacijentkinja sa pozitivnim (n=102, opseg=10,4-207,2 pmol/mg, medijana=39,8 pmol/mg) i negativnim (n=124, opseg=8,3-237,8 pmol/mg, medijana=33,4 pmol/mg) statusom PR (*Mann-Whitney test*, $p = 0,02$). Koncentracije katepsina D su bile veće u grupi pacijentkinja sa pozitivnim statusom PR.

Tabela 4.3. – Karakteristike raspodele koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim statusom ER i/ili PR (broj pacijenata, opseg vrednosti i medijana koncentracije, p vrednost)

	Broj pacijenata	(%)	Koncentracija katepsina D (pmol/mg)		p vrednost*
			Opseg	50 % - vrednost	
Status ER					
ER+	153	67,7	10,4 - 237,8	42,9	< 0,001
ER-	73	32,3	8,3 - 107,9	26,9	
Status PR					
PR+	102	45,1	10,4 - 207,2	39,8	0,02
PR-	124	54,9	8,3 - 237,8	33,4	
Kombinovani status ER i PR					
ER+ PR+	92	40,7	10,4 - 207,2	40,1	<0,001
ER+ PR-	61	27	12,1 - 237,8	45,8	
ER- PR+	10	4,4	11 - 93,4	39,2	
ER- PR-	73	32,3	8,3 - 107,9	26,9	

* *Mann-Whitney* ili *Kruskal-Wallis* test

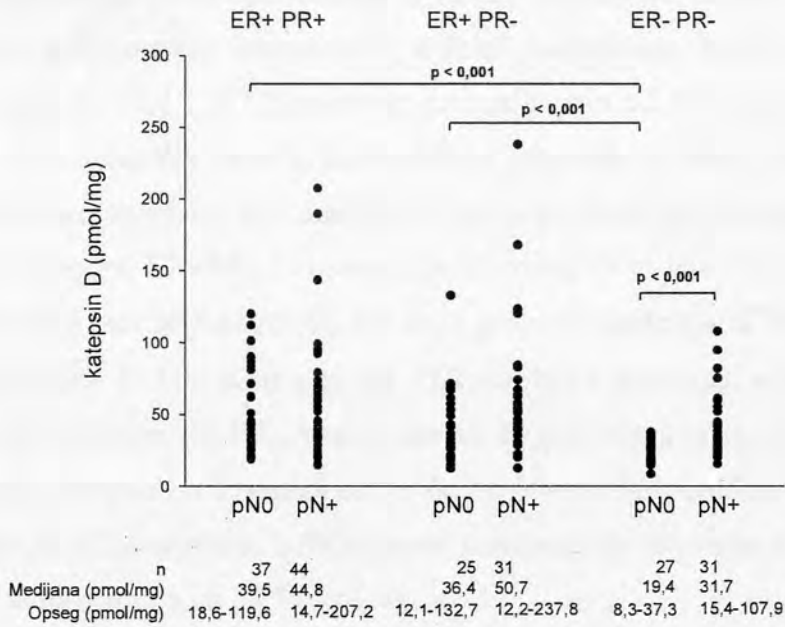
Kada su analizirane koncentracije katepsina D u grupama pacijentkinja koje su bile definisane na osnovu kombinovanog statusa ER i PR, utvrđeno je da se koncentracije katepsina D statistički značajno razlikuju (*Kruskal-Wallis* test, $p < 0,001$). Ova razlika je poticala od razlike vrednosti koncentracija katepsina D između fenotipova ER+PR+ i ER-PR- ($p < 0,001$) i između fenotipova ER+PR- i ER-PR- ($p < 0,001$), sa obzirom da su u okviru fenotipa ER-PR- bile prisutne značajno niže koncentracije katepsina D u odnosu na druga dva fenotipa.

4.1.1.5. Raspodela koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim kombinovanjem parametara domaćina tumora, tumora i statusa ER i/ili PR

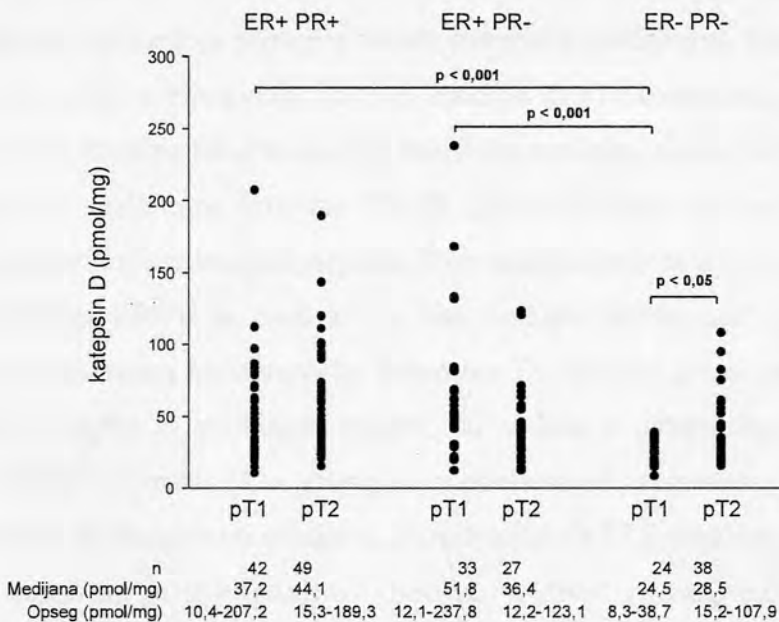
U daljem toku analize, raspodela koncentracija katepsina D je analizirana u grupama pacijentkinja koje su definisane kombinovanjem različitih parametara. Sa obzirom na to da su nađene statistički značajne razlike u koncentracijama katepsina D između grupa pacijentkinja definisanih pojedinim parametrima (status limfnih čvorova, status ER, status PR ili kombinovani status ER i PR), pažnja je bila usmerena na grupe pacijentkinja definisane kombinovanjem, prvenstveno, ali ne i isključivo navedenih parametara.

U okviru fenotipa ER+PR+ je bilo 37 pacijentkinja sa negativnim statusom limfnih čvorova, kod kojih su koncentracije katepsina D bile u intervalu od 18,6 do 119,6 pmol/mg, sa medijanom od 39,5 pmol/mg, dok su u grupi pacijentkinja sa pozitivnim statusom limfnih čvorova ($n=44$), koncentracije bile u intervalu od 14,7 do 207,2 pmol/mg, sa medijanom od 44,8 pmol/mg, slika 4.2..

Analiza je pokazala da postoji statistički značajna razlika u vrednostima koncentracija katepsina D između grupa pacijentkinja sa pozitivnim i negativnim statusom limfnih čvorova, u okviru fenotipa ER-PR- (*Mann-Whitney* test, $p < 0,001$), pri čemu su vrednosti koncentracija katepsina D bile manje u grupi pacijentkinja sa negativnim statusom limfnih čvorova. Sa slike 4.2. se može videti da su se opsezi koncentracija katepsina D u dve prethodno navedene grupe pacijentkinja razlikovali. Ovaj rezultat ukazuje na mogućnost da, pored razlike koja postoji u smislu statističke značajnosti, postoji i biološki značajna razlika između dve grupe pacijentkinja. Vrednosti koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja sa negativnim statusom limfnih čvorova su se statistički značajno razlikovale između fenotipa ER-PR- i druga dva analizirana fenotipa ER/PR (*Mann-Whitney* test, $p < 0,001$ u oba slučaja), pri čemu su vrednosti koncentracija bile manje u okviru fenotipa ER-PR-. Istovremeno, vrednosti koncentracija katepsina D se nisu značajno razlikovale između grupa pacijentkinja sa negativnim statusom limfnih čvorova, koje su pripadale fenotipovima ER+PR+ i ER+PR-.



Slika 4.2. – Raspodela vrednosti koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim statusom limfnih čvorova, u okviru statusa ER/PR. Na slici su prikazane medijane i opsezi koncentracija katepsina D i broj pacijentkinja u svakoj od analiziranih grupa, kao i p vrednosti koje se odnose na Mann-Whitney test.



Slika 4.3. – Raspodela vrednosti koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim veličinom tumora, u okviru statusa ER/PR (Mann-Whitney test, $p < 0,001$). Na slici su prikazane medijane i opsezi koncentracija katepsina D i broj pacijentkinja u svakoj od analiziranih grupa, kao i p vrednosti koje se odnose na Mann-Whitney test.

Imajući u vidu činjenicu da je veličina tumora značajno povezana sa statusom limfnih čvorova (χ^2 test, $p=0,03$), analizirana je i raspodela vrednosti koncentracija katepsina D u grupama

pacijentkinja definisanim veličinom tumora, u okviru fenotipova ER/PR, slika 4.3.. U okviru fenotipa ER+PR+, koncentracije katepsina D, u grupi pacijentkinja sa pT1 tumorima (n=42), su imale vrednosti između 10,4 i 207,2 pmol/mg, sa medijanom od 37,2 pmol/mg, dok su, u grupi pacijentkinja sa pT2 tumorima (n=49), koncentracije katepsina D imale vrednosti između 15,3 i 189,3 pmol/mg, sa medijanom od 44,1 pmol/mg. U grupi pacijentkinja sa manjim tumorima (n=33), koje su pripadale fenotipu ER+PR-, koncentracije katepsina D su bile u opsegu od 12,1 do 132,7 pmol/mg i medijana je bila 36,4 pmol/mg, dok su, u grupi pacijentkinja sa većim tumorima (n=27), koncentracije katepsina D bile u opsegu od 12,2 do 123,1 pmol/mg, a medijana je bila 36,4 pmol/mg. U okviru fenotipa ER-PR-, analizirane su 24 pacijentkinje sa pT1 tumorima, koje su imale koncentracije katepsina D u opsegu od 8,3 do 38,7 pmol/mg i medijanu od 24,5 pmol/mg, kao i 38 pacijentkinja sa pT2 tumorima, koje su imale koncentracije katepsina D u opsegu od 15,2 do 107,9 pmol/mg, sa medijanom od 28,5 pmol/mg.

Utvrđeno je da su se koncentracije katepsina D statistički značajno razlikovale između grupa pacijentkinja sa pT1 i pT2 tumorima samo u okviru fenotipa ER-PR- (*Mann-Whitney* test, $p < 0,05$). Pri tome su vrednosti koncentracija bile veće za pacijentkinje sa većim tumorima. Sa slike 4.3. se može videti da su se opsezi koncentracija katepsina D u grupi pacijentkinja sa manjim, odnosno većim tumorima, razlikovali u okviru navedenog ER/PR fenotipa. Ovaj rezultat, takođe, ukazuje na mogućnost da, pored razlike koja postoji u smislu statističke značajnosti, postoji i biološki značajna razlika između dve grupe pacijentkinja. Za pacijentkinje sa pT1 tumorima, vrednosti koncentracija katepsina D u okviru fenotipa ER-PR- su bile statistički značajno manje od vrednosti koncentracija u okviru druga dva analizirana fenotipa ER/PR (*Mann-Whitney* test, $p < 0,001$ u oba slučaja). Istovremeno, vrednosti koncentracija katepsina D za pacijentkinje sa pT1 tumorima u okviru druga dva analizirana fenotipa ER/PR se, međusobno, nisu značajno razlikovale.

Razlike u vrednostima koncentracija katepsina D, između grupa pacijentkinja definisanih statusom limfnih čvorova ili veličinom tumora, su nađene u okviru fenotipa ER-PR-. Najveća vrednost koncentracije katepsina D, u grupi pacijentkinja sa pT1 tumorima, je bila 38,7 pmol/mg, a u grupi pacijentkinja sa negativnim statusom limfnih čvorova 37,3 pmol/mg. U svrhu dalje analize, vrednost od 39 pmol/mg je usvojena kao granična vrednost za ekspresiju katepsina D, tj. kao vrednost na osnovu koje je bilo moguće definisati ekspresiju katepsina D koje jeste ili nije regulisana dejstvom estrogena, odnosno definisati status ekspresije katepsina D u tumorima pacijentkinja. Stoga su pacijentkinje koje su imale tumore sa koncentracijama katepsina D jednakim ili većim od 39 pmol/mg bile definisane kao pacijentkinje sa pozitivnim statusom katepsina D (CD+), dok su one sa koncentracijama katepsina D manjim od 39 pmol/mg bile definisane kao pacijentkinje sa negativnim statusom katepsina D (CD-).

4.1.1.6. Raspodela statusa katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, tumora ili statusima ER i/ili PR

Na osnovu granične vrednosti za koncentracije katepsina D od 39 pmol/mg, analizirana je raspodela statusa katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, tumora ili statusima ER i/ili PR, odnosno ispitivano je da li je status katepsina D povezan sa navedenim parametrima. U tabeli 4.4 je prikazan broj pacijentkinja sa negativnim (CD-) i pozitivnim (CD+) statusom katepsina D, u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, tumora ili statusima ER i/ili PR. Status katepsina D je bio statistički značajno povezan sa statusom limfnih čvorova, statusom ER, statusom PR, kao i kombinovanim statusima ER i PR.

Tabela 4.4. – Broj pacijentkinja, na osnovu statusa katepsina D, u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, tumora ili statusima ER i/ili PR i odgovarajuće p vrednosti

	Broj pacijenata		p vrednost*
	Status katepsina D -	+	
Godine			
< 45	23	16	
45 - 59	47	49	0,6
>59	46	44	
Status menopauze			
Pre-menopauza	40	37	
Post-menopauza	73	71	1
Status limfnih čvorova			
pN0	59	33	
pN+	47	65	0,003
Veličina tumora			
pT1	55	45	
pT2	60	62	0,5
Histološki gradus			
I	19	14	
II	75	71	0,5
III	19	24	
Histološki tip			
IDC	54	58	
ILC	41	39	0,8
Status ER			
ER+	64	89	
ER-	53	20	< 0,001
Status PR			
PR+	44	58	
PR-	73	51	0,03
Kombinovani status ER i PR			
ER+ PR+	40	52	
ER+ PR-	24	37	
ER-PR+	4	6	< 0,001
ER-PR-	49	14	

* Hi-kvadrat test

U grupi pacijentkinja sa pozitivnim statusom limfnih čvorova, broj pacijentkinja sa pozitivnim statusom katepsina D je bio veći od broja pacijentkinja sa negativnim statusom katepsina D, dok su u grupi pacijentkinja sa negativnim statusom limfnih čvorova, pacijentkinje sa negativnim statusom katepsina D bile brojnije od onih sa pozitivnim statusom katepsina D. Pri tome, frekvencije pacijentkinja u navedenim grupama su se statistički značajno razlikovale od frekvencija koje bi se očekivale pod nultom hipotezom, prema kojoj nema razlike između dobijenih i slučajno raspoređenih frekvencija pacijentkinja u grupama definisanim statusom limfnih čvorova i statusom katepsina D (χ^2 -test, $p=0,003$).

U grupi pacijentkinja koje su imale tumore sa pozitivnim statusom ER, veći broj pacijentkinja je imao pozitivan status katepsina D, dok je u grupi pacijentkinja sa tumorima koji su imali negativan status ER, veći broj pacijentkinja imao negativan status katepsina D. Frekvencije koje se odnose na pacijentkinje u grupama sa različitim statusima ER i katepsina D su se statistički značajno razlikovale od frekvencija koje bi se očekivale pod nultom hipotezom (χ^2 -test, $p<0,001$). Frekvencije pacijentkinja u grupama definisanim statusom PR su bile raspoređene tako da su se statistički značajno razlikovale od frekvencija pacijentkinja koje bi se očekivale pod nultom hipotezom (Hi-kvadrat test, $p=0,03$).

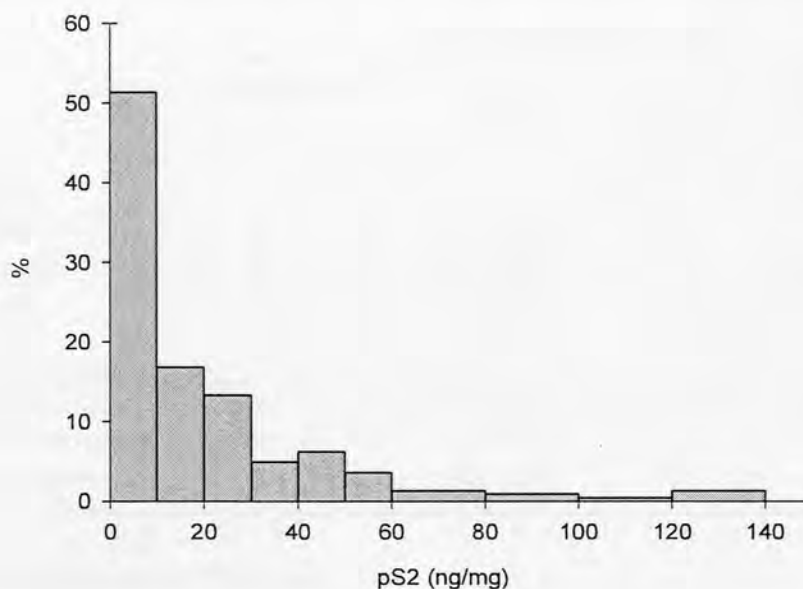
Što se tiče grupa pacijentkinja definisanih kombinovanim statusom ER i PR, frekvencije vezane za pacijentkinje sa različitim statusom katepsina D, u grupama definisanim statusom ER i PR, su bile statistički značajno različite od frekvencija koje bi se očekivale pod nultom hipotezom, prema kojoj nema razlike između dobijenih i slučajno raspoređenih frekvencija (Hi-kvadrat test, $p<0,001$). Ustanovljeno je da je ova razlika bila uslovljena razlikom u broju pacijentkinja sa pozitivnim i negativnim statusom katepsina D samo između fenotipova ER+PR+ i ER-PR- ($p<0,001$), pri čemu je veći broj pacijentkinja, u okviru fenotipa ER+PR+, imao pozitivan status katepsina D, dok je u okviru fenotipa ER-PR-, veći broj pacijentkinja imao negativan status katepsina D.

4. 1. 2. Raspodela koncentracija pS2

4.1.2.1. Raspodela učestalosti koncentracija pS2

Na slici 4.4 je predstavljena raspodela učestalosti koncentracija pS2, za 226 pacijentkinja sa primarnim operabilnim malignim karcinomom dojke. Vrednosti koncentracija pS2 su bile u opsegu od 1,5 do 137,4 ng/mg, sa medijanom od 9 ng/mg. Pomoću *Kolmogorov-Smirnov* testa je ustanovljeno da raspodela učestalosti koncentracija pS2 u tumorima pacijentkinja statistički

značajno odstupa od normalne raspodele ($p < 0,001$) te su, u toku dalje analize, korišćeni neparametrijski testovi statističke analize.



Slika 4.4. - Raspodela učestalosti koncentracija pS2, za 226 pacijentkinja sa primarnim operabilnim karcinomom dojke (Kolmogorov-Smirnov test, $p < 0,001$), u intervalima od 10/20 ng/mg.

4.1.2.2. Raspodela koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora

U tabeli 4.5 su prikazane karakteristike raspodele koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora. Tumori pacijentkinja mlađih od 45 godina su bili okarakterisani vrednostima koncentracija pS2 između 2 i 82,9 ng/mg, sa medijanom od 17,7 ng/mg, tumori pacijentkinja starosti između 45 i 59 godina su sadržavali između 1,5 i 124,1 ng/mg pS2, sa medijanom od 7,9 ng/mg, dok su u tumorima pacijentkinja starijih od 59 godina, koncentracije pS2 bile između 1,8 i 137,4 ng/mg, pri čemu je medijana bila 9,4 ng/mg. Koncentracije pS2 se nisu razlikovale između grupa pacijentkinja definisanih na osnovu godina pacijentkinja.

Vrednosti koncentracija pS2 su bile u intervalu od 2 do 124,1 ng/mg, sa medijanom od 13,6 ng/mg, u grupi premenopauznih pacijentkinja, i u intervalu od 1,5 do 137,4 ng/mg, sa medijanom od 8 ng/mg, u grupi postmenopauznih pacijentkinja. Analiza je pokazala da su vrednosti koncentracija pS2 bile statistički značajno veće u grupi premenopauznih, u odnosu na grupu postmenopauznih pacijentkinja (Mann-Whitney test, $p = 0,02$).

Tabela 4.5. – Karakteristike raspodele koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora (broj pacijentkinja, opseg vrednosti i medijana koncentracije, p vrednost)

	Broj pacijenata	(%)	Koncentracija pS2 (ng/mg)		p vrednost*
			Opseg	50 % - vrednost	
Godine					
< 45	39	17,2	2,0 - 82,9	17,7	0,1
45 - 59	96	42,5	1,5 - 124,1	7,9	
>59	91	40,3	1,8 - 137,4	9,4	
Status menopauze					
Pre-menopauza	77	34,1	2,0 - 124,1	13,6	0,02
Post-menopauza	144	63,7	1,5 - 137,4	8	
Nepoznato	5	2,2	2,2 - 19,4	3,7	

* Mann-Whitney ili Kruskal-Wallis test

4.1.2.3. Raspodela koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim parametrima tumora

Karakteristične vrednosti raspodele koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim parametrima tumora, sa odgovarajućim p vrednostima, su prikazane u tabeli 4.6.. Status limfnih čvorova u tumorima pacijentkinja je uslovio da su koncentracije pS2, u grupi pacijentkinja sa negativnim statusom, bile u opsegu od 1,5 do 137,4 ng/mg, sa medijanom od 7,4 ng/mg, dok su, u grupi pacijentkinja sa pozitivnim statusom, bile u opsegu od 2 do 124,1 ng/mg, sa medijanom od 11,2 ng/mg.

Koncentracije pS2 su bile u intervalu od 1,5 do 137,4 ng/mg, u tumorima manjim od 2 cm, odnosno u intervalu od 1,9 do 124,6 ng/mg, u tumorima jednakim ili većim od 2 cm, uz medijane od 10,6 i 8,8 ng/mg, respektivno.

U grupi pacijentkinja koje su imale tumore histološkog gradusa I, pS2 je bio eksprimiran u koncentracijama između 1,9 i 56,2 ng/mg, sa medijanom od 7,3 ng/mg, u grupi pacijentkinja koje su imale tumore histološkog gradusa II, pS2 je bio eksprimiran u koncentracijama između 1,6 i 124,6 ng/mg, sa medijanom od 12,1 ng/mg, dok je, u grupi pacijentkinja koje su imale tumore histološkog gradusa III, pS2 bio eksprimiran u koncentracijama između 1,5 i 137,4 ng/mg, sa medijanom od 3,1 ng/mg.

U grupi pacijentkinja sa invazivnim duktalnim karcinomima dojke, koncentracije pS2 su bile u opsegu od 1,5 do 137,4 ng/mg, a u grupi pacijentkinja sa invazivnim lobularnim karcinomima,

koncentracije pS2 su bile u opsegu od 2 do 124,1 ng/mg. Odgovarajuće medijane za koncentraciju pS2 su bile 6,4 i 12 ng/mg, respektivno. U celoj grupi ispitivanih pacijentkinja, 34 pacijentkinje nisu imale invazivne karcinome dojke.

Tabela 4.6. – Karakteristike raspodele koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim parametrima tumora (broj pacijentkinja, opseg vrednosti i medijana koncentracije, p vrednost)

Karakteristika	Broj pacijenata	Karakteristika (%)	Koncentracija pS2 (ng/mg)		p vrednost*
			Opseg	50 % - vrednost	
Status limfnih čvorova					
pN0	92	40,7	1,5 - 137,4	7,4	0,1
pN+	112	49,6	2,0 - 124,1	11,2	
Nepoznato	22	9,7	1,6 - 58,1	7	
Veličina tumora					
pT1	100	44,3	1,5 - 137,4	10,6	0,5
pT2	122	54	1,9 - 124,6	8,8	
Nepoznato	4	1,8	2,2 - 19,4	6,4	
Histološki gradus					
I	33	14,6	1,9 - 56,2	7,3	< 0,001
II	146	64,6	1,6 - 124,6	12,1	
III	43	19	1,5 - 137,4	3,1	
Nepoznato	4	1,8	3 - 42,3	15,1	
Histološki tip					
IDC	112	49,6	1,5 - 137,4	6,4	0,07
ILC	80	35,4	2,0 - 124,1	12	
ostali	34	15	1,6 - 54,4	13,7	

* Mann-Whitney ili Kruskal-Wallis test

Statistička analiza je pokazala da se vrednosti koncentracija pS2 nisu značajno razlikovale između grupa pacijentkinja definisanih statusom limfnih čvorova, veličinom ili histološkim tipom tumora, dok su se statistički značajno razlikovale između grupa pacijentkinja definisanih histološkim gradusom tumora (Kruskal-Wallis test, $p < 0,001$). Tumori histološkog gradusa II su imali veće vrednosti koncentracija pS2 u odnosu na tumore histološkog gradusa I, koji su, sa druge strane, imali veće vrednosti koncentracija pS2 u odnosu na tumore histološkog gradusa III.

4.1.2.4. Raspodela koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim statusima ER i/ili PR

U tabeli 4.7. su predstavljene karakteristike raspodele koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim statusom ER i/ili PR. Koncentracije pS2 su, u tumorima pacijentkinja sa pozitivnim statusom ER, bile između 1,6 i 137,4 ng/mg, a u tumorima pacijentkinja sa negativnim statusom ER, između 1,5 i 66 ng/mg, pri čemu su odgovarajuće medijane bile jednake 15,9 i 3,7 ng/mg, respektivno. Koncentracije pS2 su bile statistički značajno veće u tumorima pacijentkinja sa pozitivnim statusom ER (*Mann-Whitney test*, $p < 0,001$).

