



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Далибор В. Јовановић

**УЛОГА ЋЕЛИЈСКЕ СЕНЕСЦЕНЦИЈЕ ИНДУКОВАНЕ
ОНКОГЕНИМА У МАЛИГНОЈ ТРАНСФОРМАЦИЈИ И
ПРОГРЕСИЈИ ТУМОРА ДОЈКЕ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2022.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Dalibor V. Jovanović

**ULOGA ĆELIJSKE SENESCENCIJE INDUKOVANE
ONKOGENIMA U MALIGNOJ TRANSFORMACIJI I
PROGRESIJI TUMORA DOJKE**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2022.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Dalibor V. Jovanovic

**THE ROLE OF ONCOGENE-INDUCED SENESENCE IN
MALIGNANT TRANSFORMATION AND BREAST TUMOR
PROGRESSION**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2022.

Аутор
Име и презиме: Далибор Јовановић
Датум и место рођења: 30.11.1984., Крагујевац, Србија
Садашње запослење: Истраживач сарадник на предмету Патолошка анатомија, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Улога ћелијске сенесценције индуковане онкогенима у малигној трансформацији и прогресији тумора дојке
Број страница: 128
Број слика: 8 табела, 46 фигура
Број библиографских података: 574
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област: Медицина
Ментор: Проф. др Слободанка Митровић , редовни професор за ужу научну област Патолошка анатомија, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 08.07.2017.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације:
IV-03-689/41 од 8.09.2017. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> 1. проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник 2. проф. др Гордана Радосављевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан 3. проф. др Светислав Татић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Патолошка анатомија, члан 4. доц. др Срђан Нинковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан 5. проф. др Берислав Векић, професор по позиву Медицинског факултета Универзитета у Београду за област дигестивна хирургија, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:
<ol style="list-style-type: none"> 1. , председник 2. , члан 3. , члан
Датум одбране дисертације:

Autor
Ime i prezime: Dalibor Jovanović
Datum i mesto rođenja: 30.11.1984., Kragujevac, Srbija
Sadašnje zaposlenje: Istraživač saradnik na predmetu Patološka anatomija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Doktorska disertacija
Naslov: Uloga ćelijske senescencije indukovane onkogenima u malignoj transformaciji i progresiji tumora dojke
Broj stranica: 128
Broj slika: 8 tabela, 46 figura
Broj bibliografskih podataka: 574
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Naučna oblast: Medicina
Mentor: Prof. dr Slobodanka Mitrović , redovni profesor za užu naučnu oblast Patološka anatomija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Ocena i odbrana
Datum prijave teme: 08.07.2017.
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske disertacije: IV-03-689/41 od 8.09.2017. godine
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: <ol style="list-style-type: none"> 1. prof. dr Ivan Jovanović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za uže naučne oblasti Mikrobiologija i imunologija; Onkologija, predsednik 2. prof. dr Gordana Radosavljević, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija, član 3. prof. dr Svetislav Tatić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Patološka anatomija, član 4. doc. dr Srđan Ninković, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Hirurgija, član 5. prof. dr Berislav Vekić, profesor po pozivu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za oblast digestivna hirurgija, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije: <ol style="list-style-type: none"> 1. , predsednik 2. , član 3. , član
Datum odbrane disertacije:

Author
Name and surname: Dalibor Jovanovic
Date and place of birth: 30 th of November, 1984., Kragujevac, Serbia
Current employment: Research Assistant at the department of Pathological anatomy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: The role of oncogene-induced senescence in malignant transformation and breast tumor progression
No. of pages: 128
No. of images: 8 table, 46 figure
No. of bibliographic data: 574
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: Prof. Dr. Slobodanka Mitrovic , Full Professor of Pathological Anatomy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 8 th of July 2017.
Decision number and date of acceptance of the doctoral: IV-03-689/41 from 8 th of September 2017.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: 1. Assoc. Prof. Ivan Jovanovic, Associate Professor at the department of Microbiology and Immunology; Oncology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, President 2. Assoc. Prof. Gordana Radosavljevic, Associate Professor at the department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member 3. Prof. Svetislav Tatic, Full Professor at the department of Pathological anatomy, Faculty of Medicine, University of Belgrade, member 4. Asst. Prof. Srdjan Ninkovic, Assistant Professor at the department of surgery, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member 5. Prof. Berislav Vekic, visiting professor at the department of surgery, Faculty of Medicine, University of Belgrade, member
Commission for evaluation and defense of doctoral: 1., President 2., member 3., member
Date of Dissertation Defense:

Захвалница

Пре свега се захваљујем Проф. др Слободанки Митровић, мом ментору, на свеобухватној помоћи, стручним и пријатељским саветима, идејама и времену које је поделила са мном у свим фазама израде ове докторске дисертације,

Велику захвалност дугујем мојим колегама са Катедре за Патолошку анатомију, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, као и целокупном пожртвованом и стручном особљу службе за Патолошко-анатомску дијагностику УКЦ Крагујевац.

Посебну захвалност дугујем својој породици, пре свега супруги Марији и сину Павлу на свакодневnoj несебичној подршци, разумевању, на великом стрпљењу, на моралној подршци, на позитивном ставу и сталној инспирацији да ствари посматрам ведрије.

Своју докторску дисертацију посвећујем сину Павлу.

САЖЕТАК

Упркос значају појединих прогностичких фактора, њихова тачност у процени исхода и одређивању стратегија лечења оболелих од карцинома дојке је ограничена. Стога би дефинисање нових молекуларних биомаркера могло пружити поузданији приступ у предвиђању прогнозе ове болести.

Циљ ове студије је испитивање експресије маркера *p16*, *p53*, *p21*, *pRb* и *GLB1* у бенигним и малигним променама дојке, као и њиховог учешћа у малигној трансформацији.

Истраживање је обухватило анализу ткивног материјала бенигну и малигну промена пацијенткиња оперисаних у УКЦ Крагујевац. На *H&E* обојеним препаратима дефинисани су сви макро и микроморфолошки прогностички фактори (хистолошки тип и градус тумора, величина, нодални статус, дезмоплазија, некроза, моноклеарна реакција и тд.) Имунохистохемијски, применом антитела (*p16*, *p53*, *p21*, *pRb*, *GLB1*), одређивана је ткивна експресија маркера семиквантитативним читавањем позитивне реакције. Дефинисањем *cut off* вредности, карциноми су сврставани у позитивну и негативну групу за сваки анализирани маркер.

Експресија свих маркера расте са прогресијом цитолошких промена у епителу. Њихова експресија је у позитивној корелацији са различитим променама у дојци, са пролиферативним индексом и *HER2+* туморима. Експресија *p16*, *pRb*, *p21*, *GLB1* је највећа у *HER2+* карциномима дојке, док је експресија *p53* највећа у *TNBC*. Значајна корелација је утврђена између експресије *p16* и *p53*, *p21* и *pRb*, *p21* и *GLB1*, као и између *pRb* и *GLB1* у инвазивном карциному.

Анализирани маркери играју важну улогу у пролиферацији, малигној трансформацији, као и у прогресији карцинома дојке, што их препоручује за даља истраживања и могуће коришћење у дијагностичке, прогностичке и предиктивне сврхе.

Кључне рече: карцином дојке; ћелијска сенесценција; инхибитор циклин зависних киназа *p16*; *p53* тумор супресорски протеин; инхибитор циклин зависних киназа *p21*; протеин ретинобластома.

ABSTRACT

Despite the importance of certain prognostic factors, their accuracy in assessing outcomes and determining treatment strategies for breast cancer patients is limited. Therefore, the definition of new molecular biomarkers could provide a more reliable approach for prediction of the prognosis of this disease.

The aim of this study was to examine the expression of markers *p16*, *p53*, *p21*, *pRb* and *GLB1* in benign and malignant breast changes, as well as their participation in malignant transformation.

The research included the analysis of tissue material of benign and malignant changes in patients operated at the University Clinical Center Kragujevac. All macro and micromorphological prognostic factors (histological type and grade of tumor, size, nodal status, desmoplasia, necrosis, mononuclear reaction, etc.) were defined on *H&E* stained preparations. Immunohistochemically, using antibodies (*p16*, *p53*, *p21*, *pRb*, *GLB1*) tissue expression of markers were determined by a semiquantitative reading of a positive reaction. By defining cut-off values, cancers were classified into positive and negative groups for each analyzed marker.

The expression of all markers increased with the progression of cytological changes in the epithelium. Their expression positively correlated with various changes in the breast, with the proliferative index and *HER2+* tumors. The expression of *p16*, *pRb*, *p21*, *GLB1* is the highest in *HER2+* breast cancers, while the expression of *p53* is the highest in *TNBC*. A significant correlation was found between the expression of *p16* and *p53*, *p21* and *pRb*, *p21* and *GLB1*, as well as between *pRb* and *GLB1* in invasive cancer.

The analyzed markers play an important role in proliferation, malignant transformation, as well as in the progression of breast cancer, which recommends them for further research and possible use for diagnostic, prognostic and predictive purposes.

Key words: breast cancer; cellular senescence; cyclin-dependent kinase inhibitor *p16*; tumor suppressor protein *p53*; cyclin-dependent kinase inhibitor *p21*; retinoblastoma protein.

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. КАРЦИНОМ ДОЈКЕ.....	1
1.1.1 Епидемиологија	1
1.1.2. Фактори ризика.....	1
1.1.3. Класификација тумора дојке	2
1.1.4. Одређивање клиничког стадијума карцинома дојке (<i>TNM</i> класификација) ...	3
1.1.5. Молекуларна класификација карцинома дојке	5
1.1.6. Прогностички и предиктивни фактори карцинома дојке.....	7
1.2. СЕНЕСЦЕНЦИЈА	12
1.2.1. Механизам сенесценције	15
1.2.2. Репликативна сенесценција.....	15
1.2.3. Оксидативни стрес и сенесценција.....	16
1.2.4. Онкогенима индукована сенесценција (<i>OIS</i>).....	16
1.2.5. Сенесценцијом узрокован секреторни фенотип (<i>SASP</i>).....	24
1.2.6. Учешће сенесценције у туморогенези.....	26
1.2.7. Сенесценција у третману карцинома	28
1.2.8. Будуће перспективе и изазови	29
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	31
2.1. Циљеви истраживања	31
2.2. Основне хипотезе	31
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	32
3.1. Врста студије	32
3.2. Одобрење етичког комитета.....	32
3.3. Популација која се истражује	32
3.4. Фиксација ткива и бојење хематоксилином и еозином (<i>H&E</i>).....	33
3.5. Фотографисање ткивних пресека	33
3.6. Имунохистохемија	34
3.6.1. Имунохистохемијски метод бојења ткивних исечака калупљених у парафину	34
3.6.2. Очитавање имунохистохемијске експресије испитиваних маркера.....	35
3.7. Узорковање	35
3.8. Варијабле које се мере у студији	36
3.9. Статистичка обрада података.....	36
4. РЕЗУЛТАТИ	37
4.1. Опште карактеристике.....	37
4.2. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ <i>p16</i>	40

4.2.1. Експресија <i>p16</i> у односу на цитолошке промене у епителу	40
4.2.2. Експресија <i>p16</i> у туморским ћелијама у односу на молекуларни подтип <i>IBC</i>	41
4.2.3. Експресија <i>p16</i> као маркер прогресије карцинома дојке.....	43
4.2.4. Субцелуларна локализација експресије <i>p16</i> протеина и инвазивност тумора	48
4.3. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ <i>p53</i>	49
4.3.1. Експресија <i>p53</i> у односу на цитолошке промене у епителу	49
4.3.2. Експресија <i>p53</i> у туморским ћелијама у односу на молекуларни подтип <i>IBC</i>	51
4.3.3. Експресија <i>p53</i> као маркера прогресије карцинома дојке.....	54
4.4. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ <i>p21</i>	57
4.4.1. Експресија <i>p21</i> у односу на цитолошке промене у епителу	57
4.4.2. Експресија <i>p21</i> у туморским ћелијама у односу на молекуларни подтип <i>IBC</i>	59
4.4.3. Експресија <i>p21</i> као маркера прогресије карцинома дојке.....	62
4.5. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ <i>pRb</i>	65
4.5.1. Експресија <i>pRb</i> у односу на цитолошке промене у епителу.....	65
4.5.2. Експресија <i>pRb</i> у туморским ћелијама у односу на молекуларни подтип <i>IBC</i>	66
4.5.3. Експресија <i>pRb</i> као маркера прогресије карцинома дојке	69
4.6. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ <i>GLB1</i>	72
4.6.1. Експресија <i>GLB1</i> у односу на цитолошке промене у епителу.....	72
4.6.2. Експресија <i>GLB1</i> у туморским ћелијама у односу на молекуларни подтип <i>IBC</i>	73
4.6.3. Експресија <i>GLB1</i> као маркера прогресије карцинома дојке	75
4.7. Анализа међусобних односа експресије маркера <i>OIS</i>	78
5. ДИСКУСИЈА	80
5.1. <i>p16</i>	80
5.2. <i>p53</i>	83
5.3. <i>p21</i>	87
5.4. <i>pRb</i>	90
5.5. <i>SA-β-GAL</i> одређена помоћу <i>GLB1</i>	92
5.6. Путеви сенесценције <i>p53-p21</i> и <i>p16-pRb</i>	94
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	96
7. ЛИТЕРАТУРА.....	97

1. УВОД

1.1. КАРЦИНОМ ДОЈКЕ

1.1.1 Епидемиологија

Карцином дојке је најчешћи малигнитет код жена (30% свих нових случајева рака), други је водећи узрок смрти од рака код жена (15% свих смртних случајева од рака)(1) и представља важан јавни здравствени проблем широм света(2). У свету сваке године имамо 1,7 милиона новооболелих жена и више од пола милиона умрлих, са процењених 2,3 милиона нових случајева рака дијагностикованих 2020. широм света(3). Кумулативна вероватноћа оболевања је 12,5%, односно свака осма жена може очекивати да ће током свог живота оболети од ове опаке болести(4). Висок ризик оболевања је пре свега у западном свету, док жене у Африци и Азији имају низак ризик(5). Осим континенталних разлика и разлике у економској развијености су утицале на учесталост ове болести. У развијеним земљама расте број нових случајева карцинома дојке. Међутим, због напретка у дијагностици и лечењу, смртност од ове болести опада(6).

У Републици Србији се сваке године региструје око 4000 новооткривених случајева ове болести, што представља више од четвртине свих малигних болести код жена, при чему већина европских земаља показује опадајући тренд морталитета од карцинома дојке, док су Србија, Пољска и Румунија и у последњем периоду забележиле мање повољне трендове. Тако у 2017. години највеће стопе морталитета забележене су у Србији (20,6/100.000 жена)(7).

1.1.2. Фактори ризика

Фактори ризика су све оно што утиче и повећава могућност појаве болести, па тако и појаву карцинома дојке. Присуство једног или више фактора ризика не условљава обавезно настајање болести. Показано је да постоји више фактора који су удружени са повећаним ризиком за настанак карцинома дојке. Најзначајнији међу њима су старосна доб, генетски и хормонални фактори(8).

Старење је један од најважнијих фактора ризика за карцином дојке, јер је учесталост карцинома дојке у великој мери повезана са старијом животном доби. У Америци у 2018. години највећи проценат свих смртних случајева повезаних са карциномом дојке, био је код жена старијих од 40 и 60 година(9). Повећан ризик од карцинома дојке код жена старијих од 40 година, нарочито код постменопаузалних показан је у студији Сантоса и сарадника(10).

Генетски фактори за настанак рака дојке су комплексни из више разлога, јер постоје бројне генске мутације које могу да доведу до настанка карцинома дојке. Ризик је већи код жена код којих постоји позитивна породична анамнеза, код млађих жена у време откривања болести и код жена са лобуларним типом карцинома дојке. У више од 50% случајева билатералног карцинома дојке постоје мутације на *BRCA1* и *BRCA2* (енгл. *Breast Cancer genes 1 and 2*) супресорским генима. Кумулативне процене ризика за развој карцинома дојке до 80. године су 72% за носиоце *BRCA1* и 69% за носиоце *BRCA2*(11). Мутације *BRCA1* и *BRCA2* гена носе са собом ризик од настанка не само карцинома дојке, већ и оваријума. Генетски фактори се односе и на мутације других гена (енгл. *Ataxia Telangiectasia Mutated, ATM*; енгл. *Cadherin 1, CDH1*; енгл. *Checkpoint Kinase 2, CHEK2*; енгл. *Meiotic Recombination 11 Homolog, MRE11A*; енгл. *Nibrin, NBN*; енгл. *Partner And Localizer Of BRCA2, PALB2*; енгл. *Phosphatase And Tensin Homolog, PTEN*; енгл. *double strand break repair protein, RAD50*; и енгл. *tumor protein p53, TP53*)(12-14),

а битна је и активација протоонкогена *HER2/neu* (енгл. *erb-b2 receptor tyrosine kinase*). Због тога је око 5-10 % карцинома дојке наследно, а највећи ризик, носе жене чије су мајке имале обострани карцином дојке пре менопаузе.

Најзначајнији ендокрини фактори су: ендогени хиперестринизам, дуго трајање генеративног раздобља (менарха пре 12. и менопауза након 50. године), укупно трајање репродуктивног периода, неплодност, старија прворотка, гојазност, узимање оралних контрацептива и хормонска супституциона терапија(6, 15, 16).

Спољашњи фактори ризика укључују повећано конзумирање алкохола, изложеност јонизујућем зрачењу, пушење, дуготрајно бојење косе и стрес(6, 17). С друге стране, постоје случајеви карцинома дојке код којих се не може доказати утицај ни једног од наведених фактора.

1.1.3. Класификација тумора дојке

Хистолошка грађа дојке је веома сложена, па хистогенетско порекло тумора у њој може бити: епително, мезенхимално и мешовито. У оквиру сваке хистогенетске групе, према биолошком понашању, групишу се на: **бенигне** (папиломи, аденоми, фиброаденоми, филодни тумори), **граничне** (*borderline*-филодни тумори) и **малигне туморе** (карциноми, саркоми, карциносаркоми и малигни филодни тумори). Најчесталија група малигну тумора дојке су карциноми, тумори епителног порекла. Карциноми дојке су и генетски и клинички изузетно хетерогена група малигнитета. Можемо их класификовати на више начина у зависности од тога који критеријум узмемо као полазну основу. У односу на инвазију околног ткива, туморе дојке делимо на инвазивне и не-инвазивне (*in situ*). Инвазивни карциноми имају способност да њихове ћелије продру у околна ткива, регионалне лимфне чворове или стичу способност метастазирања, односно способност да населе удаљена ткива и органе, док су не-инвазивни карциноми они чије ћелије нису инфилтрирале у околно ткиво, односно чије ћелије нису пробиле базалну мембрану(18).

У односу на то да ли настају из епитела каналића или ацинуса, све инвазивне карциноме дојке грубо делимо у дукталне и лобуларне инвазивне карциноме. Дуктални карциноми чине од 70-85%, док лобуларни чине од 8-15% свих инвазивних карцинома дојке. Преосталих око 10% су посебни облици карцинома дојке међу које убрајамо тубуларни, медуларни, папиларни, муцинозни карцином и др (19).

Дуктални карцином је најчешћи хистолошки тип инвазивног карцинома дојке. Јавља се у две варијанте; чешће као дуктални инвазивни карцином без посебних карактеристика (енгл. *Not Otherwise Specified, NOS*) и ређе, као комедо дуктални карцином. Туморске ћелије су плеоморфне, варирају у облику и величини и обично су са истакнутим нуклеолусима и бројним митозама. У преко 50% случајева могу се открити калцификације и некрозе(20). Количина строме је променљива, креће се од оскудне до обилне. Често се нађе интраваскуларна и перинеурална инвазија, као и захватање лимфних чворова. Инвазивни дуктални карцином је даље подкласификован, на основу нивоа нуклеарног плеоморфизма, формирања жлезда / тубула и митотичког индекса, као добро диферентован (*gradus 1*), умерено диферентован (*gradus 2*) или слабо диферентован (*gradus 3*).

Лобуларни инвазивни карцином се карактерише чешћим билатералним појављивањем, као и мултифокалношћу и мултицентричношћу унутар исте дојке. Туморске ћелије су обично округласте, мале, релативно униформне и некохезивне. Инактивација Е-кадерина мутацијом, губитком хетерозиготности или метилацијом карактеристичне су молекуларне промене у инвазивном лобуларном карциному, посебно плеоморфном подтипу. Овај тумор има пет различитих хистолошких група:

најчешћа класична и ређе солидна, алвеоларна, плеоморфна, тубуларна. Цитолошке варијације у лобуларном карциному су *signet ring* и хистиоцитни тип ћелија (21).

Тубуларни, медуларни, муцинозни и папиларни карциноми ређе се јављају, у просеку од 0,5-2% и имају повољнију прогнозу од инвазивног дукталног и лобуларног карцинома.

1.1.4. Одређивање клиничког стадијума карцинома дојке (TNM класификација)

Туморски стадијум, односно фаза развоја тумора, односи се на клинички степен туморског раста и његовог ширења. Заснива се на величини примарне лезије, захваћености регионалних лимфних нодуса и присуству или одсуству хематогених метастаза. *UICC* (енгл. *Union for International Cancer Control*) за одређивање стадијума болести користи тзв. *TNM* систем, где *T* означава величину примарног тумора, *N* проширеност тумора у регионалне лимфне чворове, а *M* одговара хематогеним метастазама.

TNM класификација тумора дојке према Светској здравственој организацији(22):

Патохистолошка класификација примарног тумора (T)

T - примарни тумор:

T_x - примарни тумор се не може одредити

T₀ - примарни тумор није доказан

T_{is} - карцином *in situ*

T₁ - тумор ≤ 2 cm

T_{1a}: тумор $> 0,1$ cm, али не већи од 0,5 cm

T_{1b}: тумор $> 0,5$ cm, али не већи од 1 cm

T_{1c}: тумор > 1 cm, али не већи од 2 cm

T₂ - тумор $>$ од 2 cm, али не већи од 5 cm

T₃ - тумор > 5 cm

T₄ - тумор било које величине са директним ширењем на зид грудног коша или кожу

T_{4a}: ширење у зид грудног коша

T_{4b}: улцерација коже дојке, истострани сателитски чворови у кожи или едем коже (укључујући *peau d'orange*)

T_{4c}: 4a и 4b

T_{4d}: инфламаторни карцином

Регионални лимфни чворови су:

Аксиларни (истострани): интерпекторални (*Rotter*) чворови и лимфни чворови дуж аксиларне вене и њених притока, које се могу поделити на следеће нивое:

- **Ниво I (доњи спрат):** лимфни чворови бочно у односу на спољашњу ивицу малог грудног мишића.

- **Ниво II (средњи спрат):** лимфни чворови између унутрашње и спољашње ивице малог грудног мишића и интерпекторалних (*Rotter*) лимфних чворова.

- **Ниво III (горња спрат):** горњи лимфни чворови у врху аксиле и они унутра од унутрашње ивице малог грудног мишића, искључујући инфра и супраклавикуларне чворове.

Инфраклавикуларни (субклавикуларни) (истострани)

Дуж мамарије интерне (истострани) лимфни чворови у међуребарним просторима дуж ивице стернума у ендоторакалној фасцији.

Супраклавикуларни (истострани)

Патохистолошка класификација регионалних лимфних чворова (pN):

pNx - регионални лимфни чворови се не могу проценити (нису уклоњени ради испитивања или су претходно уклоњени)

pN0 - регионални лимфни чвор без метастазе

pN1 - микрометастазе или метастаза у 1 до 3 истострана аксиларна лимфна чвора, односно истостраним унутрашњим чворовима дојке са метастазом откривеном дисекцијом стражарског лимфног чвора, али клинички није очигледна.

pN1mi - микрометастаза (већа од 0,2 mm и/или више од 200 ћелија, али не веће од 2 mm)

pN1a - метастаза у 1 до 3 аксиларна лимфна чвора, укључујући бар један чија највећа димензија прелази 2 mm

pN1b - унутрашњи лимфни чворови дојке са микроскопском метастазом откривеном дисекцијом стражарског лимфног чвора, али која клинички није очигледна

pN1c - метастаза у 1 до 3 лимфна чвора, а унутрашњи лимфни чворови дојке садрже микроскопску метастазу откривену дисекцијом стражарског лимфног чвора, која није клинички очигледна

pN2 - метастазе у 4-9 истостраних аксиларних лимфних чворова, или клинички очигледан лимфни чвор дуж мамарије интерне у одсуству аксиларних лимфонодалних метастаза

pN2a - метастаза у 4-9 аксиларних лимфних чворова, укључујући бар један који је већи од 2 mm

pN2b - метастаза у клинички очигледном унутрашњем лимфном чвору/чворовима дојке, у одсуству метастазе аксиларног лимфног чвора.

pN3 - метастазе описане као:

pN3a - метастаза у 10 или више аксиларних лимфних чворова (од којих је бар један већи од 2 mm) или метастаза у инфраклавикуларним лимфним чворовима

pN3b - метастаза у клинички очигледном унутрашњем лимфном чвору/чворовима дојке у присуству позитивног аксиларног лимфног чвора/чворова или метастаза у више од 3 аксиларна лимфна чвора и у унутрашњим лимфним чворовима дојке са микроскопском метастазом откривеном дисекцијом стражарског лимфног чвора, а која није клинички очигледна.

pN3c - метастаза у супраклавикуларном лимфном чвору (чворовима).

Клиничка и патохистолошка класификација удаљених метастаза (M)

M - удаљене метастазе:

Mx - постојање удаљених метастаза не може се одредити

M0 - нема удаљених метастаза

M1 - удаљене метастазе

Одсуство или присуство резидуалног тумора (R)

Rx - Присуство резидуалног тумора се не може проценити

R0 - Нема резидуалног тумора

R1 - Микроскопски резидуални тумор

R2 - Макроскопски резидуални тумор

Стадијуми рака дојке према TNM класификацији

Стадијум 0 Tis N0 M0

Стадијум IA T1 N0 M0

Стадијум IB T0, T1 N1mi M0

Стадијум IIA T0, T1 N1 M0, T2 N0 M0

Стадијум IIB T2 N1 M0, T3 N0 M0

Стадијум IIIA T0, T1, T2 N2 M0, T3 N0, N1, N2 M0

Стадијум IIIВ Т4 N0, N1, N2 M0
Стадијум IIIС било који Т N3 M0
Стадијум IV било који Т било који N M1

1.1.5. Молекуларна класификација карцинома дојке

Све врсте аналитичких молекуларних метода примењених на туморском ткиву помажу нам да одредимо прогностичке и предиктивне факторе. Савремене методе, као што је “*microarray*” (микрониз, микрочип) која се базира на развоју и употреби генских и експресијских профилисања довели су до развоја класификације система карцинома дојке заснованог на биологији тумора, а не на морфологији. Студије које се заснивају на овој методи подржавају идеју да је карцином дојке молекуларно хетерогена болест с различитим клиничким карактеристикама и да је то сложена болест која садржи различите обрасце експресије гена који утичу на прогнозу. Ове нове методе нам дају увид у нове аспекате карцинома дојке, али на другачији начин, омогућавајући нам да их повежемо са морфолошким изгледом карцинома дојке. *Perou* и *Sorlie* су први пут предложили терминологију „молекуларне класификације“ карцинома дојке опсежном студијом која је показала разлике у експресији гена 2000. године(23). *Perou* и *Sorlie* су помоћу профилисања генске експресије (енгл. “*Gene Expression Profiling*”, *GEP*) *DNA* микрочипова (“*microarray*”) анализирали 65 тумора дојке на 8102 гена. Они су развили молекуларну класификацију и идентификовали 5 различитих подтипова карцинома дојке: луминални А (*Lum A*), луминални Б (*Lum B*), *HER2* позитивни (*HER2+*), базални и нормални подтип, сваки са различитим клиничким исходима и одговорима на неoadјувантну хемотерапију. *GEP* није практичан и није економичан за рутинску дијагностику, па се, с обзиром на та ограничења, профилисање експресије гена може тешко спровести у широком обиму. Ипак, неколико група, укључујући Америчко друштво за клиничку онкологију (енгл. *American Society Of Clinical Oncology, ASCO*), националну свеобухватну мрежу против карцинома (енгл. *National Comprehensive Cancer Network, NCCN*) и *St. Gallen Group*, издале су препоруке и смернице које подржавају спровођење молекуларне анализе као корисне за стратификацију ризика и за планирање лечења(24).