Tabela 4.7. – Karakteristike raspodele koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim statusom ER i/ili PR (broj pacijentkinja, opseg vrednosti i medijana koncentracije, p vrednost)

Karakteristika	Broj pacijentkinja	Koncentracija pS2 (ng/mg) (%)	Koncentracija pS2 (ng/mg)		p vrednost*
			Opseg	50 % - vrednost	
Status ER					
ER+	153	67,7	1,6 - 137,4	15,9	< 0,001
ER-	73	32,3	1,5 - 66	3,7	
Status PR					
PR+	102	45,1	1,6 - 137,4	15,4	< 0,001
PR-	124	54,9	1,5 - 124,6	5,2	
Kombinovani status ER i PR					
ER+ PR+	92	40,7	1,6 - 137,4	16,4	< 0,001
ER+ PR-	61	27	1,9 - 124,6	15	
ER- PR+	10	4,4	2,2 - 56,2	12,7	
ER- PR-	73	32,3	1,5 - 66	3,3	

* *Mann-Whitney* ili *Kruskal-Wallis* test

Što se tiče raspodele koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim statusom PR, analiza je pokazala da su koncentracije pS2 bile statistički značajno veće za pacijentkinje sa pozitivnim statusom PR, jer su bile u opsegu od 1,6 do 137,4 ng/mg i sa medijanom od 15,4 ng/mg, nego za pacijentkinje sa negativnim statusom PR, za koje su koncentracije pS2 bile u opsegu od 1,5 do 124,6 ng/mg i sa medijanom od 5,2 ng/mg (*Mann-Whitney test*, $p < 0,001$).

Analiza vrednosti koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim kombinovanjem statusa ER i PR je pokazala da su koncentracije pS2 statistički značajno razlikovale između grupa pacijentkinja (*Kruskal-Wallis test*, $p < 0,001$). Dodatnom analizom je ustanovljeno da su koncentracije pS2, u okviru grupe pacijentkinja sa fenotipom ER-PR-, bile statistički značajno

manje u odnosu na koncentracije pS2 u grupama pacijentkinja koje su pripadale fenotipovima ER+PR+ ($p<0,001$), ER+PR- ($p<0,001$) i ER-PR+ ($p=0,006$).

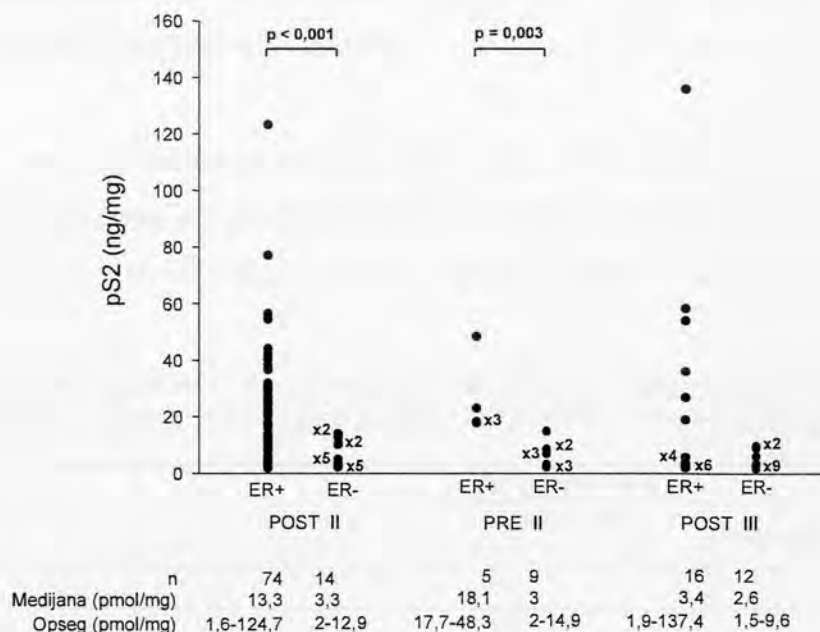
4.1.2.5. Raspodela koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim kombinovanjem parametara domaćina tumora, tumora i statusa ER i/ili PR

U cilju određivanja granične vrednosti za ekspresiju pS2, raspodela koncentracija pS2 je analizirana u grupama pacijentkinja koje su definisane kombinovanjem različitih parametara. Sa obzirom na to da su nađene statistički značajne razlike u koncentracijama pS2 između grupa pacijentkinja definisanih pojedinim parametrima (status menopauze, histološki gradus tumora, status ER, status PR ili kombinovani status ER i PR), pažnja je bila usmerena na grupe pacijentkinja definisane kombinovanjem, prvenstveno, ali ne i isključivo, navedenih parametara.

Analizirane su koncentracije pS2 u grupama pacijentkinja sa negativnim i pozitivnim statusom ER, u okviru fenotipova definisanih statusom menopauze i histološkim gradusom tumora (slika 4.5.). U okviru grupe postmenopauzних pacijentkinja, sa tumorima histološkog gradusa II, njih 74 su imale tumore sa pozitivnim statusom ER i sa koncentracijama pS2 između 1,6 i 124,7 ng/mg (medijana je bila 13,3 ng/mg), dok je 14 pacijentkinja imalo tumore sa negativnim statusom ER i sa koncentracijama pS2 između 2 i 12,9 ng/mg (medijana je bila 3,3 ng/mg). Pri tome su koncentracije pS2 bile statistički značajno veće u tumorima pacijentkinja sa pozitivnim statusom ER (*Mann-Whitney test*, $p<0,001$).

U okviru grupe postmenopauzних pacijentkinja, ali sa tumorima histološkog gradusa III, njih 16 je imalo tumore sa pozitivnim statusom ER, pri čemu su koncentracije pS2 bile u opsegu od 1,9 i 137,4 ng/mg, sa medijanom od 3,4 ng/mg, dok je 12 pacijentkinja imalo tumore sa negativnim statusom ER, a koncentracije pS2 su bile u opsegu od 1,5 do 9,6 ng/mg, sa medijanom od 2,6 ng/mg.

Kada su analizirane koncentracije pS2 za premenopauzne pacijentkinje koje su imale tumore histološkog gradusa II, u grupama pacijentkinja sa pozitivnim ($n=5$) i negativnim ($n=9$) statusom ER, ustanovljeno je da se koncentracije pS2 u prvoj grupi pacijentkinja (opseg od 17,7 do 48,3 ng/mg) statistički značajno razlikuju od koncentracija pS2 u drugoj grupi pacijentkinja (opseg od 2 do 14,9 ng/mg) i da su veće u prvoj grupi pacijentkinja, sa obzirom na odgovarajuće medijane koncentracija pS2 u dvema grupama koje bile 18,1 i 3 ng/mg, respektivno (*Mann-Whitney test*, $p=0,003$).



Slika 4.5. – Raspodela vrednosti koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim statusom ER, u okviru fenotipova definisanih statusom menopauze i histološkim gradusom tumora. Prikazane su medijane i opsezi koncentracija pS2 i broj pacijentkinja u analiziranim grupama, kao i odgovarajuće p vrednosti za Mann-Whitney test.

Analiza je pokazala da negativan status ER uslovljava da koncentracije pS2 budu statistički značajno manje, u poređenju sa koncentracijama koje odgovaraju pozitivnom statusu ER, za tumore histološkog gradusa II, kako pre- tako i postmenopauznih pacijentkinja. Dodatno, može se smatrati da se, u okviru sva tri fenotipa sa slike 4.5. koji su definisani statusom menopauze i histološkim gradusom tumora, opsezi koncentracija pS2 razlikuju u tumorima pacijentkinja sa različitim statusom ER, što ukazuje da, pored statistički značajne, postoji i biološki značajna razlika između tumora okarakterisanih različitim statusima ER. U analiziranim grupama pacijentkinja koje su imale negativan status ER, vrednosti koncentracija pS2 su bile manje od 15 ng/mg. Ova vrednost je usvojena kao granična vrednost za ekspresiju pS2 i korišćena je za definisanje statusa pS2 u tumorima pacijentkinja. Pacijentkinje koje su imale tumore sa koncentracijama pS2 manjim od 15 ng/mg su bile definisane kao pacijentkinje sa negativnim statusom pS2 (pS2-), dok su one sa koncentracijama pS2 jednakim ili većim od 15 ng/mg bile definisane kao pacijentkinje sa pozitivnim statusom pS2 (pS2+).

4.1.2.6. Raspodela statusa pS2 u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, tumora i statusima ER i/ili PR

Na osnovu granične vrednosti za ekspresiju pS2 od 15 ng/mg, analizirana je raspodela koncentracija pS2, u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, tumora ili statusima ER i/ili PR, koje su bile manje, odnosno veće od granične vrednosti. U tabeli 4.8 su

Tabela 4.8. – Broj pacijentkinja, na osnovu statusa pS2, u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, tumora ili statusima ER i/ili PR i odgovarajuće p vrednosti

	Broj pacijenata		p vrednost*
	Status pS2 -	+	
Godine			
< 45	19	20	0,2
45 - 59	65	31	
>59	57	34	
Status menopauze			
Pre-menopauza	43	34	0,3
Post-menopauza	94	50	
Status limfnih čvorova			
pN0	61	31	0,4
pN+	66	46	
Veličina tumora			
pT1	62	38	1
pT2	76	46	
Histološki gradus			
I	22	11	0,2
II	85	61	
III	32	11	
Histološki tip			
IDC	75	37	0,4
ILC	48	32	
Status ER			
ER+	75	78	< 0,001
ER-	66	7	
Status PR			
PR+	51	51	< 0,001
PR-	90	34	
Kombinovani status ER i PR			
ER+ PR+	45	47	< 0,001
ER+ PR-	30	31	
ER-PR+	6	4	
ER-PR-	60	3	

* Hi-kvadrat test

prikazane frekvencije koje se odnose na pacijentkinje sa negativnim i pozitivnim statusom pS2, u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, tumora ili statusima ER i/ili PR.

Analizom je utvrđeno da je status pS2 je bio statistički značajno povezan sa statusom ER, statusom PR, kao i kombinovanim statusima ER i PR. U grupi pacijentkinja sa tumorima koji su

imali pozitivan status ER, veći broj pacijentkinja je imao pozitivan status pS2, dok je u grupi pacijentkinja sa tumorima koji su imali negativan status ER, veći broj pacijentkinja imao negativan status pS2 (χ^2 -test, $p < 0,001$). Pacijentkinje sa pozitivnim statusom PR su bile podjednako brojne u grupama sa pozitivnim i negativnim statusom PR, dok su među pacijentkinjama sa negativnim statusom PR bile brojnije one koje su imale negativan status pS2 (χ^2 -test, $p = 0,03$). Sa obzirom na to da su frekvencije vezane za pacijentkinje sa različitim statusima pS2 bile ujednačene u grupama sa pozitivnim statusom ER ili PR, evidentno je da su statistički značajne razlike u frekvencijama za pacijentkinje sa pozitivnim, odnosno negativnim statusom pS2, u odnosu na slučajno raspoređene frekvencije, bile uslovljene različitim brojem pacijentkinja u grupama sa negativnim statusom ER, odnosno PR.

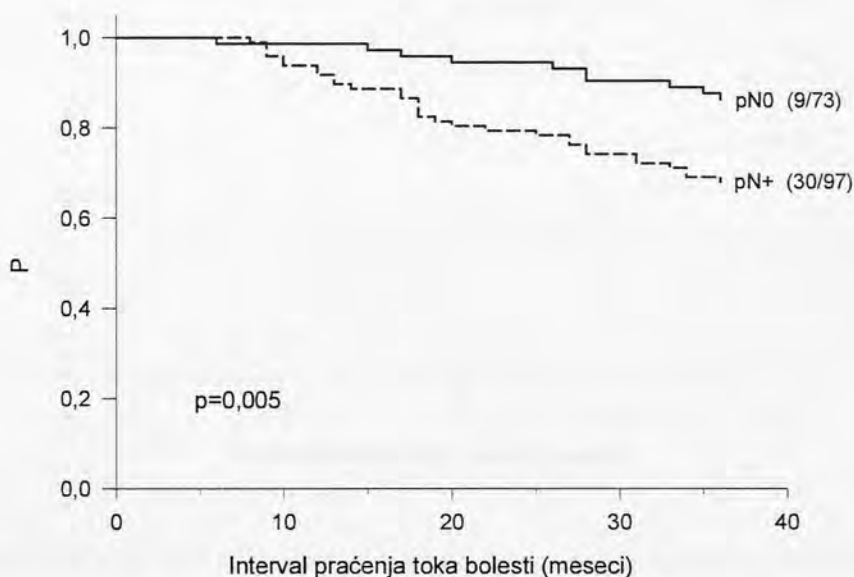
Što se tiče grupa pacijentkinja definisanih kombinovanim statusom ER i PR, frekvencije vezane za pacijentkinje sa različitim statusom pS2, u grupama definisanim statusom ER i PR, su bile statistički značajno različite od frekvencija koje bi se očekivale pod nultom hipotezom, prema kojoj nema razlike između dobijenih i slučajno raspoređenih frekvencija (χ^2 -test, $p < 0,001$). Ova razlika je bila posledica razlika između frekvencija u grupi pacijentkinja sa fenotipom ER-PR- u odnosu na ostale analizirane grupe. Pri tome, dobijena razlika je bila uslovljena mnogo većim brojem pacijentkinja sa negativnim, u odnosu na one sa pozitivnim statusom pS2, u okviru fenotipa ER-PR-.

4. 2. Verovatnoća za DFI

Verovatnoće za DFI je bilo moguće odrediti metodom *Kaplan-a* i *Meier-a*, u svakoj od analiziranih grupa pacijentkinja, na osnovu poznatog broja pacijentkinja kod kojih je potvrđeno prisustvo udaljenih metastaza i vremenskog perioda, za svaku od tih pacijentkinja, proteklog od hirurške terapije do pojave udaljenih metastaza, kao i na osnovu broja pacijentkinja kod kojih nisu detektovane metastaze u periodu ukupnog praćenja toka bolesti od 36 meseci. Upotrebom log-rank testa je bilo moguće ispitati da li postoje značajne razlike u verovatnoćama za DFI između analiziranih grupa pacijentkinja.

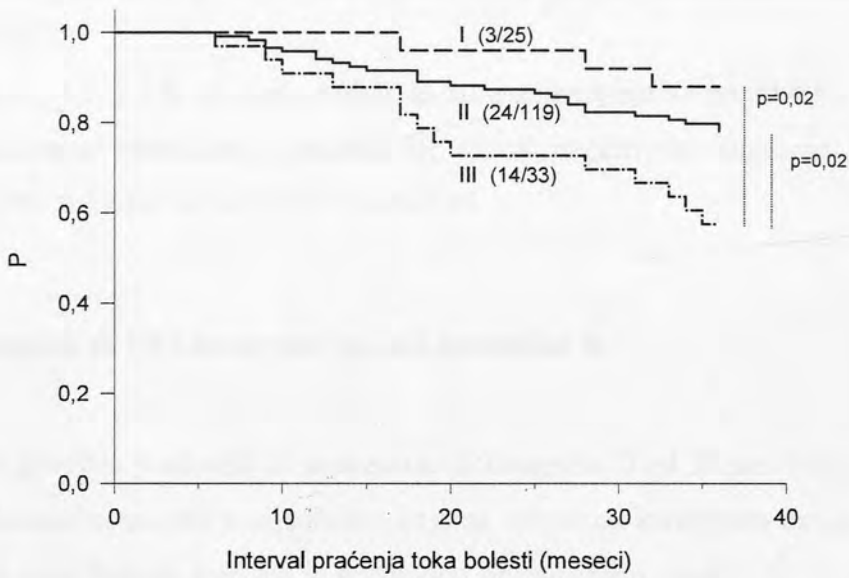
Kada su verovatnoće za DFI analizirane u celoj grupi ispitivanih pacijentkinja, nije nađena značajna razlika u verovatnoćama između grupa pacijentkinja definisanih samo na osnovu statusa katepsina D ili statusa pS2. Stoga su verovatnoće za DFI analizirane u okviru grupa pacijentkinja definisanih parametrima domaćina tumora, tumora ili statusima ER i/ili PR. Statistička analiza je pokazala da se verovatnoće za DFI statistički značajno razlikuju između grupa pacijentkinja

definisanih statusom limfnih čvorova (slika 4.6.), histološkim gradusom tumora (slika 4.7.) ili statusom PR (slika 4.8.).

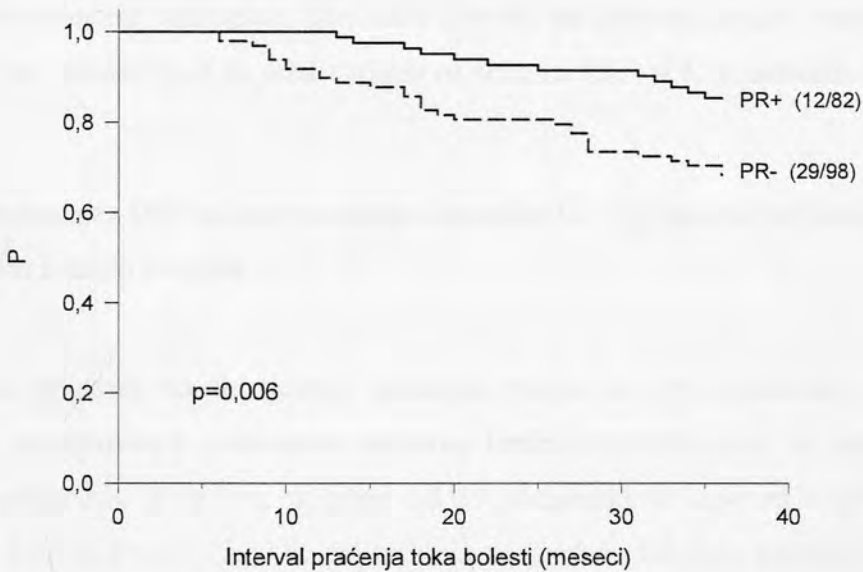


Slika 4.6. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje koje su imale negativan (pN0), odnosno pozitivan status limfnih čvorova (pN+), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci (log-rank test, $p=0,005$). U zagradama je prikazan broj pacijentkinja sa potvrđenim udaljenim metastazama i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi.

Utvrđeno je da su kod 9 pacijentkinja od 73 sa pozitivnim statusom limfnih čvorova, odnosno kod 30 pacijentkinja od 97 sa negativnim statusom limfnih čvorova potvrđene udaljene metastaze što je uslovalo statistički značajnu razliku u verovatnoćama za DFI između ove 2 grupe pacijentkinja (log-rank test, $p=0,005$). Među 25 pacijentkinja koje su imale tumore histološkog gradusa I, kod njih 3 su se razvile udaljene metastaze u periodu od 36 meseci. U istom periodu, među pacijentkinjama koje su imale tumore histološkog gradusa II, kod njih 24 od 119 su se razvile udaljene metastaze, dok su se u grupi od 33 pacijentkinje koje su imale tumore histološkog gradusa III, metastaze razvile kod 14 pacijentkinja. Verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale između pacijentkinja sa tumorima histološkog gradusa III, sa jedne, i pacijentkinja sa tumorima histološkog gradusa I, odnosno histološkog gradusa II, sa druge strane (log-rank test, $p=0,02$ za obe analize). Pri tome se verovatnoće za DFI za pacijentkinje sa tumorima histoloških gradusa I i II nisu značajno razlikovale. Kada su verovatnoće za DFI analizirane u grupama pacijentkinja sa pozitivnim (12 pacijentkinja sa i 70



Slika 4.7. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa tumorima različitog histološkog gradusa (I, II, III), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci. U zagradama je prikazan broj pacijentkinja sa potvrđenim udaljenim metastazama i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi. Naznačene p vrednosti se odnose na log-rank test.



Slika 4.8. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje koje su imale tumore sa pozitivnim (PR+), odnosno negativnim statusom receptora za progesteron (PR-), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci (log-rank test, $p=0,006$). U zagradama je prikazan broj pacijentkinja sa potvrđenim udaljenim metastazama i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi.

bez udaljenih metastaza), odnosno negativnim statusom PR (29 pacijentkinja sa i 69 bez udaljenih metastaza), ustanovljeno je da se verovatnoće u dvema grupama statistički značajno razlikuju (log-rank test, $p=0,006$).

Sa slika 4.6., 4.7. i 4.8. se može videti da su pacijentkinje sa pozitivnim statusom limfnih čvorova, sa tumorima histološkog gradusa III ili sa negativnim statusom PR imale manje verovatnoće za DFI, odnosno nepovoljniji tok bolesti.

4. 2. 1. Verovatnoća za DFI na osnovu statusa katepsina D

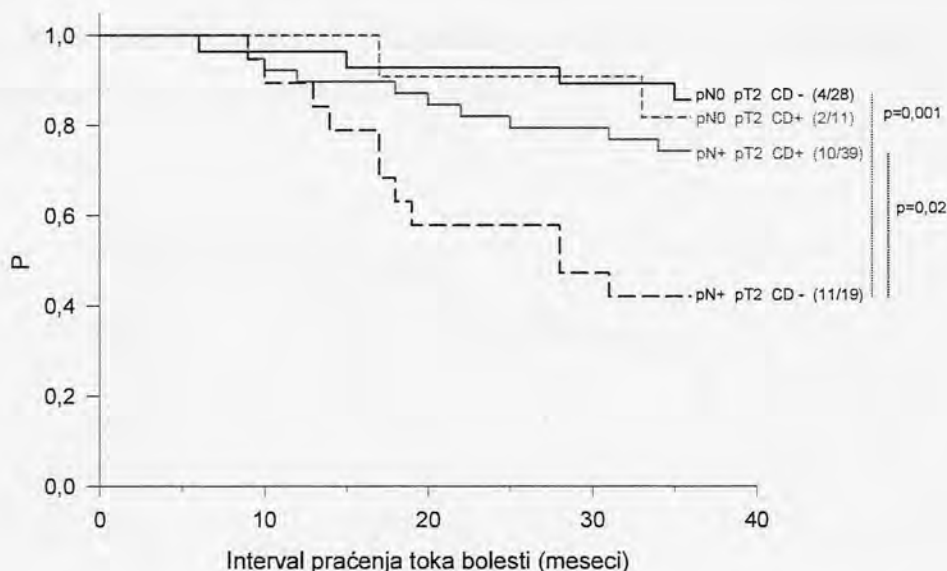
Na osnovu granične vrednosti za koncentracije katepsina D od 39 pmol/mg, određen je status katepsina D u tumorima, za 180 pacijentkinja koje su lečene od karcinoma dojke, a za koje su bili poznati podaci o toku bolesti. Kao što je prethodno objašnjeno u odeljku 4.1.4., pacijentkinje kod kojih su detektovane koncentracije katepsina D jednake ili veće od 39 pmol/mg su bile definisane kao pacijentkinje sa pozitivnim statusom katepsina D (CD+), a one sa koncentracijama katepsina D manjim od 39 pmol/mg kao pacijentkinje sa negativnim statusom katepsina D (CD-). Da bi se ispitaio značaj statusa katepsina D u prognozi toka bolesti pacijentkinja sa karcinomom dojke, analizirane su verovatnoće za DFI na osnovu statusa katepsina D u grupama pacijentkinja koje su definisane kombinovanjem parametara domaćina tumora, parametara tumora i statusima steroidnih receptora. Pri tome, rezultati koji su predstavljeni na slikama 4.6. - 4.8. su usmerili dalji tok analize.

4.2.1.1. Verovatnoća za DFI na osnovu statusa katepsina D - u grupama pacijentkinja definisanim statusom limfnih čvorova

Analiza je pokazala da ne postoji značajna razlika u verovatnoćama za DFI između pacijentkinja sa negativnim i pozitivnim statusom limfnih čvorova koje su imale pT1 tumore (rezultati nisu prikazani). Međutim, u grupi od 39 pacijentkinja koje su imale pT2 tumore i negativan status limfnih čvorova, kod 6 pacijentkinja su utvrđene udaljene metastaze, dok je u grupi od 58 pacijentkinja, koje su imale pT2 tumore i pozitivan status limfnih čvorova, bila 21 pacijentkinja sa potvrđenim udaljenim metastazama. Verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale između ove dve grupe pacijentkinja (log-rank test, $p=0,03$) i bile su veće za pacijentkinje sa negativnim statusom limfnih čvorova.

Kada je u okviru dve grupe pacijentkinja sa različitim statusom limfnih čvorova, koje su imale pT2 tumore, analiziran i značaj statusa katepsina D, slika 4.9., utvrđeno je da postoji statistički

značajna razlika u verovatnoćama za DFI između dve grupe pacijentkinja sa negativnim statusom katepsina D (log-rank test, $p=0,001$). Ova razlika je bila rezultat činjenice da su kod 4 pacijentkinje, od 28 sa negativnim statusom limfnih čvorova, potvrđene udaljene metastaze i da je kod 11 pacijentkinja, od 19 sa pozitivnim statusom limfnih čvorova, utvrđeno prisustvo udaljenih metastaza. Pri tome su pacijentkinje sa pozitivnim statusom limfnih čvorova imale manje verovatnoće za DFI, odnosno nepovoljniji tok bolesti. Istovremeno, pozitivan status

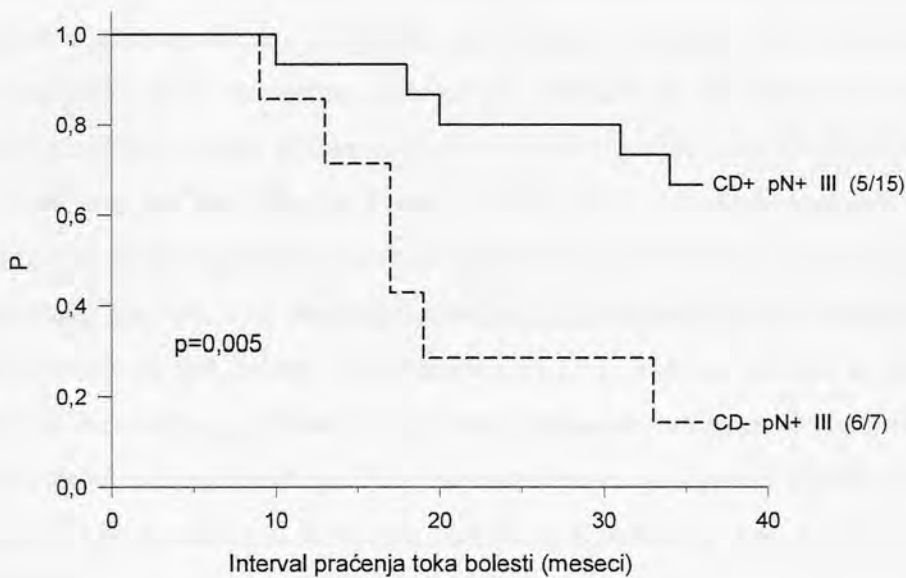


Slika 4.9. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa negativnim ($pN0$) i pozitivnim ($pN+$) statusom limfnih čvorova, koje su imale $pT2$ tumore i negativan ($CD-$, crne linije), odn. pozitivan status katepsina D ($CD+$, sive linije), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci. U zagradama je prikazan broj pacijentkinja kod kojih su detektovane udaljene metastaze i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi. Naznačene p vrednosti se odnose na log-rank test.

katepsina D u grupama pacijentkinja sa $pT2$ tumorima, koje su, pri tome, imale pozitivan, odnosno negativan status limfnih čvorova, nije uslovio postojanje značajne razlike u verovatnoćama za DFI između dve grupe pacijentkinja.