Да би се олакшала имплементација класификације подтипа карцинома дојке, учињени су напори да се употребе имунохистохемијске анализе за стварање приближних подтипова. Молекуларни подтипови карцинома дојке одређени су на основу експресије рецептора за естрогене (*ER*), прогестерон (*PR*), рецептор за епидермални фактор раста 2 (*HER2*) и пролиферативни индекс *Ki67*. На основу истих, карциноми дојке су подељени у четири молекуларна подтипа: Луминални А (*ER+* и/или *PR+*, *HER2-*, *Ki67*≤15), Луминални Б (*ER+* и/или *PR+*, *HER2-* и *Ki67*>15 или *HER2+* и *Ki67*≤15), *HER2* позитиван (*ER-* и *PR-*, *HER2+*) и троструко негативни подтип [(енгл. *Triple Negative Breast Cancer, TNBC*)(*ER-*, *PR-*, *HER2-*)]. Различити молекуларни подтипови уједно одражавају и биолошку разноликост карцинома дојке. У времену у којем медицина иде ка персонализованом приступу, критични циљ је повезаност различитих подтипова болести са клиничким исходима и циљаним терапијама. Неколико студија је проценило преживљавање између различитих молекуларних подтипова(25-28). Ово указује на растући значај молекуларних подтипова у ризику од локално регионалног рецидива заједно са клиничким и патолошким карактеристикама.

1.1.5.1. Луминални подтипови *IBC*

Око 70% карцинома дојке је позитивно на хормонске рецепторе (*HR*-позитивно) и они показују повољнију прогнозу од *HR*-негативног карцинома дојке. У *HR*-позитивном / *HER2*-негативном карциному дојке, 90% - 95% тумора су луминални А и

Б подтипови(29, 30). У поређењу са луминалним А, луминални Б подтип има већу експресију гена пролиферације и лошији прогнозу, без обзира на помоћну системску терапију, мада луминални Б тумори показују већу стопу потпуног патолошког одговора (енгл. *Pathologic Complete Response, pCR*) након неoadјувантне хемотерапије(30). Дакле, разликовање луминалних тумора А и Б у комбинацији са величином и нодалним статусом омогућава нам да предвидимо отпорност на ендокрину терапију или да одредимо дужину ендокриног лечења. Такође, карциноми луминалног А подтипа су ниског степена малигнитета, са бољом прогнозом у односу на друге подтипове. Луминални Б подтип обично је вишег градуса и са учесталијим нодалним метастазама и има лошију прогнозу од луминалног А(31). Луминални Б тумори показују нижу експресију везано за *ER* гене, али вишу експресију у генима који се односе на пролиферацију и променљиву експресију гена повезаних са *HER2* у односу на луминалне А. Клинички ће луминални А подтип највероватније имати користи само од хормонске терапије, док луминални Б тумори могу бити кандидати за додатну хемотерапију(32-36).

1.1.5.2. *HER2* позитивни подтип *IBC*

HER2 позитивни подтип чини 15-20% свих инвазивних карцинома дојке(37). Карактерише се прекомерном експресија рецептора 2 људског фактора раста (енгл. *Human Epidermal Receptor 2, HER2*, такође познат као *erbB2*), обично путем *ERBB2* амплификације. *HER2* припада породици рецепторских тирозин-киназа са четири члана: *HER1* (такође познат као *EGFR*- енгл. *Epidermal Growth Factor Receptor*), *HER2*, *HER3* и *HER4*. Када се активирају, *HER* протеини хомодимеризују или хетеродимеризују и након тога активирају замршене ћелијске сигналне каскаде, укључујући *PI3K – AKT* и *RAS – MAPK (ERK)* путеве, који регулишу пролиферацију и преживљавање ћелија, као и метастазе туморских ћелија(38, 39). Сходно томе, *HER2* је главни онкогени покретач тумора дојке који прекомерно експримира овај протеин и тако нуди терапијску рањивост која се може ефикасно усмерити на пацијенте са *HER2* позитивним туморима(40, 41). Употреба биолошких анти-*HER2* средстава у комбинацији са хемотерапијом дала је изражен клинички успех и значајно побољшала исходе код пацијената са *HER2* позитивним карциномом дојке. Упркос овим побољшањима, појава отпорности на лечење остаје чест и изазован догађај, посебно у окружењу узнапредовале болести и представља озбиљан подсетник за изналажење ефикасније терапије. Ове туморе карактерише високи хистолошки градус и индекс пролиферације(42).

1.1.5.3. Троструко негативни карцином дојке (*TNBC*)

TNBC је подтип тумора дојке коме недостаје експресија хормонских рецептора и амплификација *HER2* гена. До 20% свих раних дијагноза карцинома дојке представљају овај тип(43, 44). Представљајући подгрупу биолошки агресивног карцинома дојке, *TNBC* се патолошки карактерише лошијом диференцијацијом, већим промером тумора, већим пролиферативним капацитетом и већом вероватноћом захватања лимфних чворова. *TNBC* се обично одликује лошом прогнозом и недостатком широког избора терапеутских агенаса због одсуства циљаних хормонских рецептора и експресије *HER2*(45).

TNBC је функционални појам који описује широк спектар ентитета различите биологије и клиничког понашања, са израженим генетским, транскрипционим, хистолошким и клиничким разликама(46). За разлику од других подтипова, за које су ендокрини и биолошки третмани показали да побољшавају исходе када се примењују пре или после операције, системски третмани раног *TNBC*-а су годинама ограничени на

традиционалну хемиотерапију(47). У том контексту, хемиотерапија се често примењује у неoadјувантном окружењу, како би се смањио тумор и потенцијално постигао бољи хируршки исход, као и да би се проценила прогноза пацијента(48). Пацијенти, након неoadјувантне хемиотерапије, који постигну патолошки потпуни одговор показали су значајно смањен ризик од релапса и смрти у поређењу са пацијентима са резидуалном болешћу(49). Насупрот томе, пацијенти са субоптималним одговором на неoadјувантну терапију могу имати користи од додатне пост-неoadјувантне хемиотерапије(50). Иако неoadјувантна терапија може да побољша стопе излечења за ране *TNBC* пацијенте, 30-40% пацијената и даље има рецидив суочавајући се са неизлечивим стањем са просечним преживљавањем мањим од 2 године(51).

1.1.6. Прогностички и предиктивни фактори карцинома дојке

Прогностички фактори нам служе за предвиђање биолошког понашања карцинома и клиничког тока болести и утичу на исход болести (без лечења), односно представља маркер значајан за релапс болести. Предиктивни фактори првенствено служе за процену учинковитости и планирање најефикаснијег начина лечења. У овом смислу предиктивни фактор је термин који се користи у контексту одговора тумора на одговарајући терапијски модалитет лечења. Ови фактори зависе од карактеристика тумора и карактеристика пацијента, а њихова идентификација може помоћи у одређивању најбољег индивидуалног терапијског начина лечења за сваког пацијента. Посебно је важна идентификација високоризичне групе пацијената. У рутинској клиничкој пракси, у употреби је неколико добро познатих прогностичких и предиктивних фактора(52): величина тумора, захваћеност лимфних чворова пазушне јаме, присуство удаљених метастаза, експресија естрогенских и прогестеронских рецептора (*ER/PR*), *HER2* статус, хистолошки градус тумора, пролиферативни индекс *Ki67* и присуство лимфоваскуларне инвазије.

1.1.6.1. Величина тумора

Величина тумора је рано препозната као веома важан прогностички фактор карцинома дојке. Величина тумора је повезана са присутношћу и бројем захваћених лимфних чворова, али представља и независан прогностички фактор. Студија *Arash S.* и сарадника је показала значајну корелацију између величине тумора и преживљавања пацијената након 5 година при чему је највећа стопа преживљавања забележена код пацијената са величином тумора мањом од *2cm* и најнижа стопа преживљавања повезана је са величинама преко *5cm*(53). Код болесница са негативним аксиларним лимфним чворовима, величина тумора је најснажнији прогностички фактор и рутински се користи за доношење одлука о адјувантној терапији. Пацијенти са негативним лимфним чворовима пазушне јаме и туморима величине до/или *1cm* представљају групу са најповољнијом прогнозом који не би имали користи од примене системске адјувантне терапије. За пацијенте са туморима величине *1-2cm* треба размотрити примену адјувантне терапије, јер код њих постоји ризик од преко 20% за појаву удаљених метастаза. Код мултифокалних тумора још се не зна са сигурношћу да ли прогноза корелира са промером највећег жаришта или зависи од укупне величине свих жаришта заједно. Поједини аутори сматрају да је промер највећег жаришта најпоузданија мера за стадирање, али је прогноза мултифокалних тумора ипак лошија од унифокалних тумора сличних димензија због чешћих аксиларних метастаза. Код пацијената са мултифокалним туморима, *T* стадијум се одређује помоћу две методе: пречника највећег туморског фокуса (*Tmax*) и сабирања највећих пречника свих туморских жаришта присутних у патолошком узорку (*Tsum*)(54). *AJCC TNM*

класификација дефинише величину тумора као меру највећег индивидуалног фокуса(55).

1.1.6.2. Статус пазушних лимфних чворова

Статус лимфних чворова према резултатима многих објављених студија је врло важан прогностички фактор. Пацијенти код којих су захваћени пазушни лимфни чворови имају 4-8 пута већу смртност од оних са негативним лимфним чворовима. Уочена је и снажна повезаност између броја захваћених пазушних лимфних чворова и ризика од развоја метастатске болести. Петогодишње преживљавање без болести је 80,1% са 1-3 захваћена лимфна чвора, 53,9% са 4-9 захваћених лимфних чворова, и 50,6% за пацијенте са ≥ 10 захваћених лимфних чворова, а укупно петогодишње преживљење је 84,3% са 1-3 захваћена лимфна чвора, 69,4% са 4-9 захваћених лимфних чворова и 62,3% за пацијенте са ≥ 10 захваћених лимфних чворова(56). Статус аксиларних лимфних чворова је јак прогностички фактор чак и у случају микроскопског захватања са 1,5 пута повећаном петогодишњом стопом рецидива код пацијената са *pN1mi* карциномом дојке, у поређењу са пацијентима са негативним карциномом(57).

Широко распрострањен принцип процене лимфонодалног статуса на основу прегледа сентинел лимфног нодуса (енгл. *Sentinel Lymph Node*) или лимфног чвора „стражара“ довео је до значајне редукције дисекција аксила, а самим тим и до редукције постоперативних компликација(58). *Sentinel lymph node* је процедура која се састоји од убризгавања плаве боје и/или радиоизотопа у ткиво дојке, у циљу идентификације првог лимфног чвора (стражара) који дренира лимфу у аксилу из перитуморског подручја и у којем ће се прво појавити метастазе уколико је дошло до пропагације болести. У случају негативног сентинел лимфног чвора, са великом вероватноћом се може тврдити да преостали лимфни нодуси не садрже метастатске депозите, те се избегава екстирпација истих(59). Величина метастатских депозита у лимфном чвору дефинише се као изоловане туморске ћелије (*ITC*, ако су $\leq 0,2mm$), микрометастазе (величина $>0,2mm$, а $\leq 2mm$) и макрометастазе (величина $>2mm$).

1.1.6.3. Присуство удаљених метастаза

Присуство удаљених метастаза је доказано најзначајнији прогностички фактор. Хематогене метастазе воде генерализованој дисеминацији карцинома дојке у костима, плућима, јетри, мозгу и другим местима(60). Од тога 30–60% има лезије у костима, 4–10% у мозгу, 15–32% у јетри и 21–32% у плућима(61).

Метастазе на плућима се посебно јављају у року од 5 година од почетне дијагнозе карцинома дојке и имају значајан утицај на морбидитет и морталитет пацијената. Физиолошки, ове метастазе ремете нормалну функцију плућа, што доводи до кашља, отежаног дисања, хемоптизије и евентуалне смрти. Метастазе у плућима и даље је тешко лечити, а процењује се да 60-70% пацијената који умру од карцинома дојке имају метастазе у плућима. За пацијенте са метастазама ограниченим само на плућа, прогноза је изузетно лоша са средњим преживљавањем од само 25 месеци(62). Овај лош исход се приписује ограниченом броју опција лечења повезаних са неоперабилним лезијама(63).

У ретроспективној процени метастатског карцинома дојке из 2019. године ризик од развоја метастаза на мозгу се процењује на чак 25% међу пацијентима са узнапредовалим карциномом дојке, са средњим временом настанка метастаза од 2 до 3 године након иницијалне дијагнозе карцинома дојке(64). Инциденција метастаза на мозгу се повећала у последњих неколико година након побољшане стопе

преживљавања пацијената са карциномом дојке (посебно оних са *HER2+* подтипом) и повећаног откривања метастатске болести путем напредних техника снимања(65).

За жене од 20 до 50 година, рак дојке је најчешћи рак са метастазама у јетри(66).

Метастазе карцинома дојке у костима су, слично другим типовима карцинома, најчешће остеолитичке, а у мањем проценту случајева могу да буду остеобластичног типа(67). Пацијенти са метастазама у костима имају повећан морбидитет због јаког бола, смањене покретљивости, хиперкалцемије, остеолитичке и прелома костију, као и компресије кичмене мождине и аплазије коштане сржи. Бол у костима је углавном последица или механичког притиска који врши туморска маса или ослобађања инфламаторних цитокина било од самих туморских ћелија, било од околног коштаног микроокружења, што доводи до промењене хомеостазе костију(68). Уколико је метастатска болест присутна само у костима, такве болеснице имају бољу прогнозу него оне са висцералним метастазама.

1.1.6.4. Експресија естрогенских и прогестеронских рецептора (*ER/PR*)

Присутност *ER* и *PR* је уједно и прогностички и предиктивни фактор карцинома дојке. Познато је да 50-80% пацијената оболелих од карцинома дојке садрже мерљиве концентрације *ER*. *PR* се, углавном, експримира заједно са и при вишим концентрацијама *ER*, а установљено је и да <5% пацијената оболелих од карцинома дојке има туморе са мерљивим концентрацијама *PR* у којима, истовремено, није експримиран и *ER*(69). Болеснице са *ER* позитивним карциномима имају боље укупно преживљавање од болесница са *ER* негативним карциномима(70). *ER* и *PR* се користе као предиктивни фактори за процену потенцијалне користи од адјувантне терапије тамоксифеном. Примена тамоксифена у трајању од пет година смањује ризик од повратка болести за 47% и морталитет за 26% у болесница са позитивним *ER*. Смањење смртности је слично за болеснице са позитивним и болеснице са негативним аксиларним лимфним чворовима, док нема учинка у болесница са негативним *ER*(71). *ER+* тумори чешћи су код старијих жена, чешће су добро диферентовани, диплоидни, ниже митотске активности и ређе показују експресију *p53* и *HER2/neu*(72-74). Сматра се да су *ER* негативни (*ER-*) тумори обично лошије прогнозе, слабије диференцијације, међутим, то није сасвим тачно. Група *ER-* тумора је хетерогена и садржи туморе различитих хистолошких типова. Прогестеронски рецептор је протеин чија је синтеза под контролом естрогенских рецептора па његова присутност упућује на функционалност *ER*. Процент *ER+/PR+*, *ER+/PR-*, *ER-/PR+* и *ER-/PR-* случајева износили су 67,2%, 12,2%, 1,6% и 19,0%, респективно(70). Овај мали проценат *ER-/PR+* се може објаснити или лажно негативним резултатом у одређивању *ER* или чињеницом да синтеза *PR* може бити индукована независно од *ER*.

1.1.6.5. *HER2* статус

Ген који кодира синтезу *HER2* или *HER2/neu*, *c-erbB-2* (енгл. *human epidermal growth factor receptor 2*) је мапиран на хромозому 17q21 и кодира трансмембрански гликопротеин од 185 *kDa*(75). Његова амплификација доводи до прекомерне експресије *HER2/neu* гликопротеина који је члан породице трансмембранских рецептора епидермалног фактора раста, са функцијом тирозин киназе (у малим количинама налази се у епителним и миоепителним ћелијама нормалног ткива дојке). Активација рецептора (везивањем лиганда) подстиче низ догађаја који уводе ћелију у *S*-фазу ћелијског циклуса. *HER2/neu* рецептор нема за сада познатог властитог лиганда ("*orphan*" рецептор), али се може активирати сам (спонтана хомодимеризација у случајевима прекомерне експресије) или га активирају други чланови породице *EGF* рецептора (хетеродимеризација)(76, 77). Висока сигнална потентност хетеродимера у

које спада и *HER2* рецептор заснива се на неколико кључних особина овог рецептора. Једна од њих јесте висок капацитет *HER2* рецептора да редукује стопу дисоцијације са високо афинитетним лигандима, способност да индукује активацију других чланова *HER* рецепторске фамилије активирајући сигналне путеве у које су они укључени, као и способност активације *MAP* и *Jun N* – терминалног сигналног пута који су укључени у процес активације митозе у ћелији(78). Такође је примећено да димери који садрже *HER2* рецептор у свом саставу не подлежу разградњи у ћелији од стране лизозома него се одвајају и враћају на површину ћелије што резултује у прекомерној експресији овог рецептора на ћелијској мембрани. Онкогени потенцијал *HER2* рецептора може бити активиран путем неколико генетских механизма који укључују тачкасте мутације и амплификације немутираних протоонкогена. Од наведених промена, најзначајније и најучесталије су генетске амплификације које су присутне код карцинома дојке и које доводе до прекомерне експресије протеина *HER2*. Услед амплификације *HER2* гена долази до повећаног интензитета формирања димера са другим члановима *HER* рецепторске фамилије као и њихове активације на површини карциномских ћелија.

HER2 позитивност је негативан прогностички фактор и повезана је са агресивним током болести, краћим временским интервалом до релапса и лошијим преживљавањем(79). Повећана експресија *HER2* удружена је и са другим факторима лоше прогнозе карцинома дојке, као што су позитивни лимфни чворови, виши градус тумора, негативан статус рецептора за естрогене и прогестерон(80-82).

Повољна страна прекомерне експресије *HER2/neu* је могућност терапије *Herceptin*®-ом (трастузумаб) тј. моноклоналним антителима на *HER2/neu* протеин и то на његов екстрацитоплазматски домен, за који је доказано да инхибира раст туморских ћелија *in vitro* и *in vivo*. За сада је терапија *Herceptin*®-ом индикувана код болесница са метастатском болести и прекомерном експресијом *HER2/neu*, а у току су рандомизирани мултицентричне студије које ће показати учинковитост овог лека у комбинацији са различитим цитостатицима. Процена *HER2/neu* статуса најчешће се ради имунохистохемијски (*HercepTest*) или *FISH*-ом (енгл. *Fluorescence In Situ Hybridization*), а подударност ових метода је 80-95%. Имунохистохемијска метода је једноставнија, бржа и јефтинија па се чешће изводи. Применом метода флуоресцентне *in situ* хибридизације утврђено је да је амплификација *HER2* гена присутна код 33% инвазивних карцинома дојке(83).

1.1.6.6. Пролиферативни индекс *Ki67* (*MKI67*)

Антиген *Ki67*, такође познат као *Ki67* или маркер пролиферације *Ki67* (*MKI67*), је протеин код људи кодиран геном *MKI67*(84). *Ki67* кодира две изоформе протеина са молекулском тежином од 345 и 395 килодалтона и првобитно је идентификован у једру ћелија Хочкиновог лимфома 1983. од стране *Scholzen*-а и *Gerdes*-а (85). Овај нехистонски протеин је добио име по локацији Института у којем је откривен и описан (*Ki* – *Kiel University, Germany*) и броју 67 који се односи на локацију коморице 96-о коморне плоче(86).

Количина *Ki67* присутна у било ком тренутку током ћелијског циклуса је регулисана прецизном равнотежом између синтезе и разградње, као што је назначено кроз његов кратки полуживот од 60–90 минута(87). *Ki67* остаје активан током *G1*, *S*, *G2* и *M* фаза ћелијског циклуса(88), што га чини одличним маркером ћелијске пролиферације (89) и прихваћеним обележјем онкогенезе(90).

Имунохистохемијска евалуација *Ki67* је сада укључена у парадигму за неколико типова тумора због његове поуздане корелације са пролиферативном активношћу туморских ћелија(88). Поуздано предвиђање коришћењем *Ki67* као биомаркера потврђено је код бројних карцинома, укључујући карцином дојке, простате, грлића

материце, плућа, неуроендокриних карцинома и гастроинтестиналних стромалних тумора(91-96). Упркос томе, потешкоће око евалуације, употребе и кредибилитета *Ki67* отежале су његово униформно прихватање у рутинској пракси.

Многе студије бавиле су се испитивањем потенцијалног значаја *Ki67* као прогностичког маркера у карциному дојке. Група истраживача је испитивала експресију *ER*, *PR*, *HER2* и *Ki67* протеина на основу којих је подељена група луминалних карцинома дојке на луминални А и Б тип карцинома. Луминални тип карцинома дојке кога је карактерисао висок индекс пролиферације односио се на луминални Б тип и указивао је на лошију прогнозу исхода болести и краће преживљавање у односу на луминални А тип карцинома дојке(97). Метаанализа коју су урадили *Azambuja* и његова група сарадника односио се на испитивање везе између експресије *Ki67* и дужине преживљавања код пацијенткиња обухваћених у 29 студија(98). Резултати засновани на подацима ове метаанализе указују на чињеницу да висок индекс пролиферације указује на лошији исход саме болести и краће преживљавање код пацијенткиња са карциномом дојке(98). Знатно лошију прогнозу исхода болести имале су пацијенткиње са високим индексом пролиферације и негативним статусом регионалних лимфних нодуса у односу на пацијенткиње са присутном туморском инфилтрацијом лимфних нодуса(98). Друга метаанализа спроведена је на укупно 15.790 пацијенткиња(99). Најмање 100 студија бавило се испитивањем односа између индекса пролиферације туморских ћелија и стопе преживљавања код пацијенткиња са карциномом дојке. Ове студије су такође потврдиле да већи индекс пролиферације указује на лошији исход болести и краћи период преживљавања. Међутим, без обзира на целокупност информације која се добија одређивањем индекса пролиферације, *Ki67* протеин ипак нема статус независног прогностичког маркера код пацијенткиња са карциномом дојке(99, 100). Подаци који се односе на значај одређивања експресије *Ki67* протеина као предиктивног маркера у карциному дојке су јако ретки. Основни недостатак студија које су се бавиле одређивањем предиктивног значаја *Ki67* протеина у карциному дојке односи се на различите лабораторијске методе и статистичке моделе који су у њима примењени.

Постоје многе недоумице везане за одређивање *Ki67* пролиферативног индекса у карциному дојке. Прве су везане за аналитичку методологију и подразумевају различите приступе при бројању *Ki67* позитивних ћелија: „*hot spot*“ у односу на читав тумор, различит број ћелија на основу којег се прорачунава средња вредност, као и мануално у односу на аутоматизовано бројање. „*Hot spot*“ представља подручје тумора у којем се налази највећи број туморских ћелија у процесу деобе, тј. највише обојених једара(101). Други проблем, нарочито са становишта онколога, односи се на процену граничне вредности *Ki67* индекса, којом се карциноми дојке могу сврстати у групу са ниским и групу са високим *Ki67* пролиферативним индексом. Поједине студије користе 10% или 20% као „*cut-off*“ вредности, док остале користе дихотомну скалу око средње вредности („*cut-off*“ је 14% или 15%)(102-104). Најраспрострањенији начин процене *Ki67* маркера је имунохистохемијска анализа. Имунохистохемијским бојењем са моноклонским антителима *Ki67* (*MIB-1*) могуће је проценити степен пролиферативности популације неопластичних ћелија и то одређивањем процента имунореактивних ћелија на 200 туморских ћелија.

1.1.6.7. Хистолошки градус тумора

Услед несавршености статуса лимфних чворова и величине тумора као фактора прогнозе/предикције тока болести, у клиничку праксу је уведен нови параметар - хистолошки градус тумора, како би се адекватније проценила прогноза болести и оптимизовало лечење пацијената. Степен хистолошке диферентованости, односно

степен морфолошке сличности тумора са нормалним ткивом, тј. хистолошки градус, има за циљ да укаже на мању или већу агресивност тумора и самим тим представља један од стандардних прогностичких параметара, нарочито за инвазивне карциноме(105). Иако се овај параметар још почетком двадесетог века препознао као значајан, данас се најчешће користи *Nottingham* систем градирања(106), који представља *Elston-Ellis* модификацију *Scarff-Bloom-Richardson* система градирања(107). *Nottingham* систем градирања се односи на семиквантитативну процену три морфолошке карактеристике тумора, и то: формирање тубула, једарни плеоморфизам и митотску активност. Свака од наведене три туморске карактеристике се бодује са 1, 2 или 3 и крајњи збир чини *Nottingham* скор који указује на степен диферентованости карцинома дојке(108).

Формирање тубула:

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

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

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

Једарни плеоморфизам:

Мале, правилне униформне ћелије – бод 1

Ћелије умерено увећане и плеоморфне – бод 2

Изражен плеоморфизам – бод 3

Митотска активност:

0-9 митоза / 10 HPF – бод 1

10-19 митоза / 10 HPF – бод 2

>20 митоза / 10 HPF – бод 3

Nottingham score

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

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

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

Добро диферентовани тумори (*G1*) имају петогодишње преживљавање у око 75% случајева, а десет година преживи око 47% пацијенткиња. Са умерено диферентованим туморима (*G2*) пет година преживи око 53% пацијенткиња, а десет година преживи око 27%. У групи пацијенткиња са слабо диферентованима туморима (*G3*) пет година преживи 31%, а десет година преживи 18%(109).