Analiza je pokazala da su se statistički značajno razlikovale i verovatnoće za DFI za pacijentkinje sa pozitivnim i negativnim statusom katepsina D, koje su imale $pT2$ tumore i pozitivan status limfnih čvorova (log-rank test, $p=0,02$). Na slici 4.9 su predstavljene i verovatnoće za DFI u grupi od 39 pacijentkinja koje su imale $pT2$ tumore i pozitivan status limfnih čvorova i katepsina D, a među kojima je bilo 10 pacijentkinja kod kojih su dijagnostifikovane udaljene metastaze, u intervalu praćenja toka bolesti. Sa slike 4.9. se može videti da su, u grupi pacijentkinja sa pozitivnim statusom limfnih čvorova i $pT2$ tumorima, pacijentkinje sa negativnim statusom katepsina D imale manje verovatnoće za DFI, odnosno nepovoljniji tok bolesti.

Status katepsina D nije uslovio postojanje značajnih razlika u verovatnoćama za DFI između dve podgrupe pacijentkinja koje su imale tumore histološkog gradusa I ili II i, istovremeno, pozitivan ili negativan status limfnih čvorova (rezultati nisu prikazani). Međutim, u grupi pacijentkinja sa tumorima histološkog gradusa III, nađena je podgrupa pacijentkinja sa pozitivnim statusom limfnih čvorova, u kojoj je status katepsina D uslovio postojanje značajne razlike u verovatnoćama za DFI između odgovarajućih podgrupa (log-rank test, $p=0,005$, slika 4.10.). U podgrupi od 15 pacijentkinja sa pozitivnim statusom katepsina D, kod 5 pacijentkinja su potvrđene udaljene metastaze, dok su u podgrupi od 7 pacijentkinja sa negativnim statusom katepsina D, udaljene metastaze potvrđene kod 6 pacijentkinja zbog čega su pacijentkinje sa negativnim statusom katepsina D imale nepovoljniji tok bolesti.

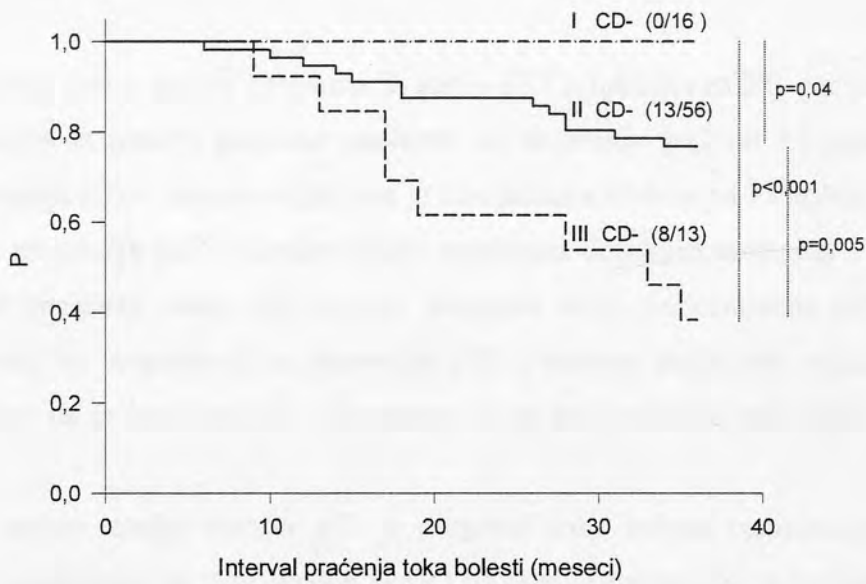


Slika 4.10. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa III i sa pozitivnim statusom limfnih čvorova ($pN+$), koje su imale pozitivan ($CD+$), odnosno negativan ($CD-$) status katepsina D, u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci (log-rank test, $p=0,005$). U zagradama je prikazan broj pacijentkinja sa potvrđenim udaljenim metastazama i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi.

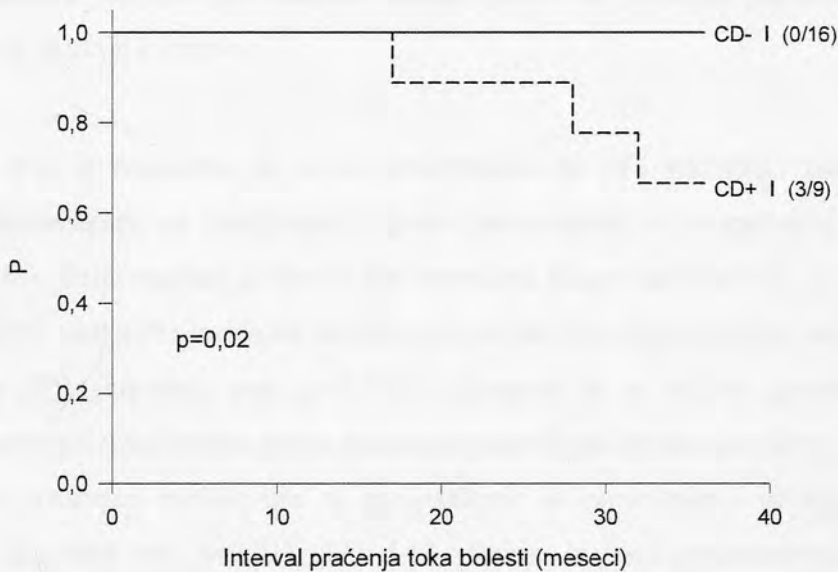
4.2.1.2. Verovatnoća za DFI na osnovu statusa katepsina D - u grupama pacijentkinja definisanim histološkim gradusom tumora

Verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale kada su upoređivane grupe pacijentkinja sa tumorima histoloških gradusa I i III, odnosno II i III, što je predstavljeno u odeljku 4.3. (slika 4.7.). Na osnovu toga su upoređene verovatnoće za DFI između 3 grupe pacijentkinja sa tumorima različitih histoloških gradusa koje su imale pozitivan, odnosno negativan status katepsina D. Kada su pacijentkinje bile okarakterisane negativnim statusom katepsina D, analiza je pokazala da su se verovatnoće za DFI za 16 pacijentkinja koje su imale tumore histološkog gradusa I, od kojih nijedna pacijentkinja nije imala udaljene metastaze, statistički značajno razlikovale od verovatnoća za DFI za 56 pacijentkinja koje su imale tumore histološkog gradusa II, među kojima je bilo 13 pacijentkinja sa utvrđenim udaljenim metastazama (log-rank test, $p=0,04$). Verovatnoće za DFI za 13 pacijentkinja sa tumorima histološkog gradusa III, od kojih je 8 imalo udaljene metastaze, su se statistički značajno razlikovale kako od odgovarajućih verovatnoća za pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa I (log-rank test, $p<0,001$) tako i od odgovarajućih verovatnoća za pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa II (log-rank test, $p=0,005$). Pri tome, pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa I su imale najpovoljniji, a pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa III najnepovoljniji tok bolesti. Verovatnoće za DFI, koje se odnose na pacijentkinje sa tumorima različitog histološkog gradusa i negativnim statusom katepsina D, su prikazane na slici 4.11.. U slučaju kada su pacijentkinje bile okarakterisane pozitivnim statusom katepsina D, verovatnoće za DFI pacijentkinja sa tumorima različitog histološkog gradusa se nisu međusobno značajno razlikovale.

Pored toga što je negativan status katepsina D uslovio postojanje značajne razlike u verovatnoćama za DFI između grupa pacijentkinja čiji su tumori bili različitog histološkog gradusa, nađeno je da su se, za pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa I, verovatnoće za DFI statistički značajno razlikovale između grupa pacijentkinja sa pozitivnim i sa negativnim statusom katepsina D (log-rank test, $p=0,02$). Dok u grupi pacijentkinja sa tumorima histološkog gradusa I i sa negativnim statusom katepsina D nije bilo onih sa potvrđenim udaljenim metastazama, dotle su 3 pacijentkinje, od 9 pacijentkinja sa pozitivnim statusom katepsina D i tumorima histološkog gradusa I, imale detektovane udaljene metastaze u toku intervala praćenja toka bolesti. Na slici 4.12. su predstavljene verovatnoće za DFI za pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa I i negativnim, odnosno pozitivnim statusom katepsina D i može se videti da su pacijentkinje sa pozitivnim statusom katepsina D imale nepovoljniji tok bolesti.



Slika 4.11. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa tumorima različitog histološkog gradusa (I, II, III), koje su imale negativan status katepsina D (CD-), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci. U zagradama je prikazan broj pacijentkinja sa potvrđenim udaljenim metastazama i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi. Naznačene p vrednosti se odnose na log-rank test.



Slika 4.12. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa I, koje su imale pozitivan (CD+), odnosno negativan (CD-) status katepsina D, u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci (log-rank test, $p=0,02$). U zagradama je prikazan broj pacijentkinja sa potvrđenim udaljenim metastazama i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi.

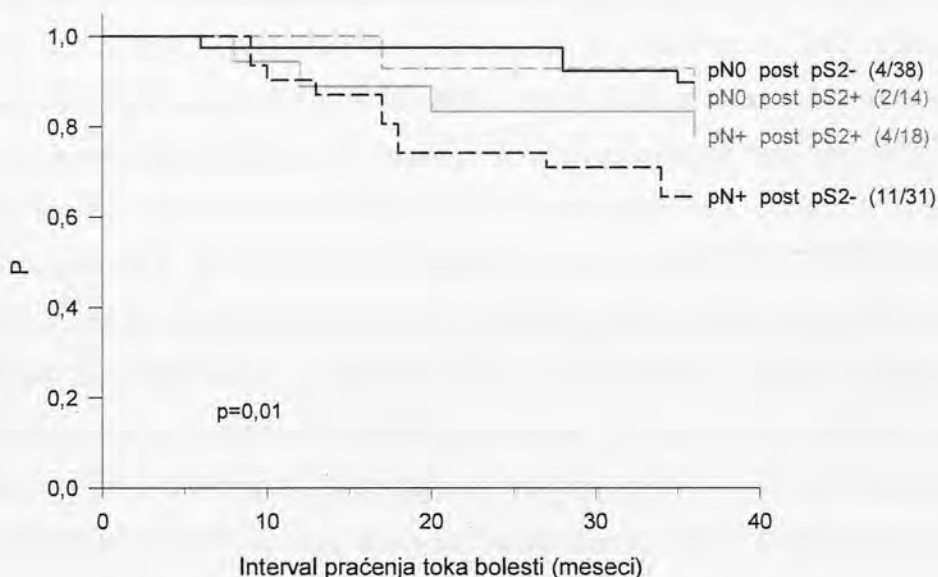
4. 2. 2. Verovatnoća za DFI na osnovu statusa pS2

Na način sličan kao u slučaju katepsina D, status pS2 je određen za 201 pacijentkinju obolelu od karcinoma dojke na osnovu granične vrednosti za ekspresiju pS2 od 15 ng/mg. Ekspresija, odnosno koncentracija pS2 u tumoru dojke koja je bila jednaka ili veća od 15 ng/mg je ukazivala na mogućnost da je ekspresija pS2 u tumoru dojke regulisana dejstvom estrogena i smatrano je da pacijentkinja ima pozitivan status pS2 (pS2+). Nasuprot tome, koncentracija pS2 manja od 15 ng/mg je ukazivala na mogućnost da ekspresija pS2 u tumoru dojke nije regulisana dejstvom estrogena, odnosno da je konstitutivna, i smatrano je da pacijentkinja ima negativan status pS2 (pS2-).

Da bi se ispitaio značaj statusa pS2 u prognozi toka bolesti pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke, analizirane su verovatnoće za DFI na osnovu statusa pS2 u grupama pacijentkinja koje su definisane kombinovanjem parametara domaćina tumora, parametara tumora i statusima steroidnih receptora. Pri tome, rezultati koji su predstavljeni na slikama 4.6. - 4.8. su usmerili dalji tok analize.

4.2.2.1. Verovatnoća za DFI na osnovu statusa pS2 - u grupama pacijentkinja definisanih statusom limfnih čvorova

U odeljku 4.3. je navedeno da su se verovatnoće za DFI statistički značajno razlikovale između grupe pacijentkinja sa pozitivnim i grupe pacijentkinja sa negativnim statusom limfnih čvorova (slika 4.6.). Dalja analiza, u okviru dve navedene grupe pacijentkinja, je pokazala da su se verovatnoće za DFI statistički značajno razlikovale za pacijentkinja koje su, istovremeno, imale i negativan status pS2 (log-rank test, $p=0,002$). Dodatno je, u okviru grupa pacijentkinja sa negativnim statusom pS2, izdvojena grupa postmenopauznih pacijentkinja u kojoj su se verovatnoće za DFI statistički značajno razlikovale za pacijentkinje sa pozitivnim i sa negativnim statusom limfnih čvorova (log-rank test, $p=0,01$), slika 4.13.. Naime, u grupi postmenopauznih pacijentkinja sa negativnim statusom pS2, od 38 pacijentkinja sa negativnim statusom limfnih čvorova, 4 pacijentkinje su imale potvrđene udaljene metastaze, dok je među 31 pacijentkinjom sa pozitivnim statusom limfnih čvorova bilo 11 pacijentkinja sa potvrđenim udaljenim metastazama. Pacijentkinje u prvoj grupi su imale veće verovatnoće za DFI, odnosno povoljniji tok bolesti. Verovatnoće za DFI se nisu značajno razlikovale za pacijentkinje sa pozitivnim statusom pS2, koje su, pri tome, bile postmenopazne i imale pozitivan ili negativan status limfnih čvorova.

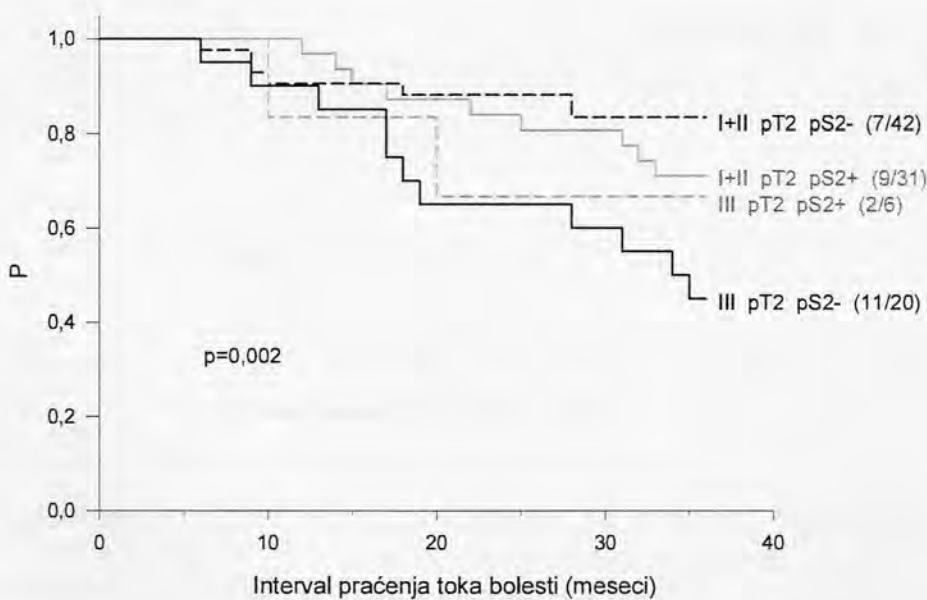


Slika 4.13. – Verovatnoća za DFI (P) za postmenopauzne pacijentkinje sa negativnim ($pN0$) i pozitivnim ($pN+$) statusom limfnih čvorova, koje su imale negativan ($pS2-$, crne linije), odnosno pozitivan status $pS2$ ($pS2+$, sive linije), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci. U zagradama je prikazan broj pacijentkinja kod kojih su detektovane udaljene metastaze i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi. Rezultat log-rank testa ($p=0,01$) se odnosi na grupe pacijentkinja sa negativnim statusom $pS2$.

4.2.2.2. Verovatnoća za DFI na osnovu statusa $pS2$ - u grupama pacijentkinja definisanim histološkim gradusom tumora

Kao što je u odeljku 4.2. predstavljeno, verovatnoće za DFI su se statistički značajno razlikovale između grupa pacijentkinja koje su imale tumore histološkog gradusa I i gradusa III, kao i između grupa pacijentkinja koje su imale tumore histološkog gradusa II i gradusa III, odnosno, verovatnoće se nisu razlikovale između grupa pacijentkinja koje su imale tumore histološkog gradusa I i II (slika 4.7.). Na osnovu ovog rezultata, pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa I i II su analizirane, između ostalog, i kao pacijentkinje koje čine jednu grupu. Kada su pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa I i II analizirane tako da pripadaju istoj grupi, ustanovljeno je da se verovatnoće za interval bez ponovne pojave bolesti, u okviru grupa pacijentkinja sa tumorima histoloških gradusa I+II i III, ne razlikuju značajno kada se one porede između grupa pacijentkinja koje su okarakterisane pozitivnim statusom $pS2$. Međutim, za pacijentkinje sa negativnim statusom $pS2$, verovatnoće za DFI za pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa I+II su se statistički značajno razlikovale od verovatnoća za DFI odgovarajućih pacijentkinjama sa tumorima histološkog gradusa III (log-rank test, $p<0,001$).

Postavilo se pitanje, da li još neki parametar, dodatno, uslovljava postojanje razlike u verovatnoćama za DFI između grupa pacijentkinja sa tumorima različitih histoloških gradusa, a koje imaju negativan status pS2. Nađeno je da su se verovatnoće za DFI statistički značajno razlikovale između grupa pacijentkinja sa tumorima histološkog gradusa I+II, odnosno III, kada su pacijentkinje sa negativnim statusom pS2 imale pT2 tumore (log-rank test, $p=0,002$), slika 4.14.. U grupi pacijentkinja sa tumorima histološkog gradusa I+II, koji su bili jednaki ili veći od 2 cm i sa negativnim statusom pS2, je bilo 42 pacijentkinje, od kojih je 7 bilo sa potvrđenim udaljenim metastazama, dok je u grupi pacijentkinja sa pT2 tumorima histološkog gradusa III i sa negativnim statusom pS2 bilo 20 pacijentkinja, od kojih je za 11 bilo potvrđeno prisustvo udaljenih metastaza. Pri tome su pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa I+II imale veće vrednosti verovatnoća za DFI, odnosno povoljniji tok bolesti. U grupi pacijentkinja koje su imale pT2 tumore i pozitivan status pS2, verovatnoće za DFI se nisu značajno razlikovale za pacijentkinje koje su imale tumore histološkog gradusa I ili II u odnosu na odgovarajuće verovatnoće za pacijentkinje koje su imale tumore histološkog gradusa III.

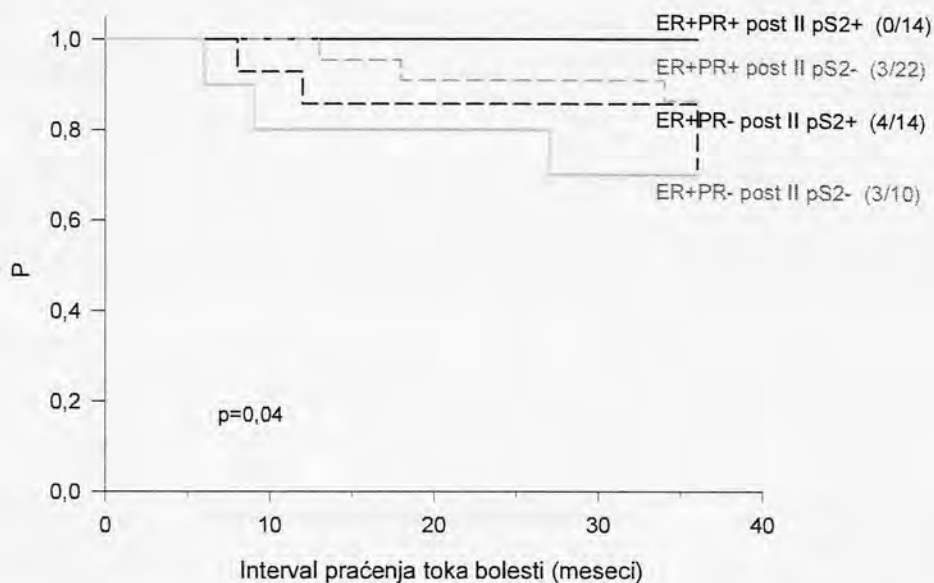


Slika 4.14. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa pT2 tumorima histološkog gradusa I ili II (I+II) i histološkog gradusa III, koje su, istovremeno, imale negativan (pS2-, crne linije), odnosno pozitivan status pS2 (pS2+, sive linije), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci. U zagradama je prikazan broj pacijentkinja kod kojih su detektovane udaljene metastaze i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi. Rezultat log-rank testa ($p=0,002$) se odnosi na grupe pacijentkinja sa negativnim statusom pS2.

Analiza grupe pacijentkinja koje su imale tumore histološkog gradusa II je obezbedila dodatne rezultate. Naime, utvrđeno je da su status menopauze pacijentkinja, zatim kombinovani

statusi ER i PR, kao i status pS2, uslovljavali postojanje razlika u verovatnoćama za DFI između pojedinih grupa pacijentkinja definisanih kombinacijama ovih parametara.

Prvo, nađeno je da su se, u okviru grupe pacijentkinja sa pozitivnim statusom pS2 i sa tumorima histološkog gradusa II, verovatnoće za DFI statistički značajno razlikovale između dve grupe postmenopauznih pacijentkinja, i to grupe sa fenotipom ER+PR+ i grupe sa fenotipom ER+PR- (log-rank test, $p=0,04$). Ove verovatnoće su prikazane na slici 4.15., sa koje se može videti da su pacijentkinje u grupi sa fenotipom ER+PR+ imale veće verovatnoće za DFI, odnosno povoljniji tok bolesti što je posledica činjenice da među 14 pacijentkinja sa fenotipom ER+PR+ nije bilo pacijentkinja sa udaljenim metastazama, kao i da su 4 pacijentkinje, od 14 pacijentkinja sa fenotipom ER+PR-, imale potvrđene udaljene metastaze. Pri tome, verovatnoće za DFI se nisu značajno razlikovale za pacijentkinje koje su imale negativan status pS2.

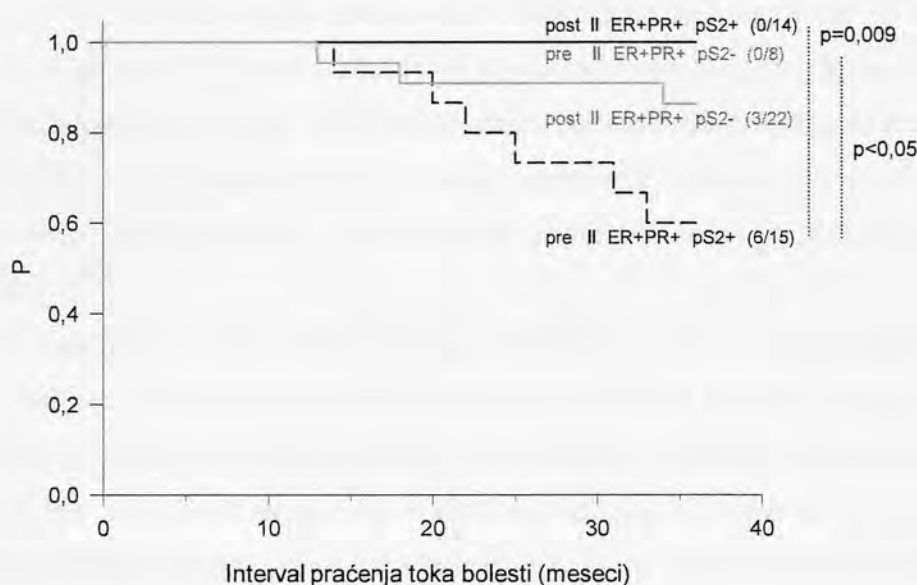


Slika 4.15. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa II i fenotipom ER+PR+, odnosno ER+PR-, koje su, istovremeno, imale pozitivan (pS2+, crne linije), odnosno negativan status pS2 (pS2-, sive linije), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci. U zagradama je prikazan broj pacijentkinja kod kojih su detektovane udaljene metastaze i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi. Rezultat log-rank testa ($p=0,04$) se odnosi na grupe pacijentkinja sa pozitivnim statusom pS2.

Drugo, utvrđeno je da su, u grupi pacijentkinja sa pozitivnim statusom pS2 i sa tumorima histološkog gradusa II, postmenopauzne pacijentkinja sa fenotipom ER+PR+ imale statistički značajno veće verovatnoće za DFI u odnosu na odgovarajuće premenopauzne pacijentkinje (log-rank test, $p=0,009$). Ovaj rezultat je posledica činjenice da je bilo 6 pacijentkinja koje su imale potvrđene udaljene metastaze, u grupi od 15 premenopauznih pacijentkinja dok kod nijedne od 14

postmenopauzних pacijentkinja nisu detektovane udaljene metastaze (slika 4.16.). Verovatnoće za DFI se nisu značajno razlikovale za pacijentkinje sa negativnim statusom pS2.