1.2. СЕНЕСЦЕНЦИЈА

У случају појаве унутрашњих или спољашњих стресогених фактора, сви организми активирају различите сложене биохемијске путеве како би обезбедили своју хомеостазу(110). У физиолошким условима ови механизми успевају да уравнотеже штетне силе које угрожавају правилно функционисање ћелије, док је у патолошким условима ова равнотежа нарушена, што доводи до накупљања ћелијских оштећења(110). Као резултат тога, успоставља се неправилно функционисање ћелије, промовишући старење и болести. Ћелијска сенесценција је такав механизам реакције на стрес који, слично као и апоптоза, има за циљ очување ћелијске / ткивне хомеостазе. Ћелијска сенесценција је стабилно заустављање ћелијског циклуса које се може покренути у нормалним ћелијама као одговор на различите унутрашње и спољашње стимулусе. Ћелијска сенесценција се разликује од другог облика заустављања раста познатог као мировање, по томе што се сенесценција јавља у *G1* и вероватно *G2* фази ћелијског циклуса за разлику од мировања које се дешава у *G0*. Још једна кључна

разлика је у томе што ћелије у мировању могу да наставе са пролиферацијом као одговор на одговарајуће сигнале као што су стимулација факторима раста или митогени сигнали, док сенесцентне ћелије не могу(111-113). Апоптоза је програмирана ћелијска смрт у којој се остаци мртве апоптотске ћелије уклањају фагоцитозом од стране друге ћелије, док се у сенесценцији сенесцентна ћелија не елиминише одмах и остаје метаболички активна упркос томе што је у заустављеном стању. Сенесценција се такође разликује од терминално диференцираних ћелија које су се такође неповратно повукле из ћелијског циклуса где се недиференциране прекурсорске ћелије претварају у специјализоване ефекторске ћелије(113, 114). Терминално диферентоване ћелије такође могу бити подвргнуте ћелијској сенесценцији што показује да сенесценција не зависи од активног ћелијског циклуса(115).

Иако се верује да је заустављање ћелијског циклуса у ћелијској сенесценцији неповратно, студије су недавно показале да сенесцентне ћелије могу под одређеним околностима поново ући у ћелијски циклус као што су нпр. ћелије тумора(116, 117). Ћелијску сенесценцију су први описали *Hayflick* и *Murhed* у нормалним хуманим ембрионалним фибробластима плућа, давне 1961. године, као трајни престанак ћелијских подела *in vitro*(118). Ова врста ћелијске сенесценције која је постигнута након серијског субкултивисања *in vitro* назива се репликативна сенесценција и приписује се постепеном губитку дужине теломера након сваке деобе ћелије због „проблема крајње репликације“, тј. непотпуне репликације краја хромозома током заостајања синтезе *DNA* ланца(119, 120).

Сенесцентне ћелије су у стабилном застоју и пролазе кроз карактеристичне промене укључујући транскрипционе, епигенетске, морфолошке и метаболичке промене(112). Сенесцентне ћелије разликују се од ћелија које се не деле (као што су ћелије у мирној фази или терминално диферентоване ћелије) у неколико маркера и морфолошких промена. Ћелијска сенесценција у *in vitro* култури често је удружена са морфолошким променама; уопштено ћелије постају веће, равне, вакуолизиране и повремено мултинуклеарне. Међутим, у *in vivo* условима сенесцентне ћелије задржавају нормалну морфологију узроковану ткивном архитектоницом. Велики број различитих маркера и њихово комбиновање може бити од користи за дефинисање сенесценције ћелија како у култури тако и у ткиву(121, 122). Највише коришћена метода за откривање старења је хистохемијска детекција активности бета-галактозидазе, при *pH* 6, која је позната и као са старењем удружена β -галактозидаза (енгл. *Senescence Associated Beta Galactosidase, SA- β -GAL*)(123). Активност овог ензима заснована је на повећаном лизозомалном садржају у остарелим ћелијама које омогућавају детекцију лизозомалне β галактозидазе, при оптималном *pH* 6 и то вероватно одражава повећану аутофагију која се појављује у сенесцентним ћелијама заједно са проширењем лизозомалног одељка у њима(124). Мана ове методе је у потреби коришћења свежих или смрзнутих резова. Такође, скорије је откривено да сенесцентне ћелије показују позитивност на бојење *Sudan black B* којим се детектује комплекс лизозомалног агрегата познат као липофусцин и има предност у коришћењу на ткивима која су фиксирана формалином и укалупљена у парафинске блокове(125, 126).

Како је ћелијска сенесценција заснована на стабилном застоју ћелијског циклуса, одсуство пролиферативних маркера, као што је *Ki67* протеин, је важан услов да би се потврдила сенесценција. Остали маркери укључују *p16*, *ARF*, *p53*, *p21*, *p15*, *p27* и хипофосфорилисани *pRb*. Фокуси хетерохроматина такође су повезани са сенесценцијом ћелија и познати су као са сенесценцијом повезани хетерохроматични фокуси (енгл. *Senescence-Associated Heterochromatin Foci, SAHF*)(127). Треба нагласити да се *SAHF* чешиће стварају током сенесценције индуковане онкогенима (енгл.

Oncogene-Induced Senescence, OIS), а не током репликативног циклуса или током година(128). Такође, сенесцентне ћелије секретују бројне екстраћелијске факторе, укључујући трансформишући фактор раста бета (енгл. *Transforming Growth Factor beta, TGF-β*), инсулину сличан фактор раста 1 (енгл. *Insulin-like growth factor 1, IGF1*), инхибитор активатора плазминогена 1 (енгл. *Plasminogen Activator Inhibitor 1, PAI1*), као и запаљенске цитокине и хемокине који могу да преусмере и подрже сенесценцију кроз аутокрини или паракрини пут(129-131). Најважније је да се нагласи да већина горе споменутих маркера сенесценције су присутни у *in vivo* условима, заједно у вези са премалигним туморима и са развојним физиолошким и патолошким процесима(132). Разлике између сенесцентних и недељивих ћелија подразумевају карактеристике као што су одсуство пролиферативних маркера *SA-β-GAL*, експресија тумор-супресорских гена и инхибитора ћелијског циклуса и често маркера оштећења *DNA*, као и једарни фокуси хетерохроматина и изражена секреција сигналних молекула. Треба нагласити да ни један од набројаних маркера није комплетно специфичан или универзалан за сенесценцију, постоји само слагање да сенесцентне ћелије експримирају већину од њих. Истраживања на овом пољу у последњих пар деценија су показала да сенесценција има користан, али и штетан ефекат. Уопштено, пролазно укључивање сенесценције праћено ткивним ремоделовањем је корисно зато што је повезано са елиминацијом оштећених ћелија. Супротно, перзистентна сенесценција или неспособност елиминисања остарелих ћелија је штетна. У студији *Munjoza* и *Serana* биолошка вредност сенесценције је елиминација нежељених ћелија која је суштински слична апоптози(133). Сенесценција и апоптоза су најзначајнији за елиминацију оштећених ћелија. То је нарочито изражено у карциному и старењу, при чему се оба процеса карактеришу нагомилавањем озбиљних ћелијских оштећења. У прилог овоме постоји доказ да је сенесценција важна баријера против прогресије карцинома. Накупљање сенесцентних ћелија током старења присутне су у већини, али не и у свим ткивима, а највише су присутне у кожи, јетри, плућима и слезини(134-136).

Примарни окидачи за сенесценцију повезану са старењем највероватније прате *DNA* оштећење, губитак протективне улоге теломера и дерепресија *CDKN2A* локуса који кодира *p16* и *ARF*(137-139). Предпоставља се да је централна улога сенесценције да иницира процес елиминације оштећених ћелија и доведе до ткивне регенерације (предпоставља се да ова секвенца подразумева синесценцију-поправку-регенерацију). Међутим, овај користан ефекат може бити ометен нарочито у остарелим ткивима комбинацијом фактора као што је, са једне стране, елиминација остарелих ћелија од стране имунског система, која може бити оштећена, што води накупљању сенесцентних ћелија, што даље може узроковати ткивну дисфункцију кроз развој секреторног фенотипа удруженог са сенесценцијом (енгл. *Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP*)(140-143). Са друге стране сенесценција не погађа само диферентоване ћелије већ и *STEM* и прогениторне ћелије ограничавајући на тај начин регенераторну способност ткива. Комбинација неефикасног чишћења претеране активности *SASP*-а, као и неефикасне регенерације може појаснити накупљање продукта сенесценције током година и његово активно учешће у обликовању сенесцентног фенотипа. Важно је да елиминација сенесцентних ћелија код мишева са високим нивоима оштећења може помоћи у подмлађивању оштећених ткива као што су мишићно и масно и истовремено га заштитити од даљег оштећења(144). Због тога елиминација сенесцентних ћелија је важна стратегија за умањење ефекта хроничне системске инфламације и за подмлађивање. Сенесценција је одговорна примарно за елиминацију оштећених ћелија, међутим, како године пролазе, комплетна секвенца сенесценција – чишћење – регенерација, не може бити у потпуности реализована и сама сенесценција може постати део проблема пре него решење.

1.2.1. Механизам сенесценције

Велики број стимулуса који узрокују сенесценцију су константно повећани и механизми којима се покреће су доста проучавани(145, 146). Ови стимулуси делују преко различитих сигналних путева, а многи од њих активирају *p53*, а у основи њихове активности налази се улога инхибитора циклин зависне киназе *p16*, позната и као *INK4A* (енкодиран са *CDKN2A*), *p15*, познат као *INK4B* (енкодиран са *CDKN2A*), *p21* познат као *WAF1* (енкодиран са *CDKN1A*) и *p27* (енкодиран са *CDKN1B*). Инхибиција комплекса циклина и циклин зависне киназе (енгл. *Cyclin Dependent Kinase, CDK*) резултује застојем пролиферације при чему је круцијална компонента одговорна за учешће сенесценције у овом процесу хипофосфорилисана форма *pRb* (енгл. *Retinoblastoma Protein*)(147). Такође, велики број окидача сенесценције и сигнални путеви исте, недвосмислено је да уједно активирају сенесценцију, али и да одређују ћелијски тип и стање у којем се ћелија налази. Слично као код апоптозе, код које постоји неколико субтипова апоптотичних ћелија, будућа истраживања могу дефинисати различите типове ћелијске сенесценције. Главни механизми укључени у индукцију сенесценције су они који су узроковани оштећењем који укључују различите субтипове, као што су репликативна сенесценција, сенесценција узрокована оштећењем *DNA* (енгл. *DNA Damage Response, DDR*), узрокована стресом или онкогенима.

1.2.2. Репликативна сенесценција

Репликативна сенесценција је у блиској вези са теломерама и њиховом улогом током репликативног циклуса. Прогресивни губитак теломера током ћелијског циклуса доводи до критичног смањења њихове дужине, која онда узрокује појаву сенесценције, познату као репликативна сенесценција. Теломера понављајућа *DNA* секвенца (*TTAGGG* код кичмењака) (148) и специјализовани протеини који покривају крајеве линеарних хромозома су неопходни за хромозомски интегритет. Због биохемије репликације *DNA*, 50-200 *bp*, теломера *DNA* се не реплицира током сваке *S* фазе. Пошто теломераза, ензим који може синтетизовати теломерну *DNA de novo*, не експримира већина људских ћелија, теломере се скраћују са сваком ћелијским циклусом. Када се теломере скрате са максималне величине од 10-15 *kb* (у герминативним ћелијским линијама) до просечне величине 4-6 *kb*, ћелије неповратно заустављају раст, стварајући карактеристични (сенесцентни) фенотип(149-151). Значајно је истаћи да се заустављање ћелијског раста дешава пре него што теломере постану довољно кратке да угрозе хромозомски интегритет. Треба поменути две тачке у вези са репликативном сенесценцијом. Прво, врло је вероватно да ћелије реагују на поремећај структуре теломера, уместо да реагују на скраћивање теломера(152). Друго, теломераза се експримира у герминативним ћелијским линијама, раном ембриону и неколико ћелија одраслих, а у већини туморских ћелија. Експресија теломеразе је најчешћи механизам помоћу којег ћелије рака стабилизују своје теломере и тиме избегавају репликативну сенесценцију(151, 153, 154). Доказано је да скраћивање теломера служи као "митотски сат" који води нормалне ћелије до сенесценције, јер ћелије заметка и туморске ћелије, које изражавају теломеразу, показују бесконачан репликативни потенцијал, док увођење каталитичке подјединице ензима у ћелије са недостатком теломеразе може продужити њихов век, чак их чинећи бесмртним(155, 156). Губитак теломерне дужине преко одређеног прага ћелије доживљавају као оштећење *DNA*, које покреће путеве одговора на оштећење *DNA*, као што је активирање *ATM-CHK2-p53-p21-pRb* осовине, што доводи до неповратног заустављања ћелијског раста(157-160). Репликативна сенесценција, значи, служи као природна баријера туморогенези(161, 162). Главни чиниоци одговора на *DNA* оштећење су киназе везане за оштећење *DNA*, као што су

ATM, *ATR*, *CHK1* и *CHK2*, које се активирају процесом фосфорилације и активацијом неколико цикличних протеина, укључујући и *p53*. Поред тога фосфорилисани *p53* активира експресију *p21* који се везује и инхибира неке од комплекса *CDK*-циклин, нарочито онај везан за *CDK2*.

Репликативна сенесценција је повезана такође са *CDKN2A* локусом (познати и као *INK4A/ARF*), који кодира два важна тумор супресорска протеина *p16* и *ARF*. Док *p16* инхибира *CDK4* и *CDK6*, *ARF* регулише стабилност помоћу инактивације деградације *p53* путем *E3* убиквитин протеин лигазе *MDM2(163-166)*. *DNA* оштећење може да умањи ниво *ARF* протеина индукујући његову деградацију(167, 168).

1.2.3. Оксидативни стрес и сенесценција

Ниво реактивних кисеоничних радикала се повећава у многим облицима оксидативног стреса посредством најчешће деловања хемиотерапеутика, губитком заштитне улоге теломераза, *DNA* оштећењем и активацијом онкогена(169). Доказ да оксидативни стрес узрокује сенесценцију је показано у неколико студија(170-174). Наиме, показао је да оксидативни стрес убрзава скраћивање теломера, а ерозија теломерне *DNA* на крају компромитује функционални интегритет целе структуре теломера, изазивајући одговор на оштећење *DNA*, што заузврат може довести до почетка ћелијске сенесценције(175). Механички, високи интрацелуларни нивои реактивних кисеоничних радикала индуковани су *RAS-RAF-MEK-ERK* каскадом, активацијом *p38/MAPK*, што доводи до повећане транскрипционе активности *p53*, а то изазива усходну регулацију *p21* и појаву сенесценције(176).

1.2.4. Онкогенима индукована сенесценција (*OIS*)

Међу мноштвом стимулуса који изазивају сенесценцију, унутрашње промене активираних онкогена изазивају не само неповратно стање пролиферативног застоја, већ и биолошки значајан одговор који обуздава малигну трансформацију. Овакав облик сенесценције се назива онкогенима индукована сенесценција (*OIS*), такође се сматра примарном сенесценцијом. *OIS* представља одбрамбени механизам који ограничава малигну трансформацију ћелија које поседују онкогени потенцијал и служи као почетна препрека за развој карцинома(177). Нормалне ћелије реагују на активацију великог броја онкогена у започетом процесу сенесценције. *OIS* је први пут описана са експресијом онкогене форме *RAS* протеина у људским фибробластима(178). Мутације у онкогену *RAS* могу се наћи у различитим хуманим карциномима и у до 30% свих тумора(179). Међутим, *RAS* захтева сарадњу других онкогена или инактивацију тумор-супресор гена да би изазвао трансформацију. Тако да прекомерна експресија овог онкогена у ћелијама без додатних мутација резултира сенесценцијом индукованом онкогенима, а мутација *RAS* представља баријеру против туморогенезе у неколико мишијих модела *in vivo*(180, 181).

Постоји више од 50 различитих онкогена који могу да узрокују сенесценцију. Важно је да се каже да је доказано да *OIS* која се појављује у *in vivo* условима функционише као нека врста прекида током ране фазе туморогенезе(132, 146). *OIS* може бити изазван са два врло важна сигнална пута, а то су *p16-pRb* и *p14-p53-p21*(158). *p16* и *p14* су кодирани истим *INK4A/ARF* генским локусом. *p16* и *p14* су међусобно зависни, а оба су често измењена у примарном карциному дојке(182-184). *p21* је производ *WAF1/CIP1/SDI1* на хромозому *6p21*. *p21* може да се активира преко *p53* зависног или *p53* независног сигналног пута(185). Активација *p53* води транскрипционој активацији *p21* и блокира цикллин *A*, резултујући заустављањем циклуса у *G1* фази. Такође, неке студије су показала да је експресија *p16*, *p14* и *p21* прекинута у многим туморима, укључујући и карцином дојке(186). Међутим, једна

студија је показала да су маркери удружени са сенесценцијом повећано експримирани у премалигним лезијама, али су изгубљени у малигним(187). Даља истраживања су показала да је код мишева *ARF-p53* сигнални пут главни активатор *OIS-a*(188), док код људи изгледа да је *DDR-p53* сигнални пут много важнији него код мишева(189). Коначно *p16* има скромну улогу у изазивању сенесценције код мишева, али значајну улогу у људским ћелијама(190). Хронична активација *p53*, *p21*, *pRb* и *p16* генерално је довољна да изазове трајни застој раста узрокован сенесценцијом(191, 192). *p53/p21* и *p16/pRb* сигнални путеви регулишу неколико важних карактеристика сенесцентних ћелија. Геномско оштећење, укључујући дисфункцију теломера, активира *DDR* који активира *p53/p21* сигнални пут. Ова активација је двофазна. Прва реакција је брза, углавном у року од неколико минута до једног сата, снажна је и пролазна, јењава у просеку за 24 до 48 часова, што је типично за *p53* одговор на многа оштећења *DNA*(193). Међутим, ако је оштећење велико и не може да се поправи (довољно да изазове сенесценцију), низак ниво активiranог *p53* и експресија *p21* перзистира, кад брза фаза прогресивно опада(194-196). Трајна *DDR* сигнализација изгледа да иницира прекид застоја раста изазван сенесценцијом, за разлику од пролазног оштећења који индукује застој раста. Таква сигнализација је такође праћена спором активацијом (која се јавља током дана) других сигналних путева, као што су *p38/MAPK* и протеин киназа *C* путева, регулисани одговором на стрес, као и повећаном концентрацијом реактивних кисеоничких радикала, који такође учествују у сигналним путевима(197-199). Ови додатни сигнални путеви потом иницирају експресију *p16*, који делује преко *pRb*, обезбеђујући суштински иреверзибилни застој раста(157).

Стабилно стање заустављања пролиферације је кључни аспект *OIS-a*. За разлику од мировања, сенесцентно заустављање раста је у суштини трајно јер се сенесцентне ћелије не могу стимулисати да се размножавају у већини случајева. У многим ткивима, мале и неупадљиве неопластичне лезије, где су идентификоване онкогене мутације и маркери *OIS-a*, ретко постају очигледни канцери(200), што указује на то да сенесценција изазвана аберантном онкогеном активацијом тежи да спречи неконтролисану пролиферацију кроз иреверзибилно заустављање раста. Сенесценција утиче на развој тумора различитим активностима, које стварају просторно-временски динамичке и контекстуално зависне реакције ткива. Фактори као што су *TGF- β* (*engl. transforming growth factor- β*) и *CCL2* [*engl. monocyte chemoattractant protein-1, also called chemokine (C-C motif) ligand 2, CCL2*] могу пропагирати фенотип сенесценције у суседним несенесцентним ћелијама, преносећи онкогени стрес на микроокружење(201). Све више се препознаје да имуне ћелије које регрутују сенесцентне ћелије играју кључну улогу у регулисању развоја тумора. Прекомерна експресија онкогеног *RAS* код мишева није успела да подстакне развој хепатоцелуларног карцинома због имунолошког надзора изазваног сенесценцијом, у којем су *CD4+ T* ћелије и макрофаги играли виталну улогу у превладавајућим сенесцентним хепатоцитима(202). *NK* ћелије могу бити регрутоване помоћу *CCL2* који луче сенесцентне ћелије да помогну у чишћењу туморских ћелија, док би *M1* макрофаги могли бити регрутовани помоћу *CXCL1* да би сузбили развој тумора(203, 204). Међутим, недостатак сенесценције је обично недовољан за малигну трансформацију. Чини се да сенесценција представља огромну, али не и непремостиву баријеру за напредовање тумора. Показало се да је активност дивљег типа *p53* била штетна за одговор на хемотерапију код пацијената са карциномом дојке, чак и ако је *p53* индуковао сенесценцију у туморима, где су излучени цитокини сенесцентних ћелија били у стању да стимулишу пролиферацију ћелија и релапс тумора(205). Пријављено је да је врло вероватно да ће се тумор развити чак и када се појави *OIS*. Конкретно, код остарелих организама, систем замене ћелија који укључује уклањање сенесцентних ћелија и мобилизацију прогенитора за поновно

успостављање броја ћелија може постати неефикасан или може да исцрпи регенеративни капацитет ћелија потомака, што на крају резултира акумулацијом сенесцентних ћелија које може погоршати оштећење и допринети развоју тумора(206). С обзиром на велике варијанте *SASP*-а и различите профиле *SASP*-а у различитим типовима ћелија, *SASP* може изазвати или туморску супресију или туморску прогресију. Показало се да *SASP* фактори промовишу туморигенезу индукујући пролиферацију, преживљавање, ангиогенезу и метастазе(207). На пример, примарни кератиноцити миша који су пролазно изложени *SASP*-у показали су повећану експресију маркера за матичне ћелије и регенеративни капацитет *in vivo*(208). Матриксне металопротеиназе (*MMP*) које луче сенесцентне ћелије посредовале би у миграцији и побољшале њихова туморогена својства(209). Утврђено је да фактори као што су *IL-6* и *IL-8*, које регулише *mTOR* (енгл. *Mammalian Target Of Rapamycin*) у сенесцентним фибробластима, промовишу туморе простате код мишева(210). *SASP* такође може промовисати туморигенезу својим утицајем на имуни систем. На пример, *CCL2* би могао да регрутује *M2* макрофаге, који стварају имуносупресивно микроокружење и делује као промотер у прогресији тумора(211). Такође је пријављено да *CCL2* који луче сенесцентни хепатоцити регрутује незреле мијелоидне ћелије да промовише развој хепатоцелуларног карцинома кроз инхибицију *NK* ћелија. Доследно је пријављено да је *SASP* повезан са лошим преживљавањем и раним рецидивом хепатоцелуларног карцинома(212).

OIS је сложен процес који може играти супротне улоге у иницијацији и развоју тумора у зависности од временског, просторног и генетског контекста. Циљање на сенесцентне ћелије може бити корисно за терапију рака у одређеним околностима. Иако је разумевање сенесценције знатно напредовало последњих година, различити одговори сенесценције отежавају успостављање јединствених дијагностичких критеријума за ћелијску сенесценцију. Тренутно се за откривање ових ћелија користи комбинација неколико карактеристика ћелијске сенесценције. Даље студије су оправдане како би се открили основни механизми који су у основи *OIS*-а. С обзиром на сложеност *OIS*-а, различитост у патолошкој функцији сенесцентних ћелија, као и динамичку интеракцију између сенесцентних ћелија и микроокружења, треба даље истражити када се циља на сенесценцију као терапијску опцију за карциноме. Поред тога, сенесцентни фенотип ћелија карцинома може понудити потенцијалне биомаркере за дијагнозу и прогнозу тумора. Узети заједно, морају се уложити велики напори да се разјасне детаљнији механизми који леже у основи *OIS*-а, интеракције између сенесцентних ћелија и микроокружења и улоге *OIS*-а у развоју и терапији карцинома.

1.2.4.1. Тумор супресорски протеин *p53*

Ген *TP53*, који се налази на хромозому *17p13.1*, је ген супресор тумора који је дугачак 20 килобаза (*kb*) и садржи 11 егзона. *TP53* ген који кодира тумор супресорски протеин *p53* функционише да сузбије настанак карцинома. Да би посредовао у супресији тумора, *p53* се везује за специфичне елементе *DNA* одговора и индукује експресију гена укључених у један или више од следећих процеса: заустављање ћелијског циклуса, поправку *DNA*, апоптозу, сенесценцију, аутофагију, фероптозу или метаболизам(213-215). Првобитно назван „чувар генома“, *p53* се сада може сматрати једним од најважнијих гена који штите људску врсту од рака. Нажалост, *TP53* је инактивиран у већини, ако не и код свих, карцинома код људи. Два главна механизма су одговорна за инактивацију; мутација *TP53* гена и негативна регулација протеинског производа дивљег типа, након интеракције са регулаторним протеинима као што су *MDM2* или *MDM4* (такође познат као *MDMX*)(213, 214, 216). Због скоро универзалне

дисфункције код малигнитета, *p53* је теоретски веома атрактивна мета против које се развијају нови третмани против карцинома.

p53 тумор супресорски протеин игра једну од централних улога у започињању ћелијске сенесценције и у спречавању туморогенезе преко своје функције у регулацији ћелијског циклуса и одржавању *DNA* интегритета. Различити типови ћелијског оштећења брзо индукују висок ниво *p53* у ћелијама, што доводи до застоја циклуса, како би се омогућила поправка. У случају да се поправка не може извршити активирају се алтернативни путеви које активира *p53*, који доводе до ћелијске сенесценције или ћелијске смрти(217). Примарни механизми кроз које су нивои *p53* регулисани у ћелијама је непрекидна деградација настала као последица његовог везивања за његов главни антагонист *MDM2*. *MDM2* је *E3* убиквитин лигаза која промовише деградацију *p53* уз помоћ протеазома. *MDM2* такође директно блокира *p53* везивањем свог *N*-терминалног трансактивационог домена. *MDM2* је транскрипциона мета *p53*, формирајући негативну регулаторну петљу чиме *p53* индукује експресију сопственог негативног регулатора(218). Када су ћелије изложене стресу, инхибиција *p53* од стране *MDM2* је уклоњена, чиме се активира *p53* и повећава се његова експресија. Два кључна механизма користе уклањање инхибиције *MDM2* преко фосфорилације сигналне каскаде која је покренута *ATM* киназом (219) и са директном интеракцијом *CDKN2A* протеином (*p14*), који је такође кодиран са *INK4* локусом(167, 220). Овај други механизам је посебно интересантан у контексту сенесценције, јер исти *INK4* локус кодира и инхибитор циклин зависних киназа *p16*, који има централну улогу у изазивању сенесценције преко *p16/pRb* сигналног пута. *p14* се активира на више начина, а најзначајнији су активација *RAS* и *c-myc* гена што резултује везивањем *p14* за *MDM2* и повећањем експресије *p53*(167, 220).

У контексту сенесценције, важна мета *p53* је инхибитор циклин зависне киназе *p21*, који је потребан за застој раста изазван сенесценцијом, као одговор на оштећење *DNA* било на *G1/S* или *G2/M* контролним тачкама ћелијског циклуса(221). Улога *p21* у *p53* зависном *G1* застоју је такође показана упоређивањем изогених људских ћелијских линија аденокарцинома. Примећено је да су родитељске ћелијске линије претрпеле очекиване промене ћелијског циклуса после индукције *p53* изазване оштећењем *DNA*. Међутим, *G1* застој је поништен у ћелијама које су дефицијентне у *p21*(222). Показано је и да ћелије скривањем оштећења *DNA* могу проћи кроз *G2* застој независно од *p53* и *p21*. Даље, ове ћелије остају способне да уђу у митозу, показујући да су *p53* и *p21* неопходни за одржавање стабилног застоја у *G2* фази који такође могу бити повезани са сенесценцијом(223, 224).