Treće, pacijentkinje sa fenotipom ER+PR+, koje su bile premenopauzne i imale tumore histološkog gradusa II, su se razlikovale u verovatnoćama za DFI za različite statuse pS2. U prethodnom pasusu je navedeno da su udaljene metastaze detektovane kod 6 premenopauzних pacijentkinja sa fenotipom ER+PR i tumorima histološkog gradusa II, koje su istovremeno imale pozitivan status pS2. Analiza je pokazala da su pacijentkinje sa istim karakteristikama, ali sa negativnim statusom pS2, imale statistički značajno veće verovatnoće za DFI, a shodno tome i povoljniji tok bolesti, jer nijedna od 8 pacijentkinja u grupi nije imala udaljene metastaze (log-rank test, $p < 0,05$).



Slika 4.16. – Verovatnoća za DFI (P) za pre- i postmenopauzne pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa II i fenotipom ER+PR+, koje su, istovremeno, imale pozitivan (pS2+, crne linije), odnosno negativan status pS2 (pS2-, sive linije), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci. U zagradama je prikazan broj pacijentkinja kod kojih su detektovane udaljene metastaze i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi. Rezultati log-rank testa se odnose na grupe: pacijentkinja sa pozitivnim statusom pS2 ($p=0,009$), premenopauzних pacijentkinja ($p < 0,05$).

5. DISKUSIJA

Etiologija, odnosno uzrok nastanka većine karcinoma dojke obuhvata kako genetske tako i faktore okruženja, i moguće je da mnogi od faktora koji su odgovorni za nastanak bolesti još nisu identifikovani. Rast i razvoj karcinoma dojke zahteva koordinisanu interakciju genskih produkata i signalnih puteva u genetski izmenjenim ćelijama karcinoma, kao i provođenje signala između različitih vrsta ćelija, transformisanih i normalnih, koje istovremeno postoje u malignom tumoru. Sa obzirom na činjenicu da postoje različiti podtipovi malignih tumora, sa različitim tipovima ćelija, i da se ćelije u okviru jednog tumora mogu razlikovati po fenotipu i genotipu, karcinom dojke je heterogena bolest što dodatno otežava njegovo lečenje.

Incidencija karcinoma dojke je imala period kontinualnog rasta u mnogim industrijalizovanim zemljama, ali se broj smrtnih ishoda uzrokovanih karcinomom dojke stabilizovao ili čak smanjio u poslednjih 10-15 godina (317) usled značajnog napretka u istraživanjima koja se tiču detekcije i lečenja primarnih karcinoma dojke. Masovni programi preventivnih pregleda su rezultovali ranijom detekcijom i dijagnostikovanjem malih i manje agresivnih tumora, što je, u kombinaciji sa terapijskim poboljšanjima, dovelo do značajnog povećanja broja pacijenata koji su preživeli karcinom dojke.

U ranom karcinomu dojke, maligne ćelije se detektuju samo u tumoru dojke ili u lokalno-regionalnim limfnim čvorovima i za izlečenje bolesti je dovoljna hirurška terapija. Usled depozita malignih ćelija koji mogu biti prisutni lokalno ili na udaljenim mestima u organizmu, kod najvećeg broja pacijentkinja obolelih od primarnog operabilnog karcinoma dojke se, u toku prvih 5 godina nakon hirurške terapije, razvija metastatska bolest za koju nije dovoljna hirurška terapija već se u lečenju primenjuje i adjuvantna sistemska terapija. Sa obzirom na to da je za terapiju vezana i značajna toksičnost, lekari se suočavaju sa problemom balansiranja između rizika i cene koji su povezani sa adjuvantnom sistemskom terapijom, sa jedne strane, i potencijalne koristi za pacijente, sa druge strane. Identifikovanje bilo pacijenata sa niskim rizikom za relaps, za čije izlečenje je dovoljna samo primena lokalno-regionalne terapije, bilo onih sa visokim rizikom, kod kojih je neophodno primeniti agresivnije modalitete terapije, kao i odabir adekvatne sistemske terapije, zasnovano je na korišćenju faktora prognoze/predikcije toka bolesti, na osnovu kojih je moguće doneti odluku o eventualnoj (da/ne), a istovremeno i razumnoj primeni (koja vrsta) adjuvantne sistemske terapije.

Uslovi koje treba da ispuni prognostički/prediktivni faktor, da bi bio klinički prihvaćen su: a) da je njegovo određivanje lako ponovljivo (reproduktivno merenje), b) da je povezan sa povoljnim/nepovoljnim ishodom bolesti u meri da je klinički značajan za pacijenta i c) da

obezbeđuje nezavisnu informaciju, odnosno onu koja se ne može obezbediti putem merenja nekih drugih faktora (318). Važno je da se jasno razluči razlika između prognostičkih i prediktivnih faktora kao i njihove uloge u usmeravanju lečenja pacijenata. Faktori prognoze su povezani sa tokom bolesti pacijenata nezavisno od primenjene terapije (319) i mogu da odražavaju unutrašnje, biološke karakteristike tumora, kao što je njihova sposobnost da proliferišu i metastaziraju. Idealno bi bilo da se prognostička vrednost potencijalnih tumorskih markera ispituje u grupi pacijenata koji nisu primali sistemsku terapiju, sa ciljem da se eliminišu oni efekti terapije koji mogu da izazovu konfuziju u interpretaciji rezultata ispitivanja. To znači da bi novije studije, uz upotrebu najnovijih tehnologija, mogle da budu onemogućene usled neprihvatljivo malog broja uzoraka sa obzirom na to da se sistemska terapija primenjuje kod sve šireg opsega pacijenata sa karcinomom dojke. Prediktivni faktori ukazuju na mogući odgovor pacijenta na određenu sistemsku terapiju ili zato što su direktna meta terapije ili zato što njihova ekspresija predstavlja sekundarni fenomen u mehanizmu delovanja terapije. Mnogi faktori mogu da budu i prognostički i prediktivni, ali njihov značaj u prognozi i predikciji toka bolesti nije jednak.

Trenutno, klinički prihvaćeni klasični faktori za karcinom dojke obuhvataju karakteristike pacijenata i karakteristike koje su povezane sa tumorom. Iako je status limfnih čvorova pazušne jame najznačajniji prognostički faktor za karcinom dojke (320-321), ne postoje dokazi da je ovaj status prediktivan faktor za bilo koju od uobičajeno korišćenih adjuvantnih sistemskih terapija (320). Kako klasični faktori ne omogućavaju da se dovoljno precizno identifikuju pacijenti sa različitim rizicima za relaps, prepoznata je potreba da se pronađu novi, tzv. molekularni markeri. Postoji dugačak spisak potencijalnih prognostičkih/prediktivnih faktora za karcinom dojke koji čine biohemijski markeri, povezani sa različitim ćelijskim funkcijama, kao što su proliferacija, apoptoza, hormonska zavisnost, neo-angiogeneza, invazija i nastanak metastaza. Međutim, za većinu biohemijskih markera, još uvek nije moguće odrediti, na pouzdan i lako ponovljiv način, da li bi oni mogli biti korisni u kliničkom lečenju pacijenata obolelih od karcinoma dojke (49). Jedini izuzeci su merenja ćelijske proliferacije (322) i faktori koji su povezani sa aktivacijom plazminogena (323) za prognozu toka bolesti, te ER, PR i HER2/neu za predviđanje odgovora na hormonsku ili anti-HER2/neu terapiju (97).

Puno informacija o prognostičkim faktorima se dobija na osnovu retrospektivne analize uskladištenih uzoraka tumora usled čega objavljene studije često: a) imaju različite intervale praćenja toka bolesti, koji se uveliko razlikuju i između pacijentkinja u okviru iste studije, b) nemaju potpune podatke vezane za klasične prognostičke faktore, c) nemaju kontrole za određene promenljive i d) koriste mnoštvo različitih završnih tačaka praćenja toka bolesti, kao što su ukupno preživljavanje i interval bez ponovne pojave bolesti. Svi navedeni razlozi otežavaju upoređivanje rezultata različitih studija. Postoje i drugi razlozi zbog kojih su rezultati različitih studija

kontradiktorni i koji otežavaju ili onemogućavaju primenu ispitivanih molekulskih markera kao faktora prognoze/predikcije toka bolesti u kliničkoj praksi. Ti razlozi obuhvataju: a) dizajn studije (prospektivna naspram retrospektivne), b) veličinu studije (broj ispitivanih pacijenata), c) etničko i geografsko poreklo ispitivanih pacijenata, d) izvođenje analize korišćenjem citosolnog ekstrakta dobijenog iz tkiva tumora dojke ili preparata za imunohistohemijsku analizu, što uslovljava izbor metode za određivanje ekspresije ispitivanog faktora, e) metode statističke analize, f) izbor granične vrednosti za definisanje statusa nekog markera.

Prospektivna studija je potrebna da bi se precizno procenila učestalost određenog ishoda bolesti ili relativan rizik za određeni ishod bolesti. Ovakva studija ima manje potencijalnih izvora za sistematsku grešku (tzv. „bias“) koja dovodi do pogrešne procene nekog efekta ili korelacije, u odnosu na retrospektivnu studiju. Iako poželjna, ovakva studija je uglavnom dugotrajna i često je potrebno da prođe više godina ili čak i decenija da bi se prikupilo dovoljno podataka sa ciljem da se izvede neki jasan zaključak. U slučaju bolesti koja postaje klinički evidentna posle dugog vremenskog perioda, obično je neophodno sprovesti retrospektivnu studiju za koju, međutim, neke informacije mogu biti teško dostupne. Veličina studije, odnosno broj pacijenata koji je obuhvaćen studijom, utiče na rezultate statističke obrade i uslovljava mogući prognostički/prediktivni značaj date studije.

Ekspresija katepsina D, odnosno pS2 u malignom tumoru dojke se može odrediti različitim metodama, među kojima su najčešće korišćene ELISA, IRMA, „*western blotting*“ i imunohistohemijska metoda (206, 229, 324). U tu svrhu se koriste ili citosolni ekstrakti dobijeni iz tkiva tumora dojke ili preparati za imunohistohemijsku analizu. U odnosu na studije u kojima su katepsin D, odnosno pS2 analizirani u citosolnom ekstraktu tkiva primarnog karcinoma dojke i čiji su rezultati u velikoj meri usaglašeni, studije u kojima su markeri analizirani imunohistohemijskom metodom su dosta kontradiktorne (110, 223, 231, 325-326). Posledica toga su razlike u zaključcima kako između samih imunohistohemijskih studija, tako i između ovih i studija u kojima su korišćene imunološke metode. Ove razlike mogu biti uslovljene:

- a) razlikom u specifičnosti i osetljivosti metoda (219),
- b) upotrebljenim antitelima (izvor i kvalitet antitela koje je upotrebljeno, a koje se razlikuje među studijama) (218-219, 327),
- c) heterogenošću tumora (u homogenatu iz koga se dobija citosolni ekstrakt su prisutne sve vrste ćelija, a pomoću imunohistohemijske metode može da se ispituje i samo određena vrsta ćelija) (219-220),
- d) promenama antigena zbog standardizovane pripreme uzorka za analizu (procedura fiksacije tkiva, procedura demaskiranja epitopa, uslovi i način čuvanja uzoraka pripremljenih za analizu) (218-219) i/ili

- e) odsustvom standardizacije kvantitativnog određivanja, odnosno kvantifikacije (intenziteta) obojenja imunohistohemijskih preparata (218-219).

Generalno, razlike u metodama merenja, kao i tehnički problemi vezani za standardizaciju metoda, koji su svojstveni nekim metodama, mogu da rezultuju nemogućnošću da se dobiju lako ponovljivi rezultati. Stoga je standardizacija metoda od velikog značaja. U tom smislu je Rochefort (328) sugerisao, 90-tih godina prošlog veka, da ne treba upoređivati studije, u ovom slučaju o katepsinu D, u kojima su podaci dobijeni pomoću dobro standardizovanih metoda, a to su najčešće one u kojima se za analizu koristi citosolni ekstrakt, sa onima u kojima su podaci dobijeni pomoću nestandardizovanih metoda. Najčešće korišćene standardizovane metode za kvantitativno određivanje pS2 i katepsina D u studijama o karcinomu dojke su ELISA i IRMA, zasnovane na tehnici sa 2 monoklonska antitela. Pogodnost ovih eseja je i što se koncentracije pS2 i katepsina D mogu odrediti u istom citosolnom ekstraktu koji se priprema za rutinsko određivanje koncentracija ER i PR (301). Pored toga što je osetljivija, IRMA je metoda za koju je sprovedena kontrola kvaliteta (karakteristike metode su potvrđene pan-evropskom studijom od strane EORTC-a) (329).

Čak i kada postoji saglasnost u vezi metode za određivanje kvantitativnog sadržaja biomarkera, primena neadekvatnih testova statističke analize, selektivan način na koji se podaci analiziraju i neadekvatan vid podataka uslovljavaju krajnje rezultate i mogu da utiču na donošenje pogrešnih zaključaka. U tom smislu, jedna od važnih stavki je sistematska i često nerelevantna kategorizacija kvantitativnih prognostičkih faktora i stoga su date preporuke da je za ispitivanje prognostičkog/prediktivnog značaja nekog biomarkera potrebno imati kontinualne podatke (330-331).

Razlog za kontradiktornost studija, koji je u vezi sa statističkom analizom, je i neusaglašenost oko granične vrednosti za definisanje statusa nekog biomarkera. U većini studija je korišćena jedna, a u nekim studijama i više graničnih vrednosti za ekspresiju prognostičkog/ prediktivnog faktora (204) da bi se podaci grupisali, što olakšava statističku analizu. Za neke faktore postoji saglasnost o tome koje vrednosti bi trebalo da budu granične, dok za druge markere nema ili ima vrlo malo slaganja između različitih laboratorija u vezi definisanja graničnih vrednosti za ekspresiju nekog markera. Grupisanje podataka pomoću unapred-izabranih graničnih vrednosti, iako pojednostavljuje statističku analizu, takođe rezultuje gubitkom informacija koje su dostupne na osnovu originalnih podataka (331). Stoga je i način određivanja/izbora graničnih vrednosti veoma važan. Granične vrednosti mogu biti izabrane korišćenjem ne-proizvoljnih kriterijuma, kao što je podela podataka na osnovu vrednosti medijane ili aritmetičke sredine za koncentraciju biomarkera (332). Idealno je kada se ove vrednosti odrede u preliminarnoj "pilot" studiji i onda potvrde za velike populacije pacijenata, u okviru studija sprovedenih u različitim laboratorijama. Međutim, granične vrednosti se češće biraju *ad hoc*, u pojedinačnoj studiji, specifično zato što pokazuju pozitivnu povezanost sa

tokom bolesti za datu populaciju pacijenata. Tako odabrane granične vrednosti nisu bezuslovno bezvredne, ali njihovo interpretiranje i generalizovanje biva teže.

Iako se broj potencijalnih faktora stalno uvećava, broj klinički-prihvaćenih faktora prognoze/predikcije toka bolesti za karcinom dojke je relativno mali i ostao je, suštinski, nepromenjen u poslednjih 20 godina. Razlog tome je što ni klinički-prihvaćeni markeri nisu idealni i njihova primena ima za posledicu nesvrshodnu primenu terapije, koja je ili nepotrebna ili potrebna, a neefikasna, odnosno nedovoljno agresivna. U tom smislu, opseg raspoloživih terapija za karcinom dojke, zajedno sa rastućim brojem prognostičkih/prediktivnih faktora koji su danas dostupni, ukazuje da bi ispitivanje svakog pacijenta trebalo da bude individualno da bi se što preciznije predvideo prirodan tok bolesti, odnosno odredila optimalna terapija (333). Stoga, precizno funkcionalno klasifikovanje tumora, na osnovu prognostičkih/prediktivnih faktora toka bolesti, i dalje predstavlja važan cilj u istraživanju karcinoma dojke.

5. 1. Raspodela koncentracija

Da bi se tumori što preciznije i što funkcionalnije klasifikovali i time, potencijalno, što tačnije predvideo prirodan/klinički tok karcinoma dojke, potrebno je identifikovati one markere koji mogu da pomognu u postizanju navedenog cilja. Ekspresije katepsina D i pS2 u karcinomu dojke su regulisane delovanjem estrogena, posredstvom ER, ali mogu biti i konstitutivne, odnosno estrogen nezavisne. Pretpostavljeno je da se na osnovu ekspresije ovih proteina u karcinomu dojke mogu identifikovati pacijentkinje sa povoljnim/nepovoljnim tokom bolesti.

U slučaju katepsina D, studije su pokazale da je prekomerna ekspresija katepsina D u karcinomu dojke povezana sa povećanom učestalošću klinički-evidentnih metastaza i kraćim periodom preživljavanja pacijenata (221). Što se tiče ekspresije pS2 u karcinomu dojke, istraživanja sugerišu da prisustvo pS2 uslovljava postojanje razlika između podgrupa pacijenata obolelih od karcinoma dojke u njihovom odgovoru na endokrine tretmane i da, stoga, pS2 može da pomogne u identifikovanju onih pacijenata koji će pozitivno odgovoriti na anti-hormonsku terapiju, čak i u odsustvu bilo ER bilo PR (299). Studije su pokazale da maligni tumori dojke sa pozitivnim statusom pS2 imaju povoljniju prognozu toka bolesti (71).

5. 2. Raspodela koncentracija Katepsina D

Vrednosti koncentracije Katepsina D koje su određene u ispitivanim uzorcima su bile u skladu sa literaturnim podacima. Kao što je prethodno pomenuto, neadekvatna statistička analiza podataka koji su dobijeni tokom istraživanja je jedan od razloga koji mogu da uslove izvođenje pogrešnih zaključaka i da onemoguće potencijalnu praktičnu primenu nekog biomarkera. Da bi se ispitalo da li raspodela učestalosti koncentracija Katepsina D u ispitivanim uzorcima karcinoma dojke odgovara normalnoj raspodeli ili ne, što uslovljava potonju primenu parametrijskih ili neparametrijskih statističkih testova, respektivno, upotrebljen je *Kolomogorov-Smirnov* test. Ustanovljeno je da raspodela učestalosti koncentracija Katepsina D značajno odstupa od normalne raspodele (slika 4.1.) i da je neophodno primeniti neparametrijske testove analize. Kada su vrednosti koncentracija Katepsina D analizirane u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora ili tumora, nađeno je da se koncentracije ne razlikuju između analiziranih grupa, osim između grupa definisanih na osnovu statusa limfnih čvorova, pri čemu su veće vrednosti bile karakteristične za grupu pacijentkinja sa pozitivnim statusom limfnih čvorova. Pored toga, i statusi ER i PR u tumorima pacijentkinja sa kancerom dojke, bilo da su analizirani pojedinačno bilo kombinovano, su, takođe, uslovlili postojanje značajne razlike u vrednostima koncentracija Katepsina D između ispitivanih grupa pacijentkinja. Vrednosti koncentracija Katepsina D su bile veće u grupama pacijentkinja sa pozitivnim statusom ER ili PR, odnosno sa pozitivnim statusom ER kada je analiziran kombinovani status steroidnih receptora. Ovi rezultati su, donekle u saglasnosti sa literaturnim podacima. Naime, u okviru različitih studija je pokazano kako postojanje tako i nepostojanje korelacija Katepsina D sa klasičnim parametrima prognoze/predikcije toka bolesti. U tom pogledu je veoma značajna studija Foekensa i saradnika (237). Ova studija je, zbog broja pacijenata koji su ispitivani (2810 pacijenata) i dugog perioda praćenja toka bolesti (88 meseci), dala ubedljive argumente u korist prognostičke vrednosti Katepsina D, merenog pomoću imunoradiometrijskog eseja. Prema rezultatima ove studije, koncentracija Katepsina D nije bila povezana sa histološkim gradusom tumora, ali je bila povezana sa statusom menopauze i godinama pacijentkinja, statusom limfnih čvorova, veličinom tumora i koncentracijama ER i PR.

Na osnovu dobijenih rezultata, analizirana je raspodela vrednosti koncentracija Katepsina D u grupama pacijentkinja koje su definisane kombinovanjem parametara koji su uslovlili postojanje značajnih razlika (status limfnih čvorova, status steroidnih receptora). Nađeno je da status limfnih čvorova uslovljava postojanje značajne razlike u vrednostima koncentracija Katepsina D između 2 grupe pacijentkinja samo u okviru fenotipa ER-PR-, pri čemu fenotip ER-PR+ nije uzet u obzir za analizu zbog malog broja uzoraka. Treba napomenuti da su se vrednosti koncentracija Katepsina D u

grupi pacijentkinja sa fenotipom ER-PR- i sa negativnim statusom limfnih čvorova, istovremeno, značajno razlikovale i od vrednosti u grupama pacijentkinja sa drugim fenotipovima ER/PR, bez obzira na status limfnih čvorova. Sa slike 4.2. se može videti da, u okviru fenotipa ER-PR-, opsezi koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja sa negativnim, odnosno pozitivnim statusom limfnih čvorova nisu podudarni, već se u određenoj meri razlikuju. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da, pored razlike koja postoji u smislu statističke značajnosti, postoji i biološki značajna razlika između dve posmatrane grupe pacijentkinja. Ako se uzme u obzir pretpostavka da negativni statusi ER i PR ukazuju na to da rast tumora ne zavisi od delovanja estrogena i da signalni put ER, uslovljen delovanjem estrogena, nije funkcionalan, može se pretpostaviti da vrednosti koncentracija katepsina D u grupi pacijentkinja sa negativnim statusom limfnih čvorova odražavaju konstitutivnu ekspresiju katepsina D, dakle nezavisnu od delovanja estrogena, u ćelijama tumora koje se nalaze u fazi uspavanosti. Ćelije tumora mogu da budu ili u stanju S1 ili u stanju S2, organizovane bilo kao pojedinačne ćelije bilo kao mikro-metastaze, pri čemu izostanak angiogeneze sprečava rast ne-angiogenih mikro-metastaza preko određene, mikroskopske veličine, što se označava kao tzv. „kancer bez bolesti“. Shodno tome, vrednosti koncentracija katepsina D u grupi pacijentkinja sa pozitivnim statusom limfnih čvorova, u okviru fenotipa ER-PR-, bi mogle da odražavaju ekspresiju katepsina D, koja nije zavisna od delovanja estrogena, u ćelijama tumora koje se nalaze u stanju koje se označava kao S3, a koje se karakteriše time da su mikro-metastaze izašle iz stanja uspavanosti (14). Sa obzirom na to da se smatra da je, za malignitete koji potiču od epitelnih ćelija, epitelno-mezenhimalni prelaz jedan od ključnih događaja u metastatskom procesu, može se pretpostaviti da je prelaz u stanje S3 posledica ovog prelaza. Kao što je u uvodu napomenuto, epitelno-mezenhimalni prelaz bi mogao da stimuliše epitelne ćelije karcinoma dojke da steknu karakteristike „stem“ ćelija kancera koje su sposobne da se neograničeno samo-obnavljaju i, konačno, dovedu do stvaranja klinički-evidentnih metastaza (42). Takođe se može pretpostaviti da je maksimalna vrednost koncentracije katepsina D od 37,3 pmol/mg, određena u grupi pacijentkinja sa negativnim statusima limfnih čvorova, ER i PR, približna maksimalnoj vrednosti koncentracije katepsina D u ćelijama tumora koje su, još uvek, u fazi uspavanosti i u kojima ekspresija katepsina D nije zavisna od delovanja estrogena.

U uvodu je već napomenuta činjenica da je veličina malignog tumora dojke značajno povezana sa statusom limfnih čvorova, te je analizirana i raspodela vrednosti koncentracija katepsina D u grupama bolesnica definisanim veličinom tumora i statusom steroidnih receptora. Slično prethodnoj analizi, utvrđeno je da, samo u okviru fenotipa ER-PR-, postoji značajna razlika u vrednostima koncentracija katepsina D između 2 grupe pacijentkinja definisanih na osnovu veličine tumora. Opseg vrednosti koncentracija katepsina D u 2 posmatrane grupe pacijentkinja, takođe, nije bio podudaran. Vrednosti koncentracija katepsina D u grupi pacijentkinja sa fenotipom ER-PR- i sa

malim tumorima su se, istovremeno, značajno razlikovale i od vrednosti u grupama pacijentkinja sa drugim fenotipovima ER/PR, bez obzira na veličinu tumora. Kao i u slučaju analize pacijentkinja sa fenotipom ER-PR- i sa različitim statusima limfnih čvorova, i u ovom slučaju se može pretpostaviti da vrednosti koncentracija katepsina D u grupi pacijentkinja sa malim tumorima i fenotipom ER-PR odražavaju konstitutivnu, tj. estrogen-nezavisnu ekspresiju katepsina D u ćelijama tumora koje se nalaze u fazi uspavanosti i u kojima još nije došlo do epitelno-mezenhimalnog prelaza i pojave "stem" ćelija kancera. Nasuprot tome, vrednosti u grupama pacijentkinja sa velikim tumorima i fenotipom ER-PR-, verovatno, odražavaju konstitutivnu ekspresiju katepsina D u ćelijama koje su pretrpele epitelno-mezenhimalni prelaz i u kojima su se, verovatno, pojavile "stem" ćelije kancera koje su sposobne da se neograničeno samo-obnavljaju i, time, dovedu do stvaranja klinički-evidentnih metastaza (42). I u ovom slučaju se može pretpostaviti da je maksimalna vrednost koncentracije katepsina D od 38,7 pmol/mg, određena u grupi pacijentkinja sa negativnim statusima limfnih čvorova, ER i PR, približna maksimalnoj vrednosti koncentracije katepsina D u ćelijama tumora koje su, još uvek, u fazi uspavanosti i u kojima je ekspresija katepsina D nezavisna od dejstva estrogena.

Na osnovu rezultata dobijenih pri analizi raspodele vrednosti koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja koje su definisane kombinovanjem statusa steroidnih receptora sa statusom limfnih čvorova ili veličinom tumora, vrednost koncentracije katepsina D od 39 pmol/mg je definisana kao granična vrednost za koncentracije katepsina D na osnovu koje je definisan status katepsina D u ispitivanim uzorcima kancera dojke (334). Za vrednosti koncentracije katepsina D koje su bile manje od granične vrednosti, status katepsina D je bio definisan kao negativan, dok je za vrednosti koncentracije katepsina D koje su bile jednake ili veće od granične, status katepsina D bio definisan kao pozitivan.