Од приближно 22.000 гена у људском геному, *TP53* је најчешће мутиран током карциногенезе(225). Иако је преваленција мутација веома варијабилна међу различитим типовима тумора верује се да је *TP53* мутиран у приближно 50% свих карцинома код људи. Најучесталије промене *TP53* гена су тачкасте (*point*) мутације. У око 75% случајева се ради о погрешно смисленим (*missense*) мутацијама(226). То су мутације код којих услед замене једног нуклеотида настаје синтеза мутантног протеина који се акумулира у ћелији, а од дивљег алела се разликује у једној аминокиселини. Око 25% мутација не доводи до синтезе *p53* протеина и то су бесмислене (*nonsense*) мутације. Различити карциногени делују различито на ген *TP53* и образац мутација је специфичан за сваки тумор.

Занимљиво је да неки *p53* мутанти добијају метаболичке функције које доприносе њиховим про-туморогеним активностима(227-231). Додатни појам који произлази из недавних студија односи се на метаболичке активности других кључних регулатора пута *p53*, али тренутно није јасно како различите компоненте пута *p53* оркестрирају своје метаболичке активности и којим механизмима дерегулација ове

сложене метаболичке мреже доприноси туморогенези. Иако метаболички програм који контролише *p53* на нивоу транскрипције постаје јаснији, многа питања остају без одговора, као што су она која се односе на молекуларне механизме помоћу којих метаболичке промене сигнализирају *p53* и како *p53* контролише различите подскупове својих циљних гена током метаболичког процеса. Интеграцијом вишеструких улазних сигнала који одражавају метаболички статус ћелије, *p53* се понаша као метаболички сензор и заузврат координира прилагођени метаболички одговор. На исход метаболичког одговора вођеног *p53* утичу ћелијски и ткивни контексти, али механизми који леже у основи разноликости метаболичких одговора регулисаних *p53* остају слабо схваћени. Дакле, пут *p53* и метаболизам су функционално испреплетени, а ово има велики значај не само за прогресију тумора, већ и за хомеостазу нормалног ткива и људске болести изван тумора(232).

1.2.4.2. Протеин ретинобластома, *pRb*

RB1 (енгл. *Retinoblastoma 1*) тумор супресорски ген откривен и изолован пре више од 30 година, био је предмет опсежног истраживања због његове истакнуте улоге у туморима(233). Мутацијски губитак функције *RB1* је примарни узрок ретинобластома, педијатријског тумора. Губитак функције *RB1* такође је укључен у развој других карцинома. Пацијенти са наследним ретинобластомом, на пример, имају повећан ризик од накнадних неповезаних карцинома што указује да мутациона инактивација *RB1* доприноси туморогенези у ткивима изван мрежњаче(234). Студије секвенцирања генома тумора потврдиле су да је *RB1* генетски измењен у значајном делу случајева за многе уобичајене карциноме код одраслих. Експерименталне студије потврдиле су да његов губитак, често у комбинацији са брисањем других гена, покреће туморогенезу у различитим ткивима(235-238).

Продукт *RB1* гена је протеин ретинобластома (*pRb*). *pRb* такође игра централну улогу и од суштинског је значаја за индукцију сенесценције у већини студија(239). Он је кључни тумор супресор који испољава своје ефекте на ћелијском циклусу путем инхибиторног деловања на *E2F* фактор транскрипције. Чланови фамилије протеина ретинобластома укључују *pRb*, *P107* и *P130*(240, 241). Међутим, постоје кључне функционалне разлике између њих, на пример, тумор супресорске функције *pRb* су јаче од оних *P107* и *P130*, јер само *pRb* се уобичајено налази мутиран у хуманом карциному. *pRb* је одавно препознат као кључни медијатор *G1/S* контролне тачке ћелијског циклуса. У *G0* и *G1* фази ћелијског циклуса, *pRb* је присутан у свом активном хипофосфорилисаном облику, везује се за хетеродимерни *E2F* фактор транскрипције и инхибира *E2F* зависну експресију гена потребну за прогресију ћелијског циклуса и *DNA* репликацију(240, 241). *pRb* се везује првенствено за активирање *E2Fs* (*E2F1*, *E2F2* и *E2F3*), у сарадњи са својим партнерима димеризације, потискујући њихову активност блокарањем трансактивационог домена и регрутовањем других протеина, као што је хистон деацетилаза(242).

Различити чланови породице циклин зависних киназа (*CDK*) регулишу различите фазе ћелијског циклуса. *pRb* садржи 16 наводних *CDK* места фосфорилације, који омогућавају фосфорилацију у раној *G1* фази циклуса од стране *CDK4/6*. Међутим, пре него што *CDK4/6* може да фосфорилише *pRb* треба да се повеже са циклином *D*. Овај ниво фосфорилације је, међутим, довољан да растави репресивне комплексе формиране од *pRb* фамилије протеина. Крајем *G1* фазе циклуса, даља фосфорилација *pRb* од стране *CDK2* у комплексу са својим везујућим партнером циклином *E* доводи до прекида *pRb-E2F* комплекса, омогућавајући активирање *E2F* гена који одговарају за напредовање ћелије кроз *G1* и улазак у *S* фазу ћелијског циклуса(242).

1.2.4.3. Интеракција *pRb* и *p53* у ћелијској сенесценцији

Физиолошка улога *pRb* у контроли ћелијског циклуса дозвољава да овај тумор супресорски протеин игра важну улогу у успостављању застоја ћелијског циклуса повезаног са ћелијском сенесценцијом. Одговор на *DNA* оштећење (*DDR*) односи се пре свега на изазивање сенесценције преко активације *p53/p21* пута, док негенотоксичан стрес, као што је сигнални пут онкогена *RAS*, изазива сенесценцију кроз *p16/pRb* сигнални пут тако што инхибира активност *CDK4/6* кроз *p16* активацију(145, 243, 244). Постоји повезаност између *p53/p21* и *p16/pRb* сигналних путева. Повећана активност *p53* повећава ниво *p21* који може инхибирати хиперфосфорилацију *pRb* протеина од стране *CDK2*/циклина *E*, који су неопходни да се транскрипциони фактор *E2F* ослободи инхибиције за пролазак кроз *G1* фазу циклуса, а ово даље проузрокује застој раста сенесценцијом. *p21* може такође зауставити прогресију ћелијског циклуса инхибицијом комплекса циклина *A* и циклина *D* са циклин зависним киназама(245). Значај *pRb* у одржавању стабилног застоја ћелијског циклуса је демонстриран акутном инактивацијом у сенесцентним ћелијама. Сенесцентне ћелије након *pRb* инактивације покушају да поново уђу у *S* фазу циклуса и поново покрену синтезу *DNA*, али пролазе кроз *E2F* зависну апоптозу због активирања *p73*, члана *p53* фамилије протеина(246). Ово показује да је функционалан *pRb* не само потребан за успостављање сенесценције, него и за њено одржавање. Иако је помак ка фосфорилисаном стању *pRb* од кључног значаја за почетни брз одговор на оштећење *DNA*, што доводи до пролазног застоја, у овој фази ћелије не показују маркере сенесценције и могу да избегну застој ћелијског циклуса(247). Ћелије које улазе у сенесценцију пролазе кроз промене у експресији протеина, при чему се оне пребацују из *pRb* на *p130* експресију. Ове ћелије типично показују смањење нивоа *pRb* и *p107* након сенесценције, док су нивои *p130* повећани у време када се фенотип маркера сенесценције појављује и застој ћелијског циклуса постаје неповратан(248).

1.2.4.4. Инхибитор циклин зависне киназе *p21* (*p21^{VAF1/CIP1}*)

p21, протеин од 21 *KDa* кодиран геном *CDKN1A*, члан је *Cip/Kip* породице *CDKI* поред *p27* и *p57*. Способан је да инаktivира све *CDK*, чиме инхибира прогресију ћелијског циклуса(249). Он инхибира киназну активност циклин-*CDK* комплекса интеракцијом са циклинима преко два мотива везивања циклина (*Cy1* и *Cy2*). Ово доводи до инхибиције фосфорилације *pRb* породице протеина и каснијег повезивања са *E2F* и формирања комплекса *DREAM*, што доводи до заустављања ћелијског циклуса(250, 251). *p21* игра двоструку конфликтну улогу у напредовању ћелијског циклуса у зависности од његовог нивоа експресије(252). Високи нивои *p21* инхибирају киназну активност циклин-*CDK* комплекса што доводи до инхибиције прогресије ћелијског циклуса, док ниски нивои делују као фактор склапања комплекса циклин *D/CDK4,6* и промовишу његову активацију што доводи до ћелијске прогресије циклуса(224). Пошто је познато да *p21* ступа у интеракцију са различитим комплексима циклин/*CDK* и инаktivира их, способан је да изазове заустављање ћелијског циклуса у било којој фази, за разлику од *INK4* породице *CDKI* који специфично везују и инаktivирају *CDK4* и *CDK6*, чиме изазивају заустављање ћелијског циклуса само током *G0/G1* фазе(253). *p21* се такође може активирати помоћу *p53* независних механизма помоћу других стимулатора као што су нуклеарни рецептори укључујући андроген, витамин *D* и ретиноидне рецепторе. Индукција *p21* је кључна за покретање заустављања раста посредованог сенесценцијом различитим стимулусима(254). Усходна регулација *p21* игра кључну улогу у развојној сенесценцији јер мишеви којима недостаје показују дефекте у ембрионалном старењу, одржавању апикалног ектодермалног гребена и обликовању, као и друге развојне дефекте. Развојна

сенесценција је пролазна програмирана ћелијска сенесценција која се јавља током ембрионалног развоја сисара(255). Међутим, експресија *p21* не постоји у сенесцентним ћелијама јер је углавном потребна за индукцију сенесценције(256). Насупрот томе, *p16* је неопходан за одржавање сенесценције. Поред контроле транскрипције *p21* помоћу *p53* зависних и независних механизма, она је такође регулисана на посттранслационом нивоу. Новосинтетисани *p21* је стабилизован помоћу *WISP39* протеина који се везује за *Hsp90*, који спречава његову деградацију посредовану протеазомима(257, 258). Додатне посттранслационе модификације, као што је фосфорилација, могу модулисати везујуће партнере или променити субћелијску локацију, која има потенцијал да промени своју функцију блокарањем њене способности да делује као инхибитор циклин зависне киназе(259). *p21*, када је присутан у једру, инхибира прогресију ћелијског циклуса, док се након фосфорилације транспортује у цитоплазму где функционише као анти-апоптотички протеин(259). Стога, *p21* игра вишеструке улоге унутар ћелије регулишући различите процесе(260, 261).

1.2.4.5. Инхибитор циклин зависне киназе *p16* (*p16^{Ink4a}*)

p16 је протеин супресор тумора и носи неколико имена: главни супресор тумора 1 (енгл. *Major Tumor Suppressor 1, MTS-1*), инхибитор циклин зависне киназе 4а (енгл. *Inhibitor Of Cyclin-Dependent Kinase 4a, INK4a*) или *p16* и инхибитор циклин зависне киназе 2А (енгл. *Cyclin-Dependent Kinases Inhibitor 2A, CDKN2A*)(166). *p16* је члан фамилије *INK4* који представљају инхибиторе циклин зависних киназа (*CDK*). *p16* је кодиран геном локализованим на хромозому *9p21*, у оквиру *INK4a/ARF* локуса који кодира два различита протеина са различитим промотерима *p16* и *p14*. Оба протеина имају антипролиферативну активност и укључени су у *pRb* и *p53* сигналне путеве. Ови протеини и њихове интеракције су од кључног значаја за разумевање кључне тачке сузбијања настанка тумора. Добро је познато да *p16* доприноси регулацији прогресије ћелијског циклуса инхибицијом *S* фазе ћелијског циклуса. *p16* везује *CDK4/6*, инхибира циклин *D-CDK4/6* комплекс и *CDK4/6* посредовану фосфорилацију *pRb*. Експресија *p16* одржава *pRb* у хипофосфорилисаном стању, промовишући везивање за *E2F1* и доводи до застоја ћелијског циклуса у *G1* фази(166).

p16 као негативни регулатор пролиферације ћелијског циклуса представља један од главних фактора у спречавању настанка тумора. Близу 50% свих тумора код људи показују *p16* инактивацију у распону од 25 до 70%(262); они укључују карциноме главе и врата, једњака, билијарног тракта, јетре, плућа, мокраћне бешике, дебелог црева и дојке, затим леукемију, лимфому и глиобластому(263-266). Генетске промене које изазивају инактивацију *p16* укључују тачкасте мутације, хомозиготне делеције, хиперметилацију промотера и *LOH* (енгл. *Loss Of Heterozygosity*). Најчешће генетске промене *p16* су хомозиготна делеција и хиперметилација промотера(267). Чини се да постоји склоност ка одређеној врсти алтерације *p16* код одређених типова тумора: хомозиготне делеције *p16* су чешће код аденокарцинома панкреаса (48%), док се тачкасте мутације (30%) понављају код карцинома сквамозних ћелија главе и врата. Код аденокарцинома желуца, аберантна метилација представља већину промена *p16* (34%), при чему су делеције или мутације *p16* ретке (0%–2%)(267). Тип генетске алтерације дефинише функционалност *p16*: хомозиготне делеције и хиперметилација промотера, типично, доводе до нефункционалног *p16*, док тачкасте мутације, посебно мисенс мутације и мала делеција унутар оквира, нарушавају структуру и активност *p16*(267). *p16* инактивација описана је као рани и критични догађај у прогресији неких типова тумора(268-271). У том смислу, одређени молекуларни механизми *p16* репресије су директно повезани са канцерогенима, као што су дуван у карциному плућа

и оксидативни стрес услед реактивних кисеоничних врста, што указује на важну улогу у развоју неких пренеопластичних лезија(272, 273).