Sa obzirom na to da su se vrednosti koncentracije katepsina D u grupama pacijentkinja definisanih statusom limfnih čvorova ili statusom steroidnih receptora značajno razlikovale, postavilo se pitanje da li će se i statusi katepsina D u navedenim grupama pacijentkinja značajno razlikovati. Pretpostavljeno je da bi odabrana granična vrednost za koncentracije katepsina D, ukoliko je približna nekoj pretpostavljenoj graničnoj vrednosti koja ima biološku značajnost, trebalo da uslovi postojanje značajne razlike i u statusima katepsina D između navedenih grupa pacijentkinja. Ova pretpostavka je potvrđena jer je upotrebom Hi-kvadrat testa utvrđeno da postoje značajne razlike u statusima katepsina D između grupa pacijentkinja koje su definisane bilo statusom limfnih čvorova bilo pojedinačnim ili kombinovanim statusom steroidnih receptora.

5. 3. Raspodela koncentracija pS2

Vrednosti koncentracije pS2 koje su određene u ispitivanim uzorcima su bile u skladu sa literaturnim podacima. Pomoću *Kolmogorov-Smirnov* testa je ustanovljeno da raspodela učestalosti koncentracija pS2 značajno odstupa od normalne raspodele (slika 4.4.) i da je neophodno primeniti neparametrijske statističke testove za dalju analizu. Analiza koncentracija pS2 je pokazala da se vrednosti koncentracija pS2 značajno razlikuju između grupa definisanih na osnovu statusa menopauze pacijentkinja, histološkog gradusa tumora ili pojedinačnog/kombinovanog statusa steroidnih receptora. Ovi rezultati su u saglasnosti sa nekim literaturnim podacima, dok su u suprotnosti sa drugim, jer se u literaturi mogu naći različite informacije o povezanosti koncentracija pS2 sa klasičnim i biohemijskim parametrima prognoze/predikcije toka bolesti.

Na osnovu dobijenih rezultata, analizirana je raspodela vrednosti koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja koje su definisane kombinovanjem statusa menopauze pacijentkinja, statusa steroidnih receptora i histološkog gradusa tumora. Nađeno je da podela pacijentkinja prema statusu ER uslovljava značajne razlike u vrednostima koncentracija pS2 u okviru grupe postmenopauznih pacijentkinja koje su imale tumore histološkog gradusa II, kao i u okviru grupe premenopauznih pacijentkinja koje su imale tumore histološkog gradusa II. Pri tome, opsezi koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja sa negativnim, odnosno pozitivnim statusom ER nisu bili podudarni. Ovaj rezultat ukazuje na mogućnost da razlika u koncentracijama pS2, koja postoji između grupa pacijentkinja sa različitim statusom ER, pored statističke ima i biološku značajnosti. Kada su rezultati analize predstavljeni grafički (slika 4.5.), uočeno je da se veoma slična raspodela vrednosti koncentracija pS2 dobija i u grupama pacijentkinja sa različitim statusom ER, koje su bile postmenopauzne i imale tumore histološkog gradusa III. Iako su opsezi koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja sa negativnim, odnosno pozitivnim statusom ER, u okviru poslednjeg fenotipa, bili nepodudarni, vrednosti koncentracija pS2 se nisu značajno razlikovale prema statusu ER. Iako nema statistički značaj, ovaj rezultat je interesantan zbog određivanja granične vrednosti za ekspresiju pS2. Naime, činjenica da vrednosti koncentracije pS2 u grupi pacijentkinja sa negativnim statusom ER nisu bile veće od 15 ng/mg proteina, kako u slučaju dva fenotipa u okviru kojih je nađena razlika u koncentracijama pS2 za pacijentkinje sa različitim statusima ER, tako i u slučaju fenotipa u kome razlika nije nađena (slika 4.5.), ukazuje na to da je koncentracija pS2 od 15 ng/mg približna maksimalnoj vrednosti koncentracije pS2 u onim ćelijama tumora u kojima ekspresija pS2 nije kontrolisana delovanjem estrogena. Stoga je vrednost koncentracije pS2 od 15 ng/mg definisana kao granična vrednost za koncentracije pS2 na osnovu koje je definisan status pS2 u ispitivanim uzorcima kancera dojke (334). Za vrednosti koncentracije pS2 koje su bile manje od

granične vrednosti, status pS2 je bio definisan kao negativan, dok je za vrednosti koncentracije pS2 koje su bile jednake ili veće od granične, status pS2 bio definisan kao pozitivan.

Upotrebom Hi-kvadrat testa, a na osnovu definisane granične vrednosti za koncentracije pS2, je ispitivano da li između grupa pacijentkinja, za koje su nađene statistički značajne razlike u vrednostima koncentracija pS2, postoji i statistički značajne razlike u statusima pS2. Za razliku od katepsina D, u slučaju pS2 nije dobijena podudarnost grupa jer je ustanovljeno postojanje značajnih razlika u statusima pS2 samo između grupa pacijentkinja koje su definisane pojedinačnim ili kombinovanim statusom steroidnih receptora.

Važno je naglasiti da se granične vrednosti za ekspresiju katepsina D i za ekspresiju pS2, koje su definisane u ovom istraživanju, razlikuju od graničnih vrednosti korišćenih u drugim istraživanjima ne samo po brojnim vrednostima već i po načinu na koji su određene jer su, u većini studija, za granične vrednosti za ekspresije ovih proteina birane uglavnom vrednosti koje imaju statistički značaj, kao što su 25 %-na, 50 %-na ili 75 %-na vrednost koncentracije, ili vrednosti koje imaju klinički značaj, ali ne i jasnu biološku osnovu, kao što je vrednost koja se dobija prilikom analiziranja verovatnoća za DFI, a koja odgovara tzv. "minimalnoj p vrednosti". Pregled literature pokazuje da granične vrednosti za ekspresije pS2 i katepsina D, do sada, nisu određivane na način na koji je to urađeno u ovom istraživanju.

5. 4. Verovatnoće za DFI

Prognostički/prediktivni značaj nekog parametra se ispituje analiziranjem toka bolesti pacijenata u okviru određenog vremenskog perioda nakon hirurške terapije. Broj pacijenata kod kojih su se razvile udaljene metastaze i broj pacijenata sa smrtnim ishodom, uslovljen karcinomom dojke, nije konstantan tokom perioda praćenja toka bolesti. Postavlja se pitanje da li svi prognostički/prediktivni faktori, koji su dostupni i određeni u momentu hirurške terapije, zadržavaju svoj potencijalni prognostički/prediktivni značaj za dalje praćenje toka bolesti, nekoliko godina nakon hirurške terapije, ili su ovi faktori vremenski-zavisne promenljive (362-363). Pokazano je da veličina tumora zadržava prognostički značaj do 7 godina nakon hirurške terapije (335), dok prognostički značaj ER, koji je najveći neposredno nakon hirurške terapije, ne može da se održi dugoročno. Hilsenbeck je pokazao poboljšanu prognozu toka bolesti za pacijentkinje sa ER+ tumorima tokom prve 3 godine praćenja toka bolesti, ali ne i posle 3 godine (94). ER je, takođe, imao prediktivni značaj za rani relaps (u periodu od 2,5 godine nakon hirurške terapije), ali je pokazano da se taj značaj smanjuje tokom vremena (335).

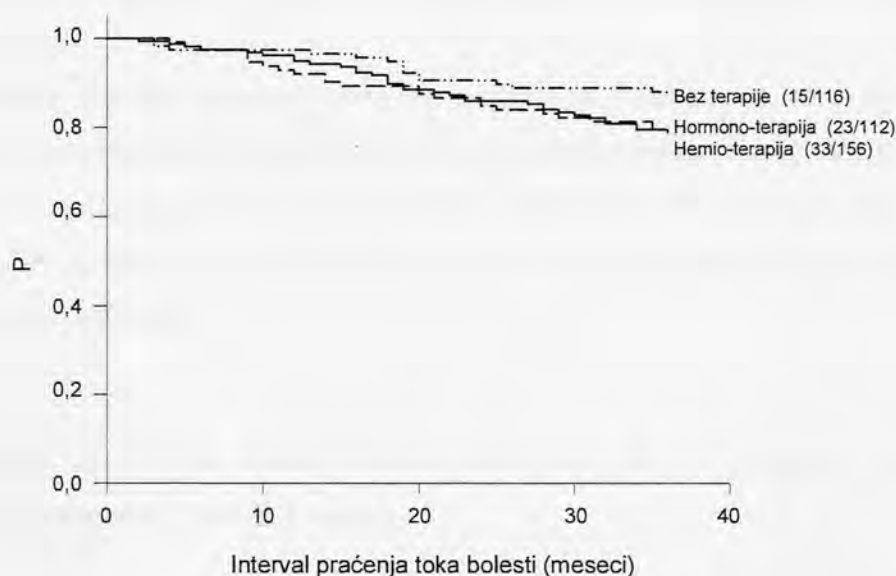
Katepsin D i pS2 su proteini čije ekspresije zavise od delovanja estrogena preko ER tako da je za očekivati postojanje povezanosti koncentracija dva ispitivana proteina sa koncentracijom ER u karcinomu dojke. U našem istraživanju je, pomoću *Spearman*-ovog testa za korelaciju rangova, utvrđeno da postoji statistički značajna korelacija između koncentracije bilo katepsina D bilo pS2 i koncentracije ER ($\rho=0,23$ i $\rho=0,3$, respektivno, pri čemu je $p<0,001$ u oba slučaja). Sledstveno, za očekivati je da se i prognostički/prediktivni značaj katepsina D, odnosno pS2 menja tokom dužeg perioda praćenja toka bolesti. Stoga je težnja u ovom istraživanju bila da se prognostički/prediktivni značaj katepsina D i pS2 ispita u vremenskom periodu koji je dovoljno dug da bi bio relevantan, a koji istovremeno i dovoljno kratak da se u njemu održi nepromenjenim potencijalni prognostički/prediktivni značaj ovih biomarkera.

U studijama u kojima se ispituje prognostički/prediktivni značaj nekog parametra, period praćenja toka bolesti pacijentkinja bez relapsa varira tako da se tok bolesti ovih pacijentkinja prati od par meseci do par desetina meseci, a u nekim studijama i do 10-15 godina, što uslovljava i razlike u medijanama perioda praćenja toka bolesti. Sa obzirom na neujednačenost perioda praćenja toka bolesti pacijentkinja bez relapsa, kako u okviru pojedinačnih studija, tako i između različitih studija, za očekivati je da rezultati pojedinih studija, kao i njihovo poređenje, mogu biti diskutabilni. Iz ovog razloga je težnja u ovom istraživanju bila da vremenski period praćenja toka bolesti za sve ispitivane pacijentkinje bude ujednačen.

Kao što je već napomenuto, kod najvećeg dela pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke se metastatska bolest razvija u periodu do 3 godine nakon hirurške terapije. U slučaju pacijentkinja koje nisu bile lečene adjuvantnom sistemskom terapijom, može se pretpostaviti da udaljene metastaze nastaju kao posledica prirodne agresivnosti tumora. Moguće je da je ova agresivnost posledica prisustva "stem" ćelija kancera. Pored toga, rezultati nekih studija ukazuju da je manja populacija malignih ćelija, u okviru heterogenog tumora dojke, već programirana da metastazira, prvenstveno, u nekom specifičnom organu (48). Za pacijentkinje koje su lečene adjuvantnom sistemskom terapijom može se pretpostaviti da su udaljene metastaze posledica *de novo* rezistencije na terapiju. Pretpostavlja se da većina "stem" ćelija kancera izbegava dejstvo citotoksičnih terapija preko aktivnih mehanizama. Klinički značajna karakteristika "stem" ćelija je da one mogu da sadrže visoke koncentracije specifičnih proteina koji su transporteri za lekove i preko kojih se hemioterapeutske agense izbacuju van ćelije (48). Smatra se i da su neaktivne "stem" ćelije kancera, koje mogu da uđu u stanje mirovanja i da odgovaraju „uspavanim“ ćelijama kancera, otpornije na delovanje terapijskih agenasa (336). Ako se maligni tumor održava pomoću male subpopulacije "stem" ćelija kancera, čije je konstitutivno svojstvo da su otporne na terapijske agense, primena terapije za lečenje tumora rezultira u selektivnom ubijanju „netumorigenih“ ćelija, koje su diferencirane u većoj meri i koje čine tumorsku masu, dok „stem“ ćelije kancera

preživljavaju i ostaju sposobne da nastave sa održavanjem i/ili ponovnom inicijacijom rasta tumora na metastatskom mestu. Neki klinički dokazi ukazuju na to da se pojava klonova ćelija tumora koji su otporni na citotoksične lekove dešava usled višestrukih mutacija i klonske selekcije (336).

U našoj laboratoriji su sprovedene tri odvojene studije, pri čemu su u svakoj od studija sve ispitivane pacijentkinje bile ili lečene istom vrstom adjuvantne sistemske terapije (samo hemio-terapijom ili samo hormonskom terapijom) ili uopšte nisu bile lečene adjuvantnom sistemskom terapijom. Analizom podataka iz te tri studije je ustanovljeno da se prirodan i klinički tok bolesti pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke ne razlikuju značajno u toku prve 3 godine nakon hirurške terapije (slika 5.1.). Imajući na umu neujednačenost perioda praćenja toka bolesti u studijama i njihov potencijalni uticaj na rezultat analize, zatim potencijalnu zavisnost prognostičkog značaja markera od dužine perioda praćenja toka bolesti, kao i učestalost pojave metastaza, period praćenja toka bolesti u ovoj studiji je bio ujednačen, odnosno bio je 36 meseci za sve pacijentkinje obolele od karcinoma dojke koje nisu razvile udaljene metastaze.



Slika 5.1. - Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje koje su primale samo hormonsku (— —) ili samo hemijsku (—) terapiju ili uopšte nisu primale (— · —) adjuvantnu sistemsku terapiju.

Idealna studija za ispitivanje kliničke vrednosti nekog faktora prognoze bi trebala da bude prospektivna, za definisan broj pacijenata, korišćenjem unapred izabrane metode i unapred definisane granične vrednosti za ekspresiju datog faktora. Sa ciljem da se izbegne diskutabilan uticaj terapije, studijom bi trebalo da budu obuhvaćeni samo pacijenti koji nisu primili adjuvantnu sistemsku terapiju. Kao što je već napomenuto, adjuvantna sistemska terapija se primenjuje u sve širem opsegu pacijenata sa primarnim operabilnim karcinomom dojke, te bi studije, u kojima bi se

ispitivao prognostički značaj nekog markera u užem smislu, mogle da budu, praktično, nemoguće zbog neprihvatljivo malog broja uzoraka. Stoga ispitivanje prognostičkog značaja nekog markera u širem smislu, odnosno nezavisno od terapije, postaje opravdano.

Verovatnoće za DFI se nisu značajno razlikovale između grupa pacijentkinja koje su bile definisane samo na osnovu statusa katepsina D ili statusa pS2, što ukazuje na to da u slučaju pacijentkinja obolelih od kancera dojke ni katepsin D ni pS2 nisu nezavisni parametri prognoze toka bolesti. Stoga su verovatnoće za DFI analizirane u grupama pacijentkinja koje su bile definisane kombinovanjem klasičnih i/ili biohemijskih faktora sa statusom katepsina D ili pS2, da bi se ustanovilo da li status ispitivanih proteina ima prognostički značaj za karcinom dojke. Na osnovu rezultata ovakve analize, očekivalo se da bi kombinovanje faktora omogućilo da se preciznije identifikuju:

- pacijenti sa niskim rizikom za relaps, kojima primena adjuvantne sistemske terapije ne bi obezbedila dovoljno veliku korist da bi se opravdali rizici njene primene i koji, stoga, mogu biti pošteđeni adjuvantne sistemske terapije,
- pacijenti sa visokim rizikom za relaps, u slučaju kada se pacijenti ne leče adjuvantnom sistemskom terapijom.

Da bi se tok analize donekle usmerio, prvo su analizirane verovatnoće za DFI u grupama pacijentkinja definisanim pojedinačnim klasičnim ili biohemijskim faktorima. Utvrđeno je da status limfnih čvorova, histološki gradus tumora i status PR uslovljavaju statistički značajne razlike u verovatnoćama za DFI između grupa pacijentkinja. Ovakav nalaz je u skladu sa opšte prihvaćenim rezultatima u kliničkoj onkologiji.

5. 4. 1. Verovatnoće za DFI na osnovu statusa katepsina D - u grupama pacijentkinja definisanim statusom limfnih čvorova

U okviru analize kojom se ispitivao značaj statusa katepsina D, ustanovljeno je da razlika u verovatnoćama za DFI, između grupa pacijentkinja definisanih statusom limfnih čvorova, potiče od pacijentkinja sa pT2 tumorima. Uzimanjem u obzir i statusa katepsina D u grupama pacijentkinja sa pozitivnim statusom limfnih čvorova i pT2 tumorima, pokazalo se da status katepsina D uslovljava statistički značajno različite verovatnoće za DFI. Kada je status katepsina D bio negativan, navedene verovatnoće za DFI su bile određene statusom limfnih čvorova i sa slike 4.9. se može videti da su pacijentkinje sa negativnim statusom limfnih čvorova imale statistički značajno veće verovatnoće za DFI u odnosu na pacijentkinje sa pozitivnim statusom limfnih čvorova. Međutim, kada je status katepsina D bio pozitivan, status limfnih čvorova nije imao značaj za pacijentkinje sa

pT2 tumorima jer se verovatnoće za DFI pacijentkinja sa različitim statusom limfnih čvorova nisu značajno razlikovale. Istovremeno, ove verovatnoće se nisu značajno razlikovale ni od verovatnoća koje su se odnosile na pacijentkinje sa negativnim statusom limfnih čvorova i negativnim statusom katepsina D. Stoga su pacijentkinje, čiji su tumori bili okarakterisani nepovoljnim kliničko-patološkim parametrima (pN+ i pT2), imale povoljniji tok bolesti kada je status katepsina D bio pozitivan, odnosno kada je njegova ekspresija bila zavisna od delovanja estrogena.

Na osnovu ovih rezultata se može pretpostaviti da u pT2 tumorima katepsin D ima značajnu ulogu u procesu apoptoze (193). Naime, u velikim tumorima je tok bolesti pacijentkinja, verovatno, uslovljen statusom limfnih čvorova sve dok je koncentracija katepsina D manja od granične vrednosti, tj. nezavisna od delovanja estrogena, jer tada katepsin D ne učestvuje u signalnom putu za apoptozu, odnosno ne stimuliše apoptozu u dovoljnoj meri. Međutim, pri koncentracijama katepsina D koje su zavisne od delovanja estrogena, odnosno veće od granične vrednosti, katepsin D aktivira neki od signalnih puteva za apoptozu što ima za posledicu da pacijentkinje sa pozitivnim statusom katepsina D imaju povoljniji tok bolesti.

Dodatnom analizom u grupama pacijentkinja definisanim na osnovu statusa limfnih čvorova je ustanovljeno da postoji statistički značajna razlika u verovatnoćama za DFI u okviru grupe pacijentkinja sa pozitivnim statusom limfnih čvorova koje su, pri tome, imale tumore histološkog gradusa III. Razlika je bila uslovljena statusom katepsina D tako da su pacijentkinje sa pozitivnim statusom katepsina D imale statistički značajno veće verovatnoće za DFI u odnosu na pacijentkinje sa negativnim statusom katepsina D. Na osnovu ovog rezultata se može pretpostaviti da, u tumorima koji su izrazito proliferativni i koji su se rasejali u limfne čvorove, katepsin D ima ulogu u procesu apoptoze (193, 195). Pozitivan status katepsina D uslovljava stimulisanje procesa apoptoze, verovatno usled toga što se aktivira signalni put za apoptozu u kome učestvuje katepsin D, što ima za posledicu da pacijentkinje sa estrogen-zavisnim koncentracijama katepsina D imaju povoljniji tok bolesti.

Navedeni rezultati su protivni rezultatima studija prema kojima je katepsin D nepovoljan parametar prognoze toka bolesti (139, 205, 337). Rezultati analize u ovoj studiji ukazuju na pozitivnu ulogu katepsina D, odnosno ulogu njegove estrogen-zavisne ekspresije i to u tumorima koji su okarakterisani veoma nepovoljnim kliničko-patološkim parametrima (pN+ i pT2/gradus III).

Sa evolucione tačke gledišta, postojanje različitih signalnih puteva za iniciranje apoptoze, u kojima verovatno učestvuje i katepsin D, bi trebalo da zaštiti ćelije od kancerogenih transformacija. Stoga bi mogućnost divergencije signalnih puteva mogla da bude objašnjenje za relativno retku pojavu kancera, uzimajući u obzir veoma veliki broj mutacija i grešaka prilikom deoba ćelija u toku života svakog organizma.

5. 4. 2. Verovatnoće za DFI na osnovu statusa katepsina D - u grupama pacijentkinja definisanim histološkim gradusom

Kada je analiziran značaj statusa katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim na osnovu histološkog gradusa tumora, nađeno je da, u slučaju negativnog statusa katepsina D, tok bolesti pacijentkinja zavisi od histološkog gradusa tumora. Sa slike 4.11 se može videti da su najpovoljniji tok bolesti imale pacijentkinje čiji su tumori bili najpovoljnijeg histološkog gradusa (gradus I), dok su pacijentkinje čiji su tumori bili najnepovoljnijeg histološkog gradusa (gradus III) imale najnepovoljniji tok bolesti. Pri tome su se verovatnoće za DFI statistički značajno razlikovale između tri grupe pacijentkinja. U slučaju pozitivnog statusa katepsina D, tok bolesti pacijentkinja nije zavisio od histološkog gradusa tumora jer se verovatnoće za DFI ovih pacijentkinja nisu značajno razlikovale.

Na osnovu ovog rezultata se može pretpostaviti da, u tumorima u kojima je ekspresija katepsina D nezavisna od estrogena, protein nije aktivan ili, bar, nema značajnu ulogu u procesima proliferacije i diferencijacije tumora. Međutim, pri koncentraciji katepsina D koja je zavisna od delovanja estrogena, može se pretpostaviti da protein ima ulogu u pomenutim procesima, ali ta uloga nije jasna. Verovatnoće za DFI pacijentkinja sa pozitivnim statusom katepsina D su ujednačene i ne ukazuju ni na povoljniji ni na nepovoljniji tok bolesti pacijentkinja te se na osnovu toga ne može izvesti neki zaključak. Međutim, kada se analizira značaj statusa katepsina D u grupama pacijentkinja koje su imale tumore određenog histološkog gradusa, može se pretpostaviti da postoji suštinska razlika vezana za ulogu katepsina D u tumorima različitog histološkog gradusa.

Pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa III su imale veće verovatnoće za DFI kada je status katepsina D bio pozitivan. Pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa III i sa pozitivnim statusom limfnih čvorova su imale statistički značajno veće verovatnoće za DFI kada je status katepsina D bio pozitivan. Dakle, u tumorima nepovoljnog histološkog gradusa, pozitivan status katepsina D je bio povoljan parametar usled pretpostavljene uloge katepsina D u stimulisanju apoptoze. Nasuprot tome, u tumorima histološkog gradusa I, pozitivan status katepsina D je bio nepovoljan prognostički parametar jer je uslovljavao da pacijentkinje sa pozitivnim statusom imaju statistički značajno manje verovatnoće za DFI u odnosu na pacijentkinje sa negativnim statusom katepsina D, što je u skladu sa većinom literaturnih podataka o katepsinu D kao nepovoljnom prognostičkom parametru.

Može se pretpostaviti da u tumorima histološkog gradusa I, koji su dobro diferentovani i slabo proliferativni, nasuprot tumora histološkog gradusa III, katepsin D ima ulogu u procesu proliferacije malignih ćelija (169). Kada je koncentracija katepsina D u ćelijama tumora veća od granične

vrednosti, verovatno dolazi do aktivacije određenog signalnog puta kojim se stimuliše proces proliferacije tumorskih ćelija. Na mogući značaj uloge katepsina D u procesu proliferacije ćelija tumora ukazuje i rezultat prema kome nijedna od ispitanih pacijentkinja sa tumorima histološkog gradusa I i sa negativnim statusom katepsina D nije imala relaps u toku perioda praćenja toka bolesti. Za izlečenje pacijentkinja sa navedenim karakteristikama bi, verovatno, bila dovoljna samo hirurška terapija.

5. 4. 3. Verovatnoće za DFI na osnovu statusa pS2 - u grupama pacijentkinja definisanim statusom limfnih čvorova

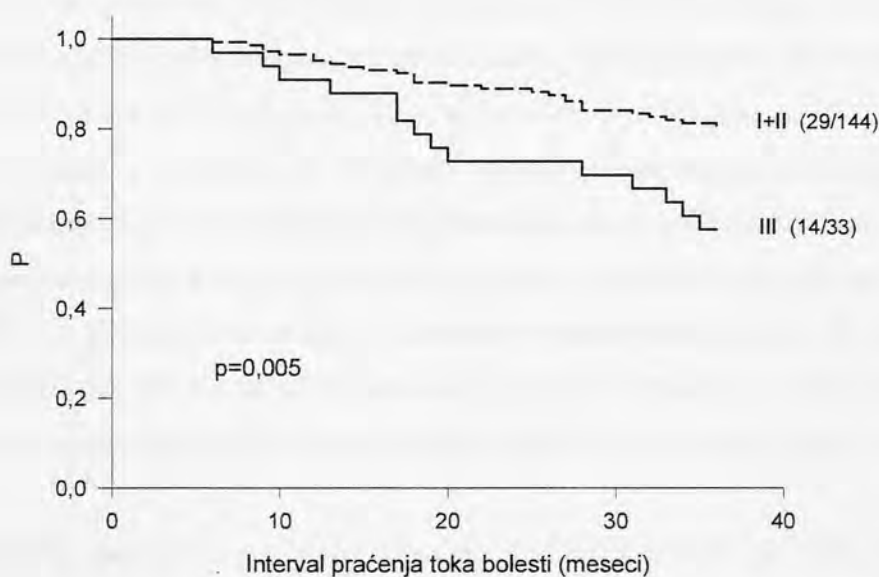
Pri ispitivanju značaja statusa pS2, utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u verovatnoćama za DFI između grupa pacijentkinja sa negativnim, odnosno pozitivnim statusom limfnih čvorova i da razlika potiče od pacijentkinja sa estrogen-nezavisnim koncentracijama pS2. Za pacijentkinje sa estrogen-zavisnim koncentracijama pS2, verovatnoće se nisu značajno razlikovale bez obzira na status limfnih čvorova pacijentkinja. Dalja analiza je pokazala da su se verovatnoće za DFI statistički značajno razlikovale i između grupa pacijentkinja sa negativnim statusom pS2 i sa različitim statusima limfnih čvorova, ukoliko su pacijentkinje bile postmenopauzne, dok razlika nije nađena između grupa premenopauznih pacijentkinja. Ni u ovom slučaju se, za pacijentkinje sa pozitivnim statusom, tj. estrogen-zavisnim koncentracijama pS2, verovatnoće za DFI nisu značajno razlikovale bez obzira na status limfnih čvorova pacijentkinja. Iako se verovatnoće za DFI nisu statistički značajno razlikovale u slučaju premenopauznih pacijentkinja, verovatnoće su zavisile od intervala praćenja toka bolesti na sličan način kao u slučaju postmenopauznih pacijentkinja. Ta činjenica ukazuje, sa jedne strane, na mogućnost da je nepostojanje značajne razlike, možda, posledica nedovoljnog broja pacijentkinja u analiziranim podgrupama. Ukoliko se isključi ta mogućnost, objašnjenje za nađenu razliku u verovatnoćama za DFI između podgrupa postmenopauznih pacijentkinja se može naći u načinu aktivacije ER. Poznato je da je ekspresija gena za pS2 regulisana posredstvom ER. Pri tome, ER može biti aktiviran delovanjem estrogena - ligand-zavisna aktivacija (338). Međutim, evolucionari dokazi sugerišu da transkripcija gena za pS2 može da bude aktivirana i nezavisno od estrogena, odnosno posredstvom ER koji ne odgovara na delovanje estrogena već deluje kao konstitutivni transkripcioni aktivator - ligand-nezavisna aktivacija (339).

Stoga se može pretpostaviti da, u slučaju postmenopauznih pacijentkinja, pri niskim koncentracijama pS2 u tumorima, dominantno dolazi do ligand-nezavisne aktivacije ER koja dovodi do aktivacije određenog signalnog puta. U okviru tog pretpostavljenog signalnog puta, pozitivan

status limfnih čvorova, verovatno, uslovljava nastanak udaljenih metastaza, moguće zbog povećane proliferacije. Moguće je da prisustvo pS2 u koncentracijama koje su veće od pretpostavljene granične vrednosti dovodi do aktivacije mehanizma, odnosno signalnog puta koji sprečava maligne ćelije tumora da proliferišu (287) i da prođu metastatsku kaskadu (283), što uslovljava da se verovatnoće za DFI pacijentkinja sa pozitivnim statusom pS2 ne razlikuju značajno.

5. 4. 4. Verovatnoće za DFI na osnovu statusa pS2 - u grupama pacijentkinja definisanim histološkim gradusom

Sa obzirom na to da je nađena statistički značajna razlika u verovatnoćama za DFI između grupa pacijentkinja sa tumorima histološkog gradusa I i III, kao i između grupa pacijentkinja sa tumorima histološkog gradusa II i III, pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa I ili II su analizirane kao da pripadaju istoj grupi. Nađeno je da postoji statistički značajna razlika u verovatnoćama za DFI između grupa pacijentkinja sa tumorima histoloških gradusa I/II i III ($p=0,005$, slika 5.2.). Postavilo se pitanje da li neki dodatni parametri uslovljavaju postojanje te razlike.



Slika 5.2. - Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa I ili II (I+II), odnosno histološkog gradusa III, u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci (log-rank test, $p=0,005$). U zagradama je prikazan broj pacijentkinja sa potvrđenim udaljenim metastazama i ukupan broj pacijentkinja u datoj grupi.

Utvrđeno je da je razlika u verovatnoćama za DFI bila uslovljena tumorima koji su bili jednaki ili veći od 2 cm, i to u grupi pacijentkinja sa estrogen-nezavisnim koncentracijama pS2, dok u grupi pacijentkinja sa estrogen-zavisnim koncentracijama pS2 razlika u verovatnoćama nije postojala (slika 4.14.). Verovatnoća nastanka udaljenih metastaza u velikim, odnosno pT2 tumorima je značajno veća ako su tumori histološkog gradusa III, odnosno ako su ćelije tumora okarakterisane niskim stepenom diferentovanosti i visokim stepenom proliferativnosti. Može se pretpostaviti da, u pT2 tumorima, prisustvo pS2, pri koncentracijama koje su estrogen-zavisne, aktivira signalni put u okviru koga protein ima anti-proliferativnu ulogu (287). Posledica ovakve uloge pS2 može da bude ujednačen stepen proliferativnosti i diferentovanosti ćelija tumora različitih histoloških gradusa što uslovljava da se verovatnoće za DFI između grupa pacijentkinja sa estrogen-zavisnim koncentracijama pS2 ne razlikuju značajno.

Razlike u verovatnoćama za DFI su nađene i u okviru grupe pacijentkinja sa tumorima histološkog gradusa II. Analizom je utvrđeno da, u ovoj grupi pacijentkinja, značajan uticaj na tok bolesti ima kako status menopauze pacijentkinja tako i statusi ER, PR i pS2 u tumorima pacijentkinja. Prvi rezultat koji se odnosi na navede razlike pokazuje da se postmenopauzne pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa II i estrogen-nezavisnim koncentracijama pS2 ne razlikuju značajno, što se tiče toka bolesti, kada su okarakterisane fenotipom ER+PR+ ili ER+PR- (slika 4.15.). Međutim, u slučaju kada je koncentracija pS2 u tumorima zavisna od estrogena, tok bolesti pacijentkinja sa navedenim ER/PR fenotipovima se statistički značajno razlikuje. Može se pretpostaviti da je, u slučaju postmenopauznih pacijentkinja, aktivan signalni put koji podrazumeva ligand-nezavisnu aktivaciju ER (339) koja, dalje, aktivira ekspresiju gena za PR i gena za pS2. Kada pS2 nije prisutan u tumorima u dovoljno visokoj koncentraciji, verovatnoća nastanka udaljenih metastaza nije uslovljena statusom PR. Međutim, ako je pS2 eksprimiran u tumorima u dovoljno visokoj koncentraciji, moguće je da pS2 učestvuje u signalnom putu kao potentni inhibitor proliferacije (287). No, rezultat ukazuje da, u tumorima sa negativnim statusom PR, taj signalni put nije potpuno funkcionalan što omogućava nastanak udaljenih metastaza. U tom smislu može da bude indikativno da nijedna pacijentkinja sa fenotipom ER+PR+ nije imala relaps u toku praćenja toka bolesti.

Drugi rezultat se odnosi na pacijentkinje sa pozitivnim statusima ER i PR (slika 4.16). U slučaju kada je koncentracija pS2 u tumorima zavisila od delovanja estrogena, postojala je statistički značajna razlika u verovatnoćama za DFI između pacijentkinja sa različitim statusima menopauze. Imajući u vidu pretpostavljeni signalni put za pS2 u tumorima postmenopauznih pacijentkinja, u okviru koga dolazi do ligand-nezavisne aktivacije ER, može se pretpostaviti da je u slučaju premenopauznih pacijentkinja aktivan signalni put za pS2 u okviru koga dolazi do ligand-zavisne aktivacije ER. Usled takve aktivacije ER, moguće je da pS2, pri dovoljno visokim

koncentracijama u tumorima premenopauzних pacijentkinja, ima ulogu bilo u sprečavanju apoptoze (287) bilo u rasejavanju malignih ćelija (283). Obe potencijalne funkcije pS2 u tumorima premenopauzних pacijentkinja bi mogle da omogućе nastanak udaljenih metastaza što ima za posledicu nepovoljniji tok bolesti ovih pacijentkinja. Moguću potvrdu ovakve pretpostavke predstavlja i rezultat prema kome premenopauzne pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa II i fenotipom ER+PR+pS2- imaju statistički značajno veću verovatnoću za DFI u odnosi na odgovarajuće pacijentkinje sa fenotipom ER+PR+pS2+, sa obzirom na to da nijedna od navedenih pacijentkinja sa negativnim statusom pS2 nije imala relaps u toku praćenja toka bolesti.

6. ZAKLJUČCI

Istraživanje u okviru ove doktorske disertacije je zasnovano na sledećim osnovama:

- Značaj faktora prognoze/predikcije toka bolesti se menja tokom perioda praćenja toka bolesti.
- Tok bolesti ranog karcinoma dojke u prve 3 godine praćenja toka bolesti se karakteriše pojavom maksimalnog broja udaljenih metastaza. Ovaj broj je nezavisan od primenjene terapije (samo hirurška terapija, hirurška i hemio-terapija, hirurška i hormonska terapija).
- Ispitivani su estrogenom-indukovani molekularni biomarkeri, pS2 i katepsin D, u svrhu određivanja estrogen-zavisne vs. estrogen-nezavisne ekspresije, odnosno sa ciljem određivanja granične vrednosti za definisanje povišenih vs. bazičnih koncentracija, odnosno za definisanje „statusa“ biomarkera.
- Određivanje kvantitativnog sadržaja pS2 i katepsina D, u istraživačke svrhe, omogućava ispitivanje njihovog biološkog značaja.

Na osnovu rezultata ovog istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Analiza povezanosti klasičnih i biohemijskih faktora prognoze/predikcije toka bolesti sa koncentracijama pS2, odnosno katepsina D je omogućila definisanje graničnih vrednosti, za ekspresiju pS2 (15 ng/mg) i za ekspresiju katepsina D (39 pmol/mg) u karcinomu dojke, koje imaju ne samo statistički, već i biološki značaj, u smislu definisanja estrogen-zavisne vs. estrogen-nezavisne ekspresije.
- Analiza toka bolesti u celoj grupi ispitivanih pacijentkinja je pokazala da ni katepsin D ni pS2 nisu nezavisni faktori prognoze toka bolesti.
- Analiza toka bolesti na osnovu statusa katepsina D ukazuje na ulogu ovog proteina u procesima proliferacije i apoptoze, odnosno na njegov biološki značaj u karcinomu dojke.
- Analiza toka bolesti na osnovu statusa katepsina D omogućava da se odredi klinički značaj katepsina D u karcinomu dojke, odnosno definišu visoko-rizične grupe pacijentkinja (pN+ pT2 CD-, pN+ III CD-, I CD+), kao i nisko-rizična grupa pacijentkinja (I CD-).
- Analiza toka bolesti na osnovu statusa pS2 ukazuje na anti-proliferativnu i anti-apoptotsku, kao i ulogu ovog proteina u rasejavanju malignih ćelija, odnosno na njegov biološki značaj u karcinomu dojke.
- Analiza toka bolesti na osnovu statusa pS2 omogućava da se odredi klinički značaj pS2 u karcinomu dojke, odnosno definišu visoko-rizične grupe pacijentkinja (post pN+ pS2-, pT2 III pS2-, pre II ER+PR+ pS2+), kao i nisko-rizične grupe pacijentkinja (post II ER+PR+ pS2+, pre II ER+PR+ pS2-).

Opšti zaključci ovog istraživanja su:

- I - Ispitivanje pS2 i katepsina D omogućava da se pretpostavi moguća uloga ovih biomarkera u procesima proliferacije i apoptoze koji predstavljaju osnov za sukcesivne događaje koji dovode do pojave udaljenih metastaza.
- II - U periodu od 3 godine, bez obzira na primenjenu terapiju za lečenje karcinoma dojke, pS2 i katepsin D omogućavaju definisanje grupa pacijentkinja sa niskim/visokim rizikom za pojavu udaljenih metastaza radi kreiranja individualnih profila biomarkera, a sa krajnim ciljem poboljšanja prognoze kliničkog toka bolesti. Pri tome, pS2 i katepsin D ne predstavljaju nezavisne pokazatelje već su zavisni od klasičnih i biohemijskih faktora prognoze/predikcije toka bolesti. Rezultati ovakvog istraživanja predstavljaju osnovu za potonja klinička istraživanja.

7. LITERATURA

1. Crowe JP, Jr., Gordon NH, Antunez AR, Shenk RR, Hubay CA, Shuck JM. Local-regional breast cancer recurrence following mastectomy. *Arch Surg* 1991;126(4):429-32.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60(5):277-300.
3. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2(8):563-72.
4. Retsky MW, Hrushesky WJ, Gukas ID. Hypothesis: primary antiangiogenic method proposed to treat early stage breast cancer. *BMC Cancer* 2009;9:7.
5. Fisher B. Laboratory and clinical research in breast cancer--a personal adventure: the David A. Karnofsky memorial lecture. *Cancer Res* 1980;40(11):3863-74.
6. Hedden SL, Woolson RF, Malcolm RJ. Randomization in substance abuse clinical trials. *Subst Abuse Treat Prev Policy* 2006;1:6.
7. Demicheli R, Abbattista A, Miceli R, Valagussa P, Bonadonna G. Time distribution of the recurrence risk for breast cancer patients undergoing mastectomy: further support about the concept of tumor dormancy. *Breast Cancer Res Treat* 1996;41(2):177-85.
8. Janni WJ, Wiedswang G, Fehm T, Jueckstock J, Borgen E, Rack B, Braun S, Sommer H, Pantel K, Naume B. Persistence of disseminated tumor cells (DTC) in bone marrow (BM) of breast cancer patients predicts increased risk for relapse - Results of pooled European data. *Journal of Clinical Oncology* 2006;24(18S):10083.
9. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2004;10(16):5342-8.
10. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(17):1419-24.
11. Hess KR, Pusztai L, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Estrogen receptors and distinct patterns of breast cancer relapse. *Breast Cancer Res Treat* 2003;78(1):105-18.
12. Gao F, Tan SB, Machin D, Wong NS. Confirmation of double-peaked time distribution of mortality among Asian breast cancer patients in a population-based study. *Breast Cancer Res* 2007;9(2):R21.
13. Standards for the assessment of estrogen receptors in human breast cancer. Report of a workshop on September 29, 1972, at the Antoni van Leeuwenhoek-Huis, Amsterdam. *Eur J Cancer* 1973;9(5):379-81.
14. Demicheli R, Retsky MW, Swartzendruber DE, Bonadonna G. Proposal for a new model of breast cancer metastatic development. *Ann Oncol* 1997;8(11):1075-80.
15. Retsky MW, Demicheli R, Swartzendruber DE, Bame PD, Wardwell RH, Bonadonna G, Speer JF, Valagussa P. Computer simulation of a breast cancer metastasis model. *Breast Cancer Res Treat* 1997;45(2):193-202.
16. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 2007;608:1-22.
17. Eliss IO, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, Peterse JL. Invasive breast carcinoma. In: Tavassoli FA, Devilee P, editors. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC Press; 2003. p. 13-59.
18. Heppner GH, Miller BE. Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences. *Cancer Metastasis Rev* 1983;2(1):5-23.
19. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194(4260):23-8.
20. Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* 2007;6(19):2332-8.
21. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(7):3983-8.
22. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 2006;66(4):1883-90; discussion 95-6.
23. Barabe F, Kennedy JA, Hope KJ, Dick JE. Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science* 2007;316(5824):600-4.

24. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 2005;5(8):591-602.
25. Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol* 2004;5(2):79-88.
26. Engers R, Gabbert HE. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126(12):682-92.
27. Crawford HC, Matrisian LM. Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis* 1994;14(1-6):234-45.
28. Chambers AF, Naumov GN, Varghese HJ, Nadkarni KV, MacDonald IC, Groom AC. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg Oncol Clin N Am* 2001;10(2):243-55, vii.
29. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989;8(2):98-101.
30. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1(1):27-31.
31. Weiss L. Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res* 1990;54:159-211.
32. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998;153(3):865-73.
33. Demicheli R. Tumour dormancy: findings and hypotheses from clinical research on breast cancer. *Semin Cancer Biol* 2001;11(4):297-306.
34. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995;1(2):149-53.
35. Aguirre-Ghisso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007;7(11):834-46.
36. Li L, Neaves WB. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res* 2006;66(9):4553-7.
37. Townson JL, Chambers AF. Dormancy of solitary metastatic cells. *Cell Cycle* 2006;5(16):1744-50.
38. Marches R, Scheuermann RH, Uhr JW. Cancer dormancy: role of cyclin-dependent kinase inhibitors in induction of cell cycle arrest mediated via membrane IgM. *Cancer Res* 1998;58(4):691-7.
39. Barrett AJ. Cathepsin D and other carboxyl proteases. In: Barrett AJ, ed. *Proteases in mammalian cells and tissue*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biochemical Press;1977:209-48.
40. Briozzo P, Badet J, Capony F, Pieri I, Montcourrier P, Barritault D, Rochefort H. MCF7 mammary cancer cells respond to bFGF and internalize it following its release from extracellular matrix: a permissive role of cathepsin D. *Exp Cell Res* 1991;194(2):252-9.
41. Fisher B, Gunduz N, Coyle J, Rudock C, Saffer E. Presence of a growth-stimulating factor in serum following primary tumor removal in mice. *Cancer Res* 1989;49(8):1996-2001.
42. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(6):740-6.
43. Cavailles V, Augereau P, Rochefort H. Cathepsin D gene is controlled by a mixed promoter, and estrogens stimulate only TATA-dependent transcription in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(1):203-7.
44. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326 (Pt 1):1-16.
45. Conner GE. Cathepsin D. In : Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF editors. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, New York: Academic press; 2002:p. 746-51.
46. Diment S, Leech MS, Stahl PD. Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes. *J Biol Chem* 1988;263(14):6901-7.
47. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, Hur MH, Diebel ME, Monville F, Dutcher J, Brown M, Viens P, Xerri L, Bertucci F, Stassi G, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* 2009;69(4):1302-13.
48. Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res* 2007;17(1):3-14.
49. Clark GM. Do we really need prognostic factors for breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 1994;30(2):117-26.
50. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 2004;9(6):606-16.

51. Hayes DF, Trock B, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? *Breast Cancer Res Treat* 1998;52(1-3):305-19.
52. Stoll BA. Age group and cancer prognosis. In: Stoll B A, editor. *Breast Cancer Treatment and Prognosis*. London: Blackwell Scientific Publications; 1986. p. 173-87.
53. Yoshimoto M, Sakamoto G, Ohashi Y. Time dependency of the influence of prognostic factors on relapse in breast cancer. *Cancer* 1993;72(10):2993-3001.
54. Treatment of Early-Stage Breast Cancer. NIH Consens Statement Online. 1990 Jun 18-21;8(6):1-19.
55. Stoll BA. Pointers in prognosis. In: Stoll BA, editor. *Breast cancer treatment and prognosis*. London: Blackwell Scientific Publications; 1986. p. 115-37.
56. Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr* 1994(16):35-42.
57. Walker RA, Lees E, Webb MB, Dearing SJ. Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years) are different. *Br J Cancer* 1996;74(11):1796-800.
58. Rutqvist LE, Wallgren A. Influence of age on outcome in breast carcinoma. *Acta Radiol Oncol* 1983;22(4):289-94.
59. Donegan WL. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J Clin* 1997;47(1):28-51.
60. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63(1):181-7.
61. Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer* 1993;71(8):2507-14.
62. Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol* 1989;7(9):1239-51.
63. Hayes DF, Isaacs C, Stearns V. Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6(4):375-92.
64. Gardner B, Feldman J. Are positive axillary nodes in breast cancer markers for incurable disease? *Ann Surg* 1993;218(3):270-5; discussion 5-8.
65. Yang JH, Slack NH, Nemoto T. Effect of axillary nodal status on the long-term survival following mastectomy for breast carcinoma: nodal metastases may not always suggest systemic disease. *J Surg Oncol* 1987;36(4):243-8.
66. Perry CW, Phillips BJ. Quick Review: Breast Cancer. In: *The Internet Journal Of Oncology*; 2002.
67. Ferno M. Prognostic factors in breast cancer: a brief review. *Anticancer Res* 1998;18(3C):2167-71.
68. Nemoto T, Vana J, Bedwani RN, Baker HW, McGregor FH, Murphy GP. Management and survival of female breast cancer: results of a national survey by the American College of Surgeons. *Cancer* 1980;45(12):2917-24.
69. [Histological typing of breast tumors. Second edition. World Health Organization. Geneva, 1981]. *Ann Pathol* 1982;2(2):91-105.
70. Sainsbury JR, Anderson TJ, Morgan DA, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer. *BMJ* 1994;309(6962):1150-3.
71. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(7):966-78.
72. Rosen PP. Pathology of breast carcinoma. In: Harris JR, Hellman S, Henderson IC, Kinne DW, editors. *Breast Diseases*. Philadelphia: JB Lippincott; 1987. p. 147-209.
73. Stenkvis B, Bengtsson E, Eriksson O, Jarkrans T, Nordin B, Westman-Naeser S. Histopathological systems of breast cancer classification: reproducibility and clinical significance. *J Clin Pathol* 1983;36(4):392-8.
74. Carstens PH, Greenberg RA, Francis D, Lyon H. Tubular carcinoma of the breast. A long term follow-up. *Histopathology* 1985;9(3):271-80.
75. Carter D, Orr SL, Merino MJ. Intracystic papillary carcinoma of the breast. After mastectomy, radiotherapy or excisional biopsy alone. *Cancer* 1983;52(1):14-9.
76. Fisher ER, Kenny JP, Sass R, Dimitrov NV, Siderits RH, Fisher B. Medullary cancer of the breast revisited. *Breast Cancer Res Treat* 1990;16(3):215-29.

77. Komaki K, Sakamoto G, Sugano H, Morimoto T, Monden Y. Mucinous carcinoma of the breast in Japan. A prognostic analysis based on morphologic features. *Cancer* 1988;61(5):989-96.
78. Berg JW, Hutter RV. Breast cancer. *Cancer* 1995;75(1 Suppl):257-69.
79. International Union Against Cancer. TNM supplement 1993. A commentary on uniform use. Berlin: Springer; 1993.
80. Stenkvist B, Westman-Naeser S, Vegelius J, Holmquist J, Nordin B, Bengtsson E, Eriksson O. Analysis of reproducibility of subjective grading systems for breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1979;32(10):979-85.
81. Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst* 1975;55(2):231-73.
82. 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):359-77.
83. 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):403-10.
84. Contesso G, Mouriessse H, Friedman S, Genin J, Sarrazin D, Rouesse J. The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1,010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. *J Clin Oncol* 1987;5(9):1378-86.
85. Shek LL, Godolphin W. Model for breast cancer survival: relative prognostic roles of axillary nodal status, TNM stage, estrogen receptor concentration, and tumor necrosis. *Cancer Res* 1988;48(19):5565-9.
86. Davis BW, Gelber RD, Goldhirsch A, Hartmann WH, Locher GW, Reed R, Golouh R, Save-Soderbergh J, Holloway L, Russell I, et al. Prognostic significance of tumor grade in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Cancer* 1986;58(12):2662-70.
87. Elledge RM, McGuire WL, Osborne CK. Prognostic factors in breast cancer. *Semin Oncol* 1992;19(3):244-53.
88. Stewart JF, Rubens RD, Millis RR, King RJ, Hayward JL. Steroid receptors and prognosis in operable (stage I and II) breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983;19(10):1381-7.
89. Saez S, Cheix F, Asselain B. Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1983;3(4):345-53.
90. Donegan WL. Prognostic factors. Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer* 1992;70(6 Suppl):1755-64.
91. Jensen EV. Hormone dependency of breast cancer. *Cancer* 1981;47(10):2319-26.
92. Pichon MF, Pallud C, Brunet M, Milgrom E. Relationship of presence of progesterone receptors to prognosis in early breast cancer. *Cancer Res* 1980;40(9):3357-60.
93. 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):1076-87.
94. Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, Chamness GC, Osborne CK, Clark GM. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52(1-3):227-37.
95. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998;351(9114):1451-67.
96. McGuire WL, Horwitz KB, Pearson OH, Segaloff A. Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer* 1977;39(6 Suppl):2934-47.
97. Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jr., Jessup JM, Kemeny N, Locker GY, Mennel RG, Somerfield MR. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001;19(6):1865-78.
98. Barrett AJ. Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver. *Biochem J* 1970;117(3):601-7.
99. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Sasaki K, Bruhl T, Farhadi MR, Vajkoczy P, Hofmann WK, Peters C, Pennacchio LA, Abolmaali ND, Chavakis E, Reinheckel T, Zeiher AM, Dimmeler S. Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nat Med* 2005;11(2):206-13.