Фосфорилација *p16* је повећана у сенесцентним епителним ћелијама. Фосфорилисани *p16* показује појачан афинитет везивања са *CDK4/6* у поређењу са нефосфорилисаним *p16*, што доводи до сенесцентног застоја у *G1* фази циклуса. Различити остаци *p16* могу бити фосфорилисани и фосфорилација може елиминисати већину активности инхибиције *p16/CDK4*, утичући на структуру једра или конформациону стабилност. Поред тога, сваки догађај који утиче на фосфорилацију *p16* може да утиче на активност *p16*. Фосфорилација протеина је такође стриктно повезана са степеном оксидативног стреса унутар ћелија. Дакле, оксидативни стрес може да подстакне фосфорилацију *p16*, што доводи до заустављања деобе ћелија и ране сенесценције, спречавајући ћелије да постану неопластичне(267). Многи протеини позитивно/негативно регулишу интеракцију *p16/CDK4* и последичну фосфорилацију *pRb* посредовану *CDK4*. Инхибиторни *KIP* протеини (протеини инхибитори *CDK*), као што су *p21*, *p27* и *p57*, су у стању да инхибирају већину комплекса *CDK*-циклин заједно са неким киназама које нису повезане са *CDK*(274). Комплекс *KIP/CDK4/6* може дислоцирати *p16* из *CDK4/6* омогућавајући *p16* да буде укључен у друге путеве осим фосфорилације преко *pRb - CDK4/6* или да се разгради(267). Супресија *GRIM-19* (енгл. *Genes associated with Retinoid-IFN-induced Mortality-19*) се постиже директном интеракцијом са *p16*, чиме се промовише *p16* инхибиција фосфорилације *pRb* помоћу *CDK4/6*. *CDK4*, *p16* и *GRIM-19* формирају комплекс. *GRIM-19* промовише везивање *p16* за *CDK4*, док прекомерна експресија циклина *D1* доводи до губитка *CDK4/p16/GRIM-19* комплекса(275). *p16* може да се веже и потисне *IκBα*, специфични инхибитор *NF-κB*. *IκBα* се бори са *p16* за везивање *CDK4* и инхибира фосфорилацију *pRb* помоћу *CDK4*(267). Ганкирин и *p16* се такмиче за везивање за *CDK4*; међутим, *CDK4* није инхибирана везивањем за ганкирин, што доводи до прогресије ћелијског циклуса(276). *P34^{SEI-1}* се везује само за *CDK4* који изгледа да се супротставља активности *p16*, чинећи фосфорилацију *pRb* помоћу *CDK4* отпорном на инхибицију *p16* током касне *G1* фазе(277). *Tax* је активатор транскрипције кодиран екзоном 2 генома хуманог Т лимфотропног вируса 1. Може да формира комплекс са *p16* спречавајући инхибицију *CDK4/6 - p16*, што доводи до прогресије ћелијског циклуса(267).

Са друге стране генетска инактивација *p16* се често налази код тумора. Регулација *p16* код хуманих тумора зависи од ефеката генетских абнормалности *p16*, активације онкогена и промена у сродним туморским супресорима. Делимично одсуство функције *p16* секундарно у односу на мисенс мутације *p16* може се уравнотежити повећаним нивоима *p16* уоченим код неких тумора. Чак иако је *p16* очуван, додатне молекуларне промене које су резултат прекомерне експресије циклина *D1*, ганкирина и *SEI-1* могу функционално инактивирати *p16*, изазивајући прогресију тумора. Код карцинома, функционалност *p16* није неизбежно одраз генетског статуса самог *p16*. Статус *p16* може се разликовати током различитих фаза раста тумора: током најранијих фаза, дерегулација *p16* је највероватније секундарна последица активације онкогена и може се десити пре генетских промена *p16*. Коначно, дерегулација *p16* посредована онкогеном може драматичније утицати на активност *p16* од његове генетске инактивације(166).

Прекомерна експресија *p16* код карцинома није добро схваћена. Прекомерна експресија мутаната *p16* може бити покушај да се обнове функције *p16* у неким туморима и може бити подстакнута стресом или онкогеним факторима, али се њен негативан утицај на ћелијску пролиферацију може избећи или спречити алтернативним молекуларним догађајима(267). Мутације у *INK4a/ARF* локусу повезане са *BRCA1*, *BRCA2* и *p53* мутацијама су описане у фамилијарним карциномима дојке(278).

Оно што је такође битно да се каже односи се на различиту локализацију експресије *p16* у самим ћелијама. Класично, једина функција приписана *p16* је регулација ћелијског циклуса и ова функција одвија се у једру. Изненађујуће, постоје значајни докази да неколико неоплазми показују значајне нивое *p16* у цитоплазми(279, 280). Штавише, цитоплазматски *p16* је повезан са прогресијом тумора и прогнозом код неких врста неоплазми. На пример, код карцинома дојке, присуство *p16* је првенствено ограничено на једру у фиброаденому, а нуклеарно/цитоплазматско или искључиво цитоплазматско бојење код карцинома(266, 281). У колоректалном карциному, *p16* показује сличан образац, показује снажну нуклеарно - цитоплазматску позитивност (око 80%) у аденому и у примарним или метастатским аденокарциномима, док негативност или ниска нуклеарна експресија се среће у нормалној слузокожи и у бенигним променама(266, 282, 283). Поред тога, у неепителним туморима попут астроцитоме или леиомиосаркома утеруса, *p16* прекомерна експресија се може детектовати и у нуклеусу и у цитоплазми, а ова разлика у бојењу је повезана са високим градусом малигних фенотипова(284, 285). Додатну подршку овој хипотези дали су *Haler* и сарадници који су описали везу између *p16* цитоплазматске експресије и *p16* нуклеарне нисходне регулације, са слабом прогнозом код гастроинтестиналних стромалних тумора(286). Ови резултати подржавају хипотезу да *p16* има различите улоге у различитим субцелуларним локацијама, а да је контрола ћелијског циклуса углавном регулисана нуклеарном експресијом *p16*.

Неколико студија сугеришу да је способност да заобиђу сенесценцију главни молекуларни механизам укључен у прогресију премалигних до малигних ћелија(180, 282, 287, 288), тј. инактивација *p16* је главни механизам у заобилажењу сенесценције током малигне трансформације. *p16* је значајно активиран у свим новим неоплазмама и околним стромалним ћелија. Студија *Burda* и сарадника је показала да тумори имају способност да индукују *p16* експресију у њиховој околној строми и инфилтрирају имуне ћелије, указујући на то да локално *p16* експресија такође може да се активира као одговор на спољашње сигнале одговорне за настајање тумора(289).

1.2.5. Сенесценцијом узрокован секреторни фенотип (*SASP*)

Сенесцентне ћелије се укључују у сложени проинфламаторни одговор у ткиву познат као *SASP* (енгл. *Senescence-Associated Secretory Phenotype*). Иако су сенесцентне ћелије у стању заустављеног раста, оне остају метаболички активне. Сенесценција не утиче само на догађаје унутар ћелије, већ има потенцијал да утиче на околину и комуницира са суседним ћелијама тако што лучи сложено мешавину секретираних фактора који могу променити понашање оближњих ћелија које нису сенесцентне(113, 143, 290). Ћелије које су подвргнуте сенесценцији показују значајне промене у својој секрецији и показују хиперсекреторни фенотип који се зове секреторни фенотип удружен са сенесценцијом, један од кључних обележја сенесценције(112). Главне компоненте *SASP*-а укључују мноштво растворљивих сигналних фактора, као што су проинфламаторни цитокини, хемокини, модулатори раста, ангиогени фактори, протеазе, биоактивни липиди, компоненте екстрацелуларног матрикса и матрикс металопротеиназе (*ММП*)(143, 291).

Иако су вишеструке студије идентификовале *SASP* компоненте у различитим типовима ћелија, тачан састав *SASP*-а остаје тема текућих истраживања. *IGFBP3* (енгл. *Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins 3*), *IGFBP4* (енгл. *Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins 4*) и *IGFBP7* (енгл. *Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins 7*) су кључни играчи *SASP*-а за које се сугерише да учествују у посредовању сенесценције паракрином сигнализацијом(292). Способност *IGFBP3* да индукује сенесценцију је регулисана системом инхибитора активатора плазминогена-1 (*PAI-1*) ткивног типа(293,

294). *PAI-1* је критични низводни циљ *p53* који је укључен у изазивање репликативне сенесценције путем *PI(3)K-PKB-GSK3 β* -циклин *D1* пута(295). *SASP* игра кључну улогу у посредовању у неколико патофизиолошких ефеката сенесцентних ћелија и стога је уско повезан са његовим корисним, као и штетним ефектима(296, 297). Састав и јачина *SASP*-а значајно варирају, у зависности од индуктора сенесценције, њеног трајања, околине и типа ћелије(298, 299). Уочени исходи су и зависни од контекста и специфични за тип ћелије. Међутим, проинфламаторни фактори зависни од *NF-kB* су кључне компоненте *SASP*-а, при чему су *IL-6* и *IL-8* најконзервиранији и најјаче експримирани цитокини(300).

Оштећење *DNA*, дисфункционалне теломере, геномско оштећење, митогени пролиферативни сигнали, оксидативни стрес или други стимуланси који изазивају сенесценцију, доводе до продужене *DDR* експресије *SASP*-а у различитим размерама(194, 301-304). Насупрот томе, *SASP* се не може детектовати у ћелијама у којима је сенесценција изазвана ектопичном експресијом *p21* или *p16*, упркос приказивању других кључних маркера сенесценције(305). Стога је оштећење *DNA* суштински покретач *SASP*-а. Међутим, постоје и други механизми за сигнализацију одговора на оштећење *DNA* који регулише *SASP* преко *p38MAPK*. Показано је да *p38MAPK* индукује *SASP* углавном индукујући активност *NF-kB*(300, 306). Слично, индукција сенесценције митохондријалном дисфункцијом представља посебан секреторни фенотип(307).

Фактори секреторног фенотипа повезани са сенесценцијом могу појачати и проширити сенесценцију испољавајући своје ефекте и на аутокрини и на паракрини начин. Фактори као што су *IL-1A* и *IL-6* делују на ћелијски аутономни начин како би ојачали стање сенесценције, док многи други *SASP* фактори делују вршењем ћелијских неаутономних ефеката који омогућавају промену понашања суседних ћелија укључујући испољавање сенесценције код здравих ћелија, компетентних за пролиферацију(201, 301, 308). Овај тип ћелијског неаутономно стабилног заустављања раста назива се паракрина сенесценција. Прво је показана као ефекат посматрача сенесценције у коме су сенесцентне ћелије биле способне да индукују *DDR* у суседним ћелијама(308). Ова студија је сугерисала укључивање реактивних врста кисеоника (енгл. *Reactive Oxygen Species, ROS*) у паракрину сенесценцију, јер је примећено да се сенесценција дешава преко контакта ћелије са ћелијом посредованог спајањем празнина, што омогућава пренос *ROS*(300). Аутокрини и паракрини сенесценција, заједно са имунолошким надзором, објашњавају акумулацију сенесцентних ћелија и њихов штетни ефекат.

Протеини *SASP*-а могу се лучити у екстрацелуларно окружење на различите начине. Многи чланови се производе као растворљиви протеини који се могу директно лучити, док се други иницијално експримирају као трансмембрански протеини који захтевају излучивање ектодомена за секрецију(309). Неки ензими попут *ADAM17* (енгл. *A Disintegrin And Metalloprotease*) појачано су регулисани у *OIS*-у и карциномима и одговорни су за регулисање избацивања ектодомена многих *SASP* фактора везаних за ћелијску мембрану(310, 311). Поред тога, мале екстрацелуларне везикуле сличне егзосомима недавно су се појавиле као кључне компоненте сенесценције ћелије како би се омогућиле дисталније функције, као што је повећање пролиферације ћелија карцинома(312), што је интригантна тема која захтева даље истраживање. *SASP* је описан као временски регулисан динамички програм који се може поделити на почетну брзу фазу повезану са *DDR*-ом праћену раном фазом самопојачавања која на крају доводи до касне „зреле“ фазе(313).

SASP је карактеристика сенесцентних ћелија која даје већину својих биолошких ефеката, како корисних тако и штетних и стога је кључни регулатор нормалне

физиологије и патологије повезане са ћелијском сенесценцијом. Састав *SASP* је хетероген; функције су такође прилично разноврсне и зависе од генетског контекста ћелија изложених *SASP*-у и суседног окружења. Ефекат аутокрине и паракрине сигнализације различитих *SASP* фактора у специфичном контексту је плеiotропан што објашњава парадоксалну улогу ћелијске сенесценције. На пример, *IL-6* и *IL-8* су две главне *SASP* компоненте за које се показало да играју и позитивну и негативну улогу у различитим биолошким процесима као што су зарастање рана, поправка ткива и прогресија тумора(314, 315). Досадашња открића сугеришу да је *SASP* можда настао у тежњи да помогне оштећеним ћелијама које су сенесцентне да комуницирају са суседним ћелијама о њиховом компромитованом стању и иницирају поправку и регенерацију ткива стимулишући оближње прогениторне ћелије или да стимулише имуни систем да промовише њихов имуни клиренс(113, 316).

SASP компоненте контролишу мноштво функција и играју кључне корисне физиолошке улоге као што су: убрзано зарастање рана секретујућим факторима као што су *PDGF-AA* и *CCN1*(315, 317-319), промовишући пластичност ткива у одговор на оштећење за одржавање хомеостазе ткива(208, 320), развој ембриона(321), деградацију фиброзног ожиљка (322) и супресију тумора(323). *SASP* посредована аутокринна и паракрина сигнализација која појачава сенесценцију доприноси супресивним функцијама *SASP*-а ограничавањем пролиферације ризичних ћелија праћених имунолошким клиренсом премалигних ћелија(140, 201, 308, 324-326). Међутим, фактори који одређују равнотежу између поправке, регенерације и сенесценције, као одговор на оштећење, захтевају даље испитивање