100. Barrett AJ. Cellular proteolysis. An overview. *Ann N Y Acad Sci* 1992;674:1-15.
101. Bidere N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C, Senik A. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278(33):31401-11.
102. Koike M, Nakanishi H, Saftig P, Ezaki J, Isahara K, Ohsawa Y, Schulz-Schaeffer W, Watanabe T, Waguri S, Kametaka S, Shibata M, Yamamoto K, Kominami E, Peters C, von Figura K, Uchiyama Y. Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons. *J Neurosci* 2000;20(18):6898-906.
103. Laurent-Matha V, Maruani-Herrmann S, Prebois C, Beaujoui M, Glondu M, Noel A, Alvarez-Gonzalez ML, Blacher S, Coopman P, Baghdiguian S, Gilles C, Loncarek J, Freiss G, Vignon F, Liaudet-Coopman E. Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth. *J Cell Biol* 2005;168(3):489-99.
104. Vetvicka V, Vagner J, Baudys M, Tang J, Foundling SI, Fusek M. Human breast milk contains procathepsin D--detection by specific antibodies. *Biochem Mol Biol Int* 1993;30(5):921-8.
105. Wilstätter R, Bamann E. Über die proteasen der magenschleimhaut. Erste abhandlung über die enzyme der leukocyten. *Hoppe-seyler's Zeitschrift fuer Physiologische Chemie* 1928;180:127-43.
106. Press EM, Porter RR, Cebra J. The isolation and properties of a proteolytic enzyme, cathepsin D, from bovine spleen. *Biochem J* 1960;74:501-14.
107. Westley B, Rochefort H. A secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines. *Cell* 1980;20(2):353-62.
108. Faust PL, Kornfeld S, Chirgwin JM. Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(15):4910-4.
109. Fusek M, Vetvicka V. Dual role of cathepsin D: ligand and protease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2005;149(1):43-50.
110. Westley BR, May FE. Cathepsin D and breast cancer. *Eur J Cancer* 1996;32A(1):15-24.
111. Levicar N, Strojnik T, Kos J, Dewey RA, Pilkington GJ, Lah TT. Lysosomal enzymes, cathepsins in brain tumour invasion. *J Neurooncol* 2002;58(1):21-32.
112. Rochefort H, Cavailles V, Augereau P, Capony F, Maudelonde T, Touitou I, Garcia M. Overexpression and hormonal regulation of pro-cathepsin D in mammary and endometrial cancer. *J Steroid Biochem* 1989;34(1-6):177-82.
113. Rochefort H. Cathepsin D in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1990;16(1):3-13.
114. Garcia M, Lacombe MJ, Duplay H, Cavailles V, Derocq D, Delarue JC, Krebs B, Contesso G, Sancho-Garnier H, Richer G, et al. Immunohistochemical distribution of the 52-kDa protein in mammary tumors: a marker associated with cell proliferation rather than with hormone responsiveness. *J Steroid Biochem* 1987;27(1-3):439-45.
115. May FE, Smith DJ, Westley BR. The human cathepsin D-encoding gene is transcribed from an estrogen-regulated and a constitutive start point. *Gene* 1993;134(2):277-82.
116. Wang F, Duan R, Chirgwin J, Safe SH. Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by growth factors. *J Mol Endocrinol* 2000;24(2):193-202.
117. Sheikh MS, Augereau P, Chalbos D, Garcia M, Rochefort H. Retinoid regulation of human cathepsin D gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996;57(5-6):283-91.
118. Minarowska A, Gacko M, Karwowska A, Minarowski L. Human cathepsin D. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46(1):23-38.
119. Gieselmann V, Pohlmann R, Hasilik A, Von Figura K. Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* 1983;97(1):1-5.
120. Rochefort H, Capony F, Garcia M. Cathepsin D: a protease involved in breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1990;9(4):321-31.
121. von Figura K, Hasilik A. Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem* 1986;55:167-93.
122. Kornfeld S. Lysosomal enzyme targeting. *Biochem Soc Trans* 1990;18(3):367-74.
123. Cantor AB, Kornfeld S. Phosphorylation of Asn-linked oligosaccharides located at novel sites on the lysosomal enzyme cathepsin D. *J Biol Chem* 1992;267(32):23357-63.
124. Kornfeld S. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* 1992;61:307-30.
125. Sahagian GG. The mannose 6-phosphate receptor: function, biosynthesis and translocation. *Biol Cell* 1984;51(2):207-14.

126. Laurent-Matha V, Farnoud MR, Lucas A, Rougeot C, Garcia M, Rochefort H. Endocytosis of pro-cathepsin D into breast cancer cells is mostly independent of mannose-6-phosphate receptors. *J Cell Sci* 1998;111 (Pt 17):2539-49.
127. Koelsch G, Mares M, Metcalf P, Fusek M. Multiple functions of pro-parts of aspartic proteinase zymogens. *FEBS Lett* 1994;343(1):6-10.
128. Conner GE, Richo G. Isolation and characterization of a stable activation intermediate of the lysosomal aspartyl protease cathepsin D. *Biochemistry* 1992;31(4):1142-7.
129. Richo G, Conner GE. Proteolytic activation of human procathepsin D. *Adv Exp Med Biol* 1991;306:289-96.
130. Baldwin ET, Bhat TN, Gulnik S, Hosur MV, Sowder RC, 2nd, Cachau RE, Collins J, Silva AM, Erickson JW. Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: implications for lysosomal targeting and drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(14):6796-800.
131. Tang J, James MN, Hsu IN, Jenkins JA, Blundell TL. Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases. *Nature* 1978;271(5646):618-21.
132. Metcalf P, Fusek M. Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site. *EMBO J* 1993;12(4):1293-302.
133. Warwas M, Taurowska E. [Cathepsin D in diagnosis of neoplastic diseases]. *Postepy Hig Med Dosw* 1993;47(4):277-88.
134. Schultz DC, Bazel S, Wright LM, Tucker S, Lange MK, Tachovsky T, Longo S, Niedbala S, Alhadeff JA. Western blotting and enzymatic activity analysis of cathepsin D in breast tissue and sera of patients with breast cancer and benign breast disease and of normal controls. *Cancer Res* 1994;54(1):48-54.
135. Capony F, Rougeot C, Montcourrier P, Cavailles V, Salazar G, Rochefort H. Increased secretion, altered processing, and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. *Cancer Res* 1989;49(14):3904-9.
136. Rochefort H. Cathepsin D in breast cancer: a tissue marker associated with metastasis. *Eur J Cancer* 1992;28A(11):1780-3.
137. Leto G, Gebbia N, Rausa L, Tumminello FM. Cathepsin D in the malignant progression of neoplastic diseases (review). *Anticancer Res* 1992;12(1):235-40.
138. Rochefort H, Liaudet-Coopman E. Cathepsin D in cancer metastasis: a protease and a ligand. *APMIS* 1999;107(1):86-95.
139. Thorpe SM, Rochefort H, Garcia M, Freiss G, Christensen IJ, Khalaf S, Paolucci F, Pau B, Rasmussen BB, Rose C. Association between high concentrations of Mr 52,000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Res* 1989;49(21):6008-14.
140. Conner GE. Isolation of procathepsin D from mature cathepsin D by pepstatin affinity chromatography. Autocatalytic proteolysis of the zymogen form of the enzyme. *Biochem J* 1989;263(2):601-4.
141. Beyer BM, Dunn BM. Self-activation of recombinant human lysosomal procathepsin D at a newly engineered cleavage junction, "short" pseudocathepsin D. *J Biol Chem* 1996;271(26):15590-6.
142. Fusek M, Mares M, Vagner J, Voburka Z, Baudys M. Inhibition of aspartic proteinases by pro-part peptides of human procathepsin D and chicken pepsinogen. *FEBS Lett* 1991;287(1-2):160-2.
143. Minarowska A, Minarowski L, Karwowska A, Gacko M. Regulatory role of cathepsin D in apoptosis. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45(3):159-63.
144. Garreau I, Cucumel K, Dagouassat N, Zhao Q, Cupo A, Piot JM. Hemorphin peptides are released from hemoglobin by cathepsin D. radioimmunoassay against the C-part of V-V-hemorphin-7: an alternative assay for the cathepsin D activity. *Peptides* 1997;18(2):293-300.
145. Diment S, Martin KJ, Stahl PD. Cleavage of parathyroid hormone in macrophage endosomes illustrates a novel pathway for intracellular processing of proteins. *J Biol Chem* 1989;264(23):13403-6.
146. Benes P, Vetvicka V, Fusek M. Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;68(1):12-28.
147. Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, Hallas C, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Wickel M, Schneider-Brachert W, Trauzold A, Hethke A, Schutze S. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ* 2004;11(5):550-63.

148. Wittlin S, Rosel J, Hofmann F, Stover DR. Mechanisms and kinetics of procathepsin D activation. *Eur J Biochem* 1999;265(1):384-93.
149. Lenarcic B, Kos J, Dolenc I, Lucovnik P, Krizaj I, Turk V. Cathepsin D inactivates cysteine proteinase inhibitors, cystatins. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;154(2):765-72.
150. Rochefort H, Garcia M, Glondu M, Laurent V, Liaudet E, Rey JM, Roger P. Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clin Chim Acta* 2000;291(2):157-70.
151. Kenessey A, Nacharaju P, Ko LW, Yen SH. Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration. *J Neurochem* 1997;69(5):2026-38.
152. Kagedal K, Johansson U, Ollinger K. The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J* 2001;15(9):1592-4.
153. Roberg K, Kagedal K, Ollinger K. Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am J Pathol* 2002;161(1):89-96.
154. Briozzo P, Morisset M, Capony F, Rougeot C, Rochefort H. In vitro degradation of extracellular matrix with Mr 52,000 cathepsin D secreted by breast cancer cells. *Cancer Res* 1988;48(13):3688-92.
155. Griffiths JR. Are cancer cells acidic? *Br J Cancer* 1991;64(3):425-7.
156. Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2000;2(6):318-25.
157. Montcourrier P, Silver I, Farnoud R, Bird I, Rochefort H. Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis* 1997;15(4):382-92.
158. Vaclav V, Jana V, Martin F. Participation of the propeptide on procathepsin D activation of human peripheral lymphocytes and neutrophils. *Arch Biochem Biophys* 1995;322(1):295-8.
159. Das B, Mondragon MO, Sadeghian M, Hatcher VB, Norin AJ. A novel ligand in lymphocyte-mediated cytotoxicity: expression of the beta subunit of H⁺ transporting ATP synthase on the surface of tumor cell lines. *J Exp Med* 1994;180(1):273-81.
160. Pupa SM, Menard S, Forti S, Tagliabue E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J Cell Physiol* 2002;192(3):259-67.
161. Elenbaas B, Weinberg RA. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res* 2001;264(1):169-84.
162. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001;411(6835):375-9.
163. Ohri SS, Vashishta A, Proctor M, Fusek M, Vetvicka V. The propeptide of cathepsin D increases proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells. *Int J Oncol* 2008;32(2):491-8.
164. van der Stappen JW, Williams AC, Maciewicz RA, Paraskeva C. Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D. *Int J Cancer* 1996;67(4):547-54.
165. Rifkin DB. Cross-talk among proteases and matrix in the control of growth factor action (1997) 3-9. *Fibrinolysis Proteolysis* 1997;11:3-9.
166. Liaudet E, Derocq D, Rochefort H, Garcia M. Transfected cathepsin D stimulates high density cancer cell growth by inactivating secreted growth inhibitors. *Cell Growth Differ* 1995;6(9):1045-52.
167. Vetvicka V, Vetvickova J, Fusek M. Anti-human procathepsin D activation peptide antibodies inhibit breast cancer development. *Breast Cancer Res Treat* 1999;57(3):261-9.
168. Fusek M, Vetvicka V. Mitogenic function of human procathepsin D: the role of the propeptide. *Biochem J* 1994;303 (Pt 3):775-80.
169. Glondu M, Coopman P, Laurent-Matha V, Garcia M, Rochefort H, Liaudet-Coopman E. A mutated cathepsin-D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells. *Oncogene* 2001;20(47):6920-9.
170. Masa M, Maresova L, Vondrasek J, Horn M, Jezek J, Mares M. Cathepsin D propeptide: mechanism and regulation of its interaction with the catalytic core. *Biochemistry* 2006;45(51):15474-82.
171. Vetvicka V, Vetvickova J, Hilgert I, Voburka Z, Fusek M. Analysis of the interaction of procathepsin D activation peptide with breast cancer cells. *Int J Cancer* 1997;73(3):403-9.
172. Vetvicka V, Vektvickova J, Fusek M. Effect of human procathepsin D on proliferation of human cell lines. *Cancer Lett* 1994;79(2):131-5.

173. Vetvicka V, Vetvickova J, Fusek M. Effect of procathepsin D and its activation peptide on prostate cancer cells. *Cancer Lett* 1998;129(1):55-9.
174. Vetvicka V, Benes P, Fusek M. Procathepsin D in breast cancer: what do we know? Effects of ribozymes and other inhibitors. *Cancer Gene Ther* 2002;9(10):854-63.
175. Liaudet-Coopman E, Beaujouin M, Derocq D, Garcia M, Glondu-Lassis M, Laurent-Matha V, Prebois C, Rochefort H, Vignon F. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett* 2006;237(2):167-79.
176. Benes P, Vashishta A, Saraswat-Ohri S, Fusek M, Pospisilova S, Tichy B, Vetvicka V. Effect of procathepsin D activation peptide on gene expression of breast cancer cells. *Cancer Lett* 2006;239(1):46-54.
177. Liotta LA, Rao CN, Wewer UM. Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Annu Rev Biochem* 1986;55:1037-57.
178. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(17):1260-70.
179. Glondu M, Liaudet-Coopman E, Derocq D, Platet N, Rochefort H, Garcia M. Down-regulation of cathepsin-D expression by antisense gene transfer inhibits tumor growth and experimental lung metastasis of human breast cancer cells. *Oncogene* 2002;21(33):5127-34.
180. Edwards DR, Murphy G. Cancer. Proteases--invasion and more. *Nature* 1998;394(6693):527-8.
181. Tedone T, Correale M, Barbarossa G, Casavola V, Paradiso A, Reshkin SJ. Release of the aspartyl protease cathepsin D is associated with and facilitates human breast cancer cell invasion. *FASEB J* 1997;11(10):785-92.
182. Garcia M, Derocq D, Pujol P, Rochefort H. Overexpression of transfected cathepsin D in transformed cells increases their malignant phenotype and metastatic potency. *Oncogene* 1990;5(12):1809-14.
183. Liaudet E, Garcia M, Rochefort H. Cathepsin D maturation and its stimulatory effect on metastasis are prevented by addition of KDEL retention signal. *Oncogene* 1994;9(4):1145-54.
184. Berchem G, Glondu M, Gleizes M, Brouillet JP, Vignon F, Garcia M, Liaudet-Coopman E. Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene* 2002;21(38):5951-5.
185. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972;175(3):409-16.
186. Morikawa W, Yamamoto K, Ishikawa S, Takemoto S, Ono M, Fukushi J, Naito S, Nozaki C, Iwanaga S, Kuwano M. Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 2000;275(49):38912-20.
187. Gonzalez-Vela MC, Garijo MF, Fernandez F, Buelta L, Val-Bernal JF. Cathepsin D in host stromal cells is associated with more highly vascular and aggressive invasive breast carcinoma. *Histopathology* 1999;34(1):35-42.
188. Deiss LP, Galinka H, Berissi H, Cohen O, Kimchi A. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J* 1996;15(15):3861-70.
189. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):770-6.
190. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275(5303):1132-6.
191. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999;13(3):239-52.
192. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett* 2006;11(4):506-25.
193. Beaujouin M, Baghdiguian S, Glondu-Lassis M, Berchem G, Liaudet-Coopman E. Overexpression of both catalytically active and -inactive cathepsin D by cancer cells enhances apoptosis-dependent chemo-sensitivity. *Oncogene* 2006;25(13):1967-73.
194. Capony F, Morisset M, Barrett AJ, Capony JP, Broquet P, Vignon F, Chambon M, Louisot P, Rochefort H. Phosphorylation, glycosylation, and proteolytic activity of the 52-kD estrogen-induced protein secreted by MCF7 cells. *J Cell Biol* 1987;104(2):253-62.
195. Johansson AC, Steen H, Ollinger K, Roberg K. Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. *Cell Death Differ* 2003;10(11):1253-9.

196. Emert-Sedlak L, Shangary S, Rabinovitz A, Miranda MB, Delach SM, Johnson DE. Involvement of cathepsin D in chemotherapy-induced cytochrome c release, caspase activation, and cell death. *Mol Cancer Ther* 2005;4(5):733-42.
197. Westley BR, May FE. Prognostic value of cathepsin D in breast cancer. *Br J Cancer* 1999;79(2):189-90.
198. Saftig P, Hetman M, Schmahl W, Weber K, Heine L, Mossmann H, Koster A, Hess B, Evers M, von Figura K, et al. Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO J* 1995;14(15):3599-608.
199. Nakanishi H, Zhang J, Koike M, Nishioku T, Okamoto Y, Kominami E, von Figura K, Peters C, Yamamoto K, Saftig P, Uchiyama Y. Involvement of nitric oxide released from microglia-macrophages in pathological changes of cathepsin D-deficient mice. *J Neurosci* 2001;21(19):7526-33.
200. Elledge RM, McGuire WL. Prognostic factors and therapeutic decisions in axillary node-negative breast cancer. *Annu Rev Med* 1993;44:201-10.
201. Garcia M, Platet N, Liaudet E, Laurent V, Derocq D, Brouillet JP, Rochefort H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells* 1996;14(6):642-50.
202. Rochefort H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncol* 1992;31(2):125-30.
203. Ravdin PM. Evaluation of cathepsin D as a prognostic factor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993;24(3):219-26.
204. Spyrtos F, Maudelonde T, Brouillet JP, Brunet M, Defrenne A, Andrieu C, Hacene K, Desplaces A, Rouesse J, Rochefort H. Cathepsin D: an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet* 1989;2(8672):1115-8.
205. Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, Meijer-van Gelder ME, van Putten WL, Klijn JG. Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer* 1999;79(2):300-7.
206. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1990;322(5):297-302.
207. Isola J, Weitz S, Visakorpi T, Holli K, Shea R, Khabbaz N, Kallioniemi OP. Cathepsin D expression detected by immunohistochemistry has independent prognostic value in axillary node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1993;11(1):36-43.
208. Riley LB, Lange MK, Browne RJ, Cochrane PJ, Choi IJ, Davis B, Arcona S, Alhadeff JA. Analysis of cathepsin D in human breast cancer: usefulness of the processed 31 kDa active form of the enzyme as a prognostic indicator in node-negative and node-positive patients. *Breast Cancer Res Treat* 2000;60(2):173-9.
209. Romain S, Muracciole X, Varette I, Bressac C, Brandone H, Martin PM. [Cathepsin D: an independent prognostic factor in cancer of the breast]. *Bull Cancer* 1990;77(5):439-47.
210. Vignon F, Capony F, Chambon M, Freiss G, Garcia M, Rochefort H. Autocrine growth stimulation of the MCF 7 breast cancer cells by the estrogen-regulated 52 K protein. *Endocrinology* 1986;118(4):1537-45.
211. Tetu B, Brisson J, Lapointe H, Wang CS, Bernard P, Blanchette C. Cathepsin D expression by cancer and stromal cells in breast cancer: an immunohistochemical study of 1348 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1999;55(2):137-47.
212. Niu Y, Fu X, Lv A, Fan Y, Wang Y. Potential markers predicting distant metastasis in axillary node-negative breast carcinoma. *Int J Cancer* 2002;98(5):754-60.
213. Ferrandina G, Scambia G, Bardelli F, Benedetti Panici P, Mancuso S, Messori A. Relationship between cathepsin-D content and disease-free survival in node-negative breast cancer patients: a meta-analysis. *Br J Cancer* 1997;76(5):661-6.
214. Duffy MJ, Reilly D, Brouillet JP, McDermott EW, Faul C, O'Higgins N, Fennelly JJ, Maudelonde T, Rochefort H. Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: correlation with disease-free interval and overall survival. *Clin Chem* 1992;38(10):2114-6.
215. Harbeck N, Alt U, Berger U, Kates R, Kruger A, Thomssen C, Janicke F, Graeff H, Schmitt M. Long-term follow-up confirms prognostic impact of PAI-1 and cathepsin D and L in primary breast cancer. *Int J Biol Markers* 2000;15(1):79-83.

216. Billgren AM, Rutqvist LE, Johansson H, Hagerstrom T, Skoog L. The role of cathepsin D and PAI-1 in primary invasive breast cancer as prognosticators and predictors of treatment benefit with adjuvant tamoxifen. *Eur J Cancer* 2000;36(11):1374-80.
217. Brouillet JP, Dufour F, Lemamy G, Garcia M, Schlup N, Grenier J, Mani JC, Rochefort H. Increased cathepsin D level in the serum of patients with metastatic breast carcinoma detected with a specific pro-cathepsin D immunoassay. *Cancer* 1997;79(11):2132-6.
218. Cardiff RD. Cathepsin D and breast cancer: useful? *Hum Pathol* 1994;25(9):847-8.
219. Roger P, Montcourrier P, Maudelonde T, Brouillet JP, Pages A, Laffargue F, Rochefort H. Cathepsin D immunostaining in paraffin-embedded breast cancer cells and macrophages: correlation with cytosolic assay. *Hum Pathol* 1994;25(9):863-71.
220. Castiglioni T, Merino MJ, Elsner B, Lah TT, Sloane BF, Emmert-Buck MR. Immunohistochemical analysis of cathepsins D, B, and L in human breast cancer. *Hum Pathol* 1994;25(9):857-62.
221. Niskanen E, Blomqvist C, Franssila K, Hietanen P, Wasenius VM. Predictive value of c-erbB-2, p53, cathepsin-D and histology of the primary tumour in metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 1997;76(7):917-22.
222. Aziz S, Pervez S, Khan S, Kayani N, Rahbar M. Immunohistochemical cathepsin-D expression in breast cancer: correlation with established pathological parameters and survival. *Pathol Res Pract* 2001;197(8):551-7.
223. Winstanley JH, Leinster SJ, Cooke TG, Westley BR, Platt-Higgins AM, Rudland PS. Prognostic significance of cathepsin-D in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 1993;67(4):767-72.
224. Gohring UJ, Scharl A, Thelen U, Ahr A, Crombach G, Titius BR. Prognostic value of cathepsin D in breast cancer: comparison of immunohistochemical and immunoradiometric detection methods. *J Clin Pathol* 1996;49(1):57-64.
225. Bevilacqua P, Barbareschi M, Verderio P, Boracchi P, Caffo O, Dalla Palma P, Meli S, Weidner N, Gasparini G. Prognostic value of intratumoral microvessel density, a measure of tumor angiogenesis, in node-negative breast carcinoma--results of a multiparametric study. *Breast Cancer Res Treat* 1995;36(2):205-17.
226. Aaltonen M, Lipponen P, Kosma VM, Aaltomaa S, Syrjanen K. Prognostic value of cathepsin-D expression in female breast cancer. *Anticancer Res* 1995;15(3):1033-7.
227. Okamura K, Kobayashi I, Matsuo K, Kiyoshima T, Yamamoto K, Miyoshi A, Sakai H. Immunohistochemical localization of cathepsin D, proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor receptor in human breast carcinoma analysed by computer image analyser: correlation with histological grade and metastatic behaviour. *Histopathology* 1997;31(6):540-8.
228. 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):10-26.
229. Ravdin PM, Tandon AK, Allred DC, Clark GM, Fuqua SA, Hilsenbeck SH, Chamness GC, Osborne CK. Cathepsin D by western blotting and immunohistochemistry: failure to confirm correlations with prognosis in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12(3):467-74.
230. Ferno M, Baldetorp B, Borg A, Brouillet JP, Olsson H, Rochefort H, Sellberg G, Sigurdsson H, Killander D. Cathepsin D, both a prognostic factor and a predictive factor for the effect of adjuvant tamoxifen in breast cancer. South Sweden Breast Cancer Group. *Eur J Cancer* 1994;30A(14):2042-8.
231. Henry JA, McCarthy AL, Angus B, Westley BR, May FE, Nicholson S, Cairns J, Harris AL, Horne CH. Prognostic significance of the estrogen-regulated protein, cathepsin D, in breast cancer. An immunohistochemical study. *Cancer* 1990;65(2):265-71.
232. Brouillet JP, Spyrtos F, Hacene K, Fauque J, Freiss G, Dupont F, Maudelonde T, Rochefort H. Immunoradiometric assay of pro-cathepsin D in breast cancer cytosol: relative prognostic value versus total cathepsin D. *Eur J Cancer* 1993;29A(9):1248-51.
233. Vashishta A, Fusek M, Vetricka V. Possible role of procathepsin D in human cancer. *Folia Microbiol (Praha)* 2005;50(1):71-6.
234. Nadji M, Fresno M, Nassiri M, Conner G, Herrero A, Morales AR. Cathepsin D in host stromal cells, but not in tumor cells, is associated with aggressive behavior in node-negative breast cancer. *Hum Pathol* 1996;27(9):890-5.
235. Tetu B, Brisson J, Cote C, Brisson S, Potvin D, Roberge N. Prognostic significance of cathepsin-D expression in node-positive breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Int J Cancer* 1993;55(3):429-35.

236. O'Donoghue AE, Poller DN, Bell JA, Galea MH, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO. Cathepsin D in primary breast carcinoma: adverse prognosis is associated with expression of cathepsin D in stromal cells. *Breast Cancer Res Treat* 1995;33(2):137-45.
237. Joensuu H, Toikkanen S, Isola J. Stromal cell cathepsin D expression and long-term survival in breast cancer. *Br J Cancer* 1995;71(1):155-9.
238. Losch A, Tempfer C, Kohlberger P, Joura EA, Denk M, Zajic B, Breitenecker G, Kainz C. Prognostic value of cathepsin D expression and association with histomorphological subtypes in breast cancer. *Br J Cancer* 1998;78(2):205-9.
239. Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 1982;10(24):7895-903.
240. Jakowlew SB, Breathnach R, Jeltsch JM, Masiakowski P, Chambon P. Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Res* 1984;12(6):2861-78.
241. Wright NA, Hoffmann W, Otto WR, Rio MC, Thim L. Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett* 1997;408(2):121-3.
242. Corte MD, Tamargo F, Alvarez A, Rodriguez JC, Vazquez J, Sanchez R, Lamelas ML, Gonzalez LO, Allende MT, Garcia-Muniz JL, Fueyo A, Vizoso F. Cytosolic levels of TFF1/pS2 in breast cancer: Their relationship with clinical-pathological parameters and their prognostic significance. *Breast Cancer Res Treat* 2006;96(1):63-72.
243. Tomasetto C, Rio MC, Gautier C, Wolf C, Hareuveni M, Chambon P, Lathe R. hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J* 1990;9(2):407-14.
244. Lefebvre O, Wolf C, Keding M, Chenard MP, Tomasetto C, Chambon P, Rio MC. The mouse one P-domain (pS2) and two P-domain (mSP) genes exhibit distinct patterns of expression. *J Cell Biol* 1993;122(1):191-8.
245. Itoh H, Tomita M, Uchino H, Kobayashi T, Kataoka H, Sekiya R, Nawa Y. cDNA cloning of rat pS2 peptide and expression of trefoil peptides in acetic acid-induced colitis. *Biochem J* 1996;318 (Pt 3):939-44.
246. Tomasetto C, Rockel N, Mattei MG, Fujita R, Rio MC. The gene encoding the human spasmolytic protein (SML1/hSP) is in 21q 22.3, physically linked to the homologous breast cancer marker gene BCE1/pS2. *Genomics* 1992;13(4):1328-30.
247. Seib T, Blin N, Hilgert K, Seifert M, Theisinger B, Engel M, Dooley S, Zang KD, Welter C. The three human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22.3. *Genomics* 1997;40(1):200-2.
248. Jeltsch JM, Roberts M, Schatz C, Garnier JM, Brown AM, Chambon P. Structure of the human oestrogen-responsive gene pS2. *Nucleic Acids Res* 1987;15(4):1401-14.
249. Nunez AM, Berry M, Imler JL, Chambon P. The 5' flanking region of the pS2 gene contains a complex enhancer region responsive to oestrogens, epidermal growth factor, a tumour promoter (TPA), the c-Ha-ras oncoprotein and the c-jun protein. *EMBO J* 1989;8(3):823-9.
250. Miyashita S, Hirota M, Yamamoto T, Shiroyama C, Furukawa Y, Hayashi K. Effect of basic fibroblast growth factor on synthesis/secretion of pS2 protein by human breast cancer cells (MCF-7). *Eur J Biochem* 1994;225(3):1041-6.
251. Chalbos D, Philips A, Galtier F, Rochefort H. Synthetic antiestrogens modulate induction of pS2 and cathepsin-D messenger ribonucleic acid by growth factors and adenosine 3',5'-monophosphate in MCF7 cells. *Endocrinology* 1993;133(2):571-6.
252. Jones KA, Tjian R. Sp1 binds to promoter sequences and activates herpes simplex virus 'immediate-early' gene transcription in vitro. *Nature* 1985;317(6033):179-82.
253. Mori K, Fujii R, Kida N, Takahashi H, Ohkubo S, Fujino M, Ohta M, Hayashi K. Complete primary structure of the human estrogen-responsive gene (pS2) product. *J Biochem* 1990;107(1):73-6.
254. Oduro AK, Fritsch MK, Murdoch FE. Chromatin context dominates estrogen regulation of pS2 gene expression. *Exp Cell Res* 2008;314(15):2796-810.
255. Dickson RB, Lippman ME. Growth factors in breast cancer. *Endocr Rev* 1995;16(5):559-89.
256. Cavailles V, Garcia M, Rochefort H. Regulation of cathepsin-D and pS2 gene expression by growth factors in MCF7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1989;3(3):552-8.

257. Kumar V, Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 1988;55(1):145-56.
258. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem* 1997;272(32):19858-62.
259. Elliston JF, Fawell SE, Klein-Hitpass L, Tsai SY, Tsai MJ, Parker MG, O'Malley BW. Mechanism of estrogen receptor-dependent transcription in a cell-free system. *Mol Cell Biol* 1990;10(12):6607-12.
260. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 1999;20(3):321-44.
261. Brown AM, Jeltsch JM, Roberts M, Chambon P. Activation of pS2 gene transcription is a primary response to estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(20):6344-8.
262. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995;270(5241):1491-4.
263. Baron S, Escande A, Alberola G, Bystricky K, Balaguer P, Richard-Foy H. Estrogen receptor alpha and the activating protein-1 complex cooperate during insulin-like growth factor-I-induced transcriptional activation of the pS2/TFF1 gene. *J Biol Chem* 2007;282(16):11732-41.
264. Chinenov Y, Kerppola TK. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* 2001;20(19):2438-52.
265. Martin V, Ribieras S, Song-Wang XG, Lasne Y, Frappart L, Rio MC, Dante R. Involvement of DNA methylation in the control of the expression of an estrogen-induced breast-cancer-associated protein (pS2) in human breast cancers. *J Cell Biochem* 1997;65(1):95-106.
266. Thim L. A new family of growth factor-like peptides. 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett* 1989;250(1):85-90.
267. Playford RJ, Marchbank T, Chinery R, Evison R, Pignatelli M, Boulton RA, Thim L, Hanby AM. Human spasmolytic polypeptide is a cytoprotective agent that stimulates cell migration. *Gastroenterology* 1995;108(1):108-16.
268. Chadwick MP, Westley BR, May FE. Homodimerization and hetero-oligomerization of the single-domain trefoil protein pNR-2/pS2 through cysteine 58. *Biochem J* 1997;327 (Pt 1):117-23.
269. Polshakov VI, Frenkiel TA, Westley B, Chadwick M, May F, Carr MD, Feeney J. NMR-based structural studies of the pNR-2/pS2 single domain trefoil peptide. Similarities to porcine spasmolytic peptide and evidence for a monomeric structure. *Eur J Biochem* 1995;233(3):847-55.
270. Rio MC, Bellocq JP, Daniel JY, Tomasetto C, Lathe R, Chenard MP, Batzenschlager A, Chambon P. Breast cancer-associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa. *Science* 1988;241(4866):705-8.
271. Predine J, Spyrtos F, Prud'homme JF, Andrieu C, Hacene K, Brunet M, Pallud C, Milgrom E. Enzyme-linked immunosorbent assay of pS2 in breast cancers, benign tumors, and normal breast tissues. Correlation with prognosis and adjuvant hormone therapy. *Cancer* 1992;69(8):2116-23.
272. Rio MC, Chambon P. The pS2 gene, mRNA, and protein: a potential marker for human breast cancer. *Cancer Cells* 1990;2(8-9):269-74.
273. Rio MC, Chenard MP, Wolf C, Marcellin L, Tomasetto C, Lathe R, Bellocq JP, Chambon P. Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosal ulceration of the digestive tract. *Gastroenterology* 1991;100(2):375-9.
274. Luqmani YA, Ryall G, Shousha S, Coombes RC. An immunohistochemical survey of pS2 expression in human epithelial cancers. *Int J Cancer* 1992;50(2):302-4.
275. Rio MC, Bellocq JP, Gairard B, Rasmussen UB, Krust A, Koehl C, Calderoli H, Schiff V, Renaud R, Chambon P. Specific expression of the pS2 gene in subclasses of breast cancers in comparison with expression of the estrogen and progesterone receptors and the oncogene ERBB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(24):9243-7.
276. Henry JA, Bennett MK, Piggott NH, Levett DL, May FE, Westley BR. Expression of the pNR-2/pS2 protein in diverse human epithelial tumours. *Br J Cancer* 1991;64(4):677-82.
277. Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Inaji H, Nakamori S, Tateishi R. Prognostic significance of pS2 protein expression in pulmonary adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 1994;30A(6):792-7.

278. Bonkhoff H, Stein U, Welter C, Remberger K. Differential expression of the pS2 protein in the human prostate and prostate cancer: association with premalignant changes and neuroendocrine differentiation. *Hum Pathol* 1995;26(8):824-8.
279. Crombach G, Ingenhorst A, Gohring UJ, Scharl A, Neuhaus W, Mobus V, Schaeffer HJ. Expression of pS2 protein in breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* 1993;253(4):183-92.
280. Nunez AM, Jakowlev S, Briand JP, Gaire M, Krust A, Rio MC, Chambon P. Characterization of the estrogen-induced pS2 protein secreted by the human breast cancer cell line MCF-7. *Endocrinology* 1987;121(5):1759-65.
281. Luqmani Y, Bennett C, Paterson I, Corbishley CM, Rio MC, Chambon P, Ryall G. Expression of the pS2 gene in normal, benign and neoplastic human stomach. *Int J Cancer* 1989;44(5):806-12.
282. Williams R, Stamp GW, Gilbert C, Pignatelli M, Lalani EN. pS2 transfection of murine adenocarcinoma cell line 410.4 enhances dispersed growth pattern in a 3-D collagen gel. *J Cell Sci* 1996;109 (Pt 1):63-71.
283. Prest SJ, May FE, Westley BR. The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells. *FASEB J* 2002;16(6):592-4.
284. Dignass A, Lynch-Devaney K, Kindon H, Thim L, Podolsky DK. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J Clin Invest* 1994;94(1):376-83.
285. Wright NA, Poulson R, Stamp G, Van Noorden S, Sarraf C, Elia G, Ahnen D, Jeffery R, Longcroft J, Pike C, et al. Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993;104(1):12-20.
286. Hoffmann W, Hauser F. The P-domain or trefoil motif: a role in renewal and pathology of mucous epithelia? *Trends Biochem Sci* 1993;18(7):239-43.
287. Bossenmeyer-Pourie C, Kannan R, Ribieras S, Wendling C, Stoll I, Thim L, Tomasetto C, Rio MC. The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J Cell Biol* 2002;157(5):761-70.
288. Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, Linares J, Dierich A, LeMeur M, Wendling C, Tomasetto C, Chambon P, Rio MC. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science* 1996;274(5285):259-62.
289. Hirota M, Miyashita S, Hayashi H, Furukawa Y, Hayashi K. pS2 gene especially expressed in the late G1/S phase of mouse astrocytes. *Neurosci Lett* 1994;171(1-2):49-51.
290. Foekens JA, Rio MC, Seguin P, van Putten WL, Fauque J, Nap M, Klijn JG, Chambon P. Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res* 1990;50(13):3832-7.
291. Foekens JA, van Putten WL, Portengen H, de Koning HY, Thirion B, Alexieva-Figusch J, Klijn JG. Prognostic value of pS2 and cathepsin D in 710 human primary breast tumors: multivariate analysis. *J Clin Oncol* 1993;11(5):899-908.
292. Gion M, Mione R, Dittadi R, Romanelli M, Pappagallo L, Capitano G, Friede U, Barbazza R, Visona A, Dante S. Relationship between cathepsin D and other pathological and biological parameters in 1752 patients with primary breast cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A(5):671-7.
293. Henry JA, Piggott NH, Mallick UK, Nicholson S, Farndon JR, Westley BR, May FE. pNR-2/pS2 immunohistochemical staining in breast cancer: correlation with prognostic factors and endocrine response. *Br J Cancer* 1991;63(4):615-22.
294. Horiguchi J, Iino Y, Takei H. Expression of pS2 estrogen-inducible protein in primary breast cancer. *Oncology* 1996;53(1):12-5.
295. Henry JA, Nicholson S, Hennessy C, Lennard TW, May FE, Westley BR. Expression of the oestrogen regulated pNR-2 mRNA in human breast cancer: relation to oestrogen receptor mRNA levels and response to tamoxifen therapy. *Br J Cancer* 1990;61(1):32-8.
296. Schwartz LH, Koerner FC, Edgerton SM, Sawicka JM, Rio MC, Bellocq JP, Chambon P, Thor AD. pS2 expression and response to hormonal therapy in patients with advanced breast cancer. *Cancer Res* 1991;51(2):624-8.
297. Soubeyran I, Quenel N, Coindre JM, Bonichon F, Durand M, Wafflart J, Mauriac L. pS2 protein: a marker improving prediction of response to neoadjuvant tamoxifen in post-menopausal breast cancer patients. *Br J Cancer* 1996;74(7):1120-5.
298. Klijn JG, Berns EM, Foekens JA. Prognostic factors and response to therapy in breast cancer. *Cancer Surv* 1993;18:165-98.

299. Cappelletti V, Coradini D, Scanziani E, Benini E, Silvestrini R, Di Fronzo G. Prognostic relevance of pS2 status in association with steroid receptor status and proliferative activity in node-negative breast cancer. *Eur J Cancer* 1992;28A(8-9):1315-8.
300. Foekens JA, Portengen H, Look MP, van Putten WL, Thirion B, Bontenbal M, Klijn JG. Relationship of PS2 with response to tamoxifen therapy in patients with recurrent breast cancer. *Br J Cancer* 1994;70(6):1217-23.
301. Revision of the standards for the assessment of hormone receptors in human breast cancer; report of the second E.O.R.T.C. Workshop, held on 16-17 March, 1979, in the Netherlands Cancer Institute. *Eur J Cancer* 1980;16(11):1513-5.
302. Hahnel R. Estimation of estrogen receptors in the clinical laboratory. *Pathol Immunopathol Res* 1986;5(1):54-72.
303. Brown PW, Witorsch RJ, Banks LW, Jr., Lawrence W, Jr. Freezing and storage of breast cancer tissue for estrogen receptor protein assay: a convenient method. *Arch Surg* 1977;112(2):183-5.
304. Thorpe SM, Rose C. Oestrogen and progesterone receptor determinations in breast cancer: technology and biology. *Cancer Surv* 1986;5(3):505-25.
305. Hahnel R, Twaddle E. Estimation of the association constant of the estrogen-receptor complex in human breast cancer. *Cancer Res* 1973;33(3):559-66.
306. Ralet PG, Brombacher PJ. The use of coated charcoal in the determination of oestrogen receptor activity. *Eur J Nucl Med* 1981;6(4):159-62.
307. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
308. Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 1949;51:660-72.
309. Nikolić-Vukosavljević D, Markičević M, Todorović S. Single-point versus five-point biochemical method for determination of estrogen and progesterone receptors. *Jugoslov Med Biohem* 2002;21(1):15-9.
310. Ong LD, LeClare PC. The Kolmogorov-Smirnov test for the log-normality of sample cumulative frequency distributions. *Health Phys* 1968;14(4):376.
311. Petz B. Test sume rangova. In: *Osnovne statističke metode za nematematičare*. Zagreb: Sveučilišna Naklada Liber; 1985. p. 309-11.
312. Petz B. Kruskal-Wallisov test. In: *Osnovne statističke metode za nematematičare*. Zagreb: Sveučilišna Naklada Liber; 1985. p. 321-23.
313. Petz B. Izračunavanje rang korelacije. In: *Osnovne statističke metode za nematematičare*. Zagreb: Sveučilišna Naklada Liber; 1985. p. 191-96.
314. Petz B. Hi-kvadrat test. In: *Osnovne statističke metode za nematematičare*. Zagreb: Sveučilišna Naklada Liber; 1985. p. 235-60.
315. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Statist Assn* 1958;53:457-81.
316. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 1966;50(3):163-70.
317. Botha JL, Bray F, Sankila R, Parkin DM. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur J Cancer* 2003;39(12):1718-29.
318. Henderson IC, Patek AJ. The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52(1-3):261-88.
319. Gasparini G. Prognostic variables in node-negative and node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52(1-3):321-31.
320. Clark GM. Prognostic and predictive factors for primary breast cancer. *Proc ASCO Educational Book* 1999:205-7.
321. Kaufmann M. Review of known prognostic variables. *Recent Results Cancer Res* 1996;140:77-87.
322. Daidone MG, Silvestrini R. Prognostic and predictive role of proliferation indices in adjuvant therapy of breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001(30):27-35.
323. Thomssen C, Janicke F, Harbeck N. Clinical relevance of prognostic factors in axillary node-negative breast cancer. *Onkologie* 2003;26(5):438-45.
324. Robbins PD, Hahnel E, Sterrett GF, Harvey J, Carrello S, Hahnel R. Expression of the pS2 gene in breast cancer--a comparison of pS2 protein radioimmunoassay and immunohistochemistry. *Pathology* 1993;25(3):255-60.

325. Maudelonde T, Brouillet JP, Roger P, Giraudier V, Pages A, Rochefort H. Immunostaining of cathepsin D in breast cancer: quantification by computerised image analysis and correlation with cytosolic assay. *Eur J Cancer* 1992;28A(10):1686-91.
326. Luqmani Y, Temmim L, Memon A, Parkar A, Ali M, Motawy M, Baker H. Immunoradiometric measurement of pS2 in breast cancer--correlation with steroid receptors and plasminogen activators. *Acta Oncol* 1999;38(6):805-14.
327. George SL. Identification and assessment of prognostic factors. *Semin Oncol* 1988;15(5):462-71.
328. Rochefort H. The prognostic value of cathepsin D in breast cancer. A long road to the clinic. *Eur J Cancer* 1996;32A(1):7-8.
329. Benraad TJ, Geurts-Moespot A, Sala M, Piffanelli A, Ross A, Foekens JA. Quality control of cathepsin-D measurement by the EORTC Receptor Study Group. *Eur J Cancer* 1992;28(1):72-5.
330. Altman DG, Lyman GH. Methodological challenges in the evaluation of prognostic factors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52(1-3):289-303.
331. Bossard N, Descotes F, Bremond AG, Bobin Y, De Saint Hilaire P, Golfier F, Awada A, Mathevet PM, Berrerd L, Barbier Y, Esteve J. Keeping data continuous when analyzing the prognostic impact of a tumor marker: an example with cathepsin D in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003;82(1):47-59.
332. Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W, Schumacher M. Dangers of using "optimal" cutpoints in the evaluation of prognostic factors. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(11):829-35.
333. Rutqvist LE. Controversial issues in adjuvant systemic therapy of early breast cancer. *Acta Oncol* 1998;37(5):421-30.
334. Markicevic M, Petrovic A, Kanjer K, Neskovic-Konstantinovic Z, Nikolic-Vukosavujevic D. Estrogen-regulated cut-off values of pS2 and cathepsin D expression in breast carcinomas. *Adv Exp Med Biol* 2008;617:341-8.
335. Takeuchi H, Baba H, Kano T, Maehara Y. The time-related changes of the importance of prognostic factors in breast cancer. A sequential multivariate analysis of 1423 Japanese patients. *Breast Cancer Res Treat* 2005;94(3):273-8.
336. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008;8(10):755-68.
337. Nikolic-Vukosavljevic D, Markicevic M, Grujic-Adanja G, Petrovic A, Kanjer K, Neskovic-Konstantinovic Z. Cathepsin D-related disease-free interval in pT1 primary breast carcinomas: a pilot study. *Clin Exp Metastasis* 2005;22(4):363-8.
338. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007;87(3):905-31.
339. Keay J, Bridgham JT, Thornton JW. The Octopus vulgaris estrogen receptor is a constitutive transcriptional activator: evolutionary and functional implications. *Endocrinology* 2006;147(8):3861-9.

8. SPISAK SKRAĆENICA

Skraćenica	Pun naziv	strana
DFI	interval bez ponovne pojave bolesti	1
OS	ukupno preživljavanje	1
EMT	epitelno-mezenhimalni pelaz	11
ER	receptor za estrogen	14
PR	receptor za progesteron	14
HER2/ <i>neu</i>	humani epidermalni faktor rasta 2	14
NSABP	The National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project	15
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results	16
IDC	invazivni duktalni karcinom	16
IL	invazivni lobularni karcinom	16
SBR klasifikacija	Scarff-Bloom-Richardson klasifikacija	17
IGF	faktor rasta sličan insulinu	22
TNF	faktor nekroze tumora	22
EGF	epidermalni faktor rasta	22
bFGF	bazni fibroblasni faktor rasta	22
iRNK	informaciona RNK	22
Asn	asparagin	22
M6P	manoza-6-fosfat	23
M6P-R	receptor za manozu-6-fosfat	23
Asp	aspartat	24
ATP	adenozin-3-fosfat	26
IAP	inhibitor proteina apoptoze	30
ELISA	esej sa enzimom na adsorbentu	33
IRMA	imunradiometrijski esej	33
TFF	detelinasti faktor	35
SP	spazmolitični protein	35
ITF	crevni detelinasti faktor	35
ERE	element odgovora na delovanje estrogena	35
TPA	tkivni aktivator plazminogena	35
AP	protein aktivacije	35
pS2B1, pS2B2	mesta za početak transkripcije gena za pS2	35

TGF	faktor rasta koji transformiše	36
TRE	element odgovora na delovanje proteina aktivacije	36
EORTC	Evropska organizacija za istraživanje i lečenje raka	45
EDTA	etilen diamin tetrasirćetna kiselina	46
TRIS	tris (hidroksi-metil) aminometan	47
PPO	2,5-difenil-oksazol	47
POPOP	1,4-bis-(5-fenil-oksazol-2-yl)-benzen	47
cpm	broj detektovanih raspada u minuti	47
dpm	broj raspada u minuti	47
BSA	goveđi serum albumin	48

9. SPISAK PRILOGA

9. 1. Spisak slika

<i>Slika 1.1. - Dva predložena modela za inicijaciju i progresiju tumora, odnosno heterogenost tumora</i>	4
<i>Slika 1.2. - Različiti koraci u okviru metastatske kaskade</i>	6
<i>Slika 1.3. - Moguće sudbine malignih ćelija na sekundarnom mestu</i>	7
<i>Slika 1.4. - Sudbina rasejanih tumorskih ćelija</i>	10
<i>Slika 1.5. - Šematski prikaz strukture aspartatskih peptidaza</i>	23
<i>Slika 1.6. - Prikaz strukture proteina pS2/TTF1</i>	38
<i>Slika 3.1. - Grafički prikaz Scatchard-ove jednačine</i>	48
<i>Slika 3.2. - Šematski prikaz principa na kome se zasniva tzv. „sendvič“ imunoradiometrijski esej na čvrstoj fazi</i>	50
<i>Slika 4.1. - Raspodela učestalosti koncentracija katepsina D, za 226 pacijentkinja sa primarnim operabilnim karcinomom dojke, u intervalima od 20/40 pmol/mg</i>	52
<i>Slika 4.2. – Raspodela vrednosti koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim statusom limfnih čvorova, u okviru statusa ER/PR</i>	58
<i>Slika 4.3. – Raspodela vrednosti koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim veličinom tumora, u okviru statusa ER/PR</i>	58
<i>Slika 4.4. – Raspodela učestalosti koncentracija pS2, za 226 pacijentkinja sa primarnim operabilnim karcinomom dojke, u intervalima od 10/20 ng/mg</i>	62
<i>Slika 4.5. – Raspodela vrednosti koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim statusom ER, u okviru fenotipova definisanih statusom menopauze i histološkim gradusom tumora</i>	67
<i>Slika 4.6. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje koje su imale negativan (pN0), odnosno pozitivan status limfnih čvorova (pN+), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci</i>	70
<i>Slika 4.7. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa tumorima različitog histološkog gradusa (I, II, III), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci</i>	71
<i>Slika 4.8. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje koje su imale tumore sa pozitivnim (PR+), odnosno negativnim statusom receptora za progesteron (PR-), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci</i>	71
<i>Slika 4.9. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa negativnim (pN0) i pozitivnim (pN+) statusom limfnih čvorova, koje su imale pT2 tumore i negativan (CD-, crne linije), odn. pozitivan status katepsina D (CD+, sive linije), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci</i>	73
<i>Slika 4.10. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa III i sa pozitivnim statusom limfnih čvorova (pN+), koje su imale pozitivan (CD+), odnosno negativan (CD-) status katepsina D, u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci</i>	74
<i>Slika 4.11. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa tumorima različitog histološkog gradusa (I, II, III), koje su imale negativan status katepsina D (CD-), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci</i>	76

Slika 4.12. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa I, koje su imale pozitivan (CD+), odnosno negativan (CD-) status katepsina D, u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci.....	76
Slika 4.13. – Verovatnoća za DFI (P) za postmenopauzne pacijentkinje sa negativnim (pN0) i pozitivnim (pN+) statusom limfnih čvorova, koje su imale negativan (pS2-, crne linije), odnosno pozitivan status pS2 (pS2+, sive linije), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci.....	78
Slika 4.14. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa pT2 tumorima histološkog gradusa I ili II (I+II) i histološkog gradusa III, koje su, istovremeno, imale negativan (pS2-, crne linije), odnosno pozitivan status pS2 (pS2+, sive linije), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci.....	79
Slika 4.15. – Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa II i fenotipom ER+PR+, odnosno ER+PR-, koje su, istovremeno, imale pozitivan (pS2+, crne linije), odnosno negativan status pS2 (pS2-, sive linije), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci.....	80
Slika 4.16. – Verovatnoća za DFI (P) za pre- i postmenopauzne pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa II i fenotipom ER+PR+, koje su, istovremeno, imale pozitivan (pS2+, crne linije), odnosno negativan status pS2 (pS2-, sive linije), u intervalu praćenja toka bolesti od 36 meseci.....	81
Slika 5.1. - Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje koje su primale samo hormonsku (— —) ili samo hemijsku (—) terapiju ili uopšte nisu primale (— —) adjuvantnu sistemska terapiju.....	93
Slika 5.2. - Verovatnoća za DFI (P) za pacijentkinje sa tumorima histološkog gradusa I ili II (I+II), odnosno histološkog gradusa III, u intervalu praćenja toka bolesti od 36 mesec.....	98

9. 2. Spisak tabela

Tabela 3.1. - Raspodela pacijentkinja po grupama definisanim parametrima domaćina tumora, tumora, statusom ER i/ili statusom PR.....	44
Tabela 4.1. - Karakteristike raspodele koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora (broj pacijenata, opseg vrednosti i medijana koncentracije, p vrednost).....	53
Tabela 4.2. – Karakteristike raspodele koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim parametrima tumora (broj pacijenata, opseg vrednosti i medijana koncentracije, p vrednost).....	55
Tabela 4.3. – Karakteristike raspodele koncentracija katepsina D u grupama pacijentkinja definisanim statusom ER i/ili PR (broj pacijenata, opseg vrednosti i medijana koncentracije, p vrednost).....	56
Tabela 4.4. – Broj pacijentkinja, na osnovu statusa katepsina D, u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, tumora ili statusima ER i/ili PR i odgovarajuće p vrednosti.....	60
Tabela 4.5. – Karakteristike raspodele koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora (broj pacijentkinja, opseg vrednosti i medijana koncentracije, p vrednost).....	63
Tabela 4.6. – Karakteristike raspodele koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim parametrima tumora (broj pacijentkinja, opseg vrednosti i medijana koncentracije, p vrednost).....	64
Tabela 4.7. – Karakteristike raspodele koncentracija pS2 u grupama pacijentkinja definisanim statusom ER i/ili PR (broj pacijentkinja, opseg vrednosti i medijana koncentracije, p vrednost).....	65
Tabela 4.8. – Broj pacijentkinja, na osnovu statusa pS2, u grupama pacijentkinja definisanim parametrima domaćina tumora, tumora ili statusima ER i/ili PR i odgovarajuće p vrednosti.....	68



Прилог 1.

Изјава о ауторству

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

Значај експресије, регулисане естрогеном, протеина pS2 и катепсина Д у примарном операбилном карциному дојке

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 31. 12. 2013. године,

Markičević Milan

Прилог 2.

Изјава о коришћењу

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

Значај експресије, регулисане естрогеном, протеина pS2 и катепсина Д у примарном операбилном карциному дојке

која је моје ауторско дело.

Сагласан сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци дат је на следећој страници.)

Потпис

У Београду, 31. 12. 2013. године,



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

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

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

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

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

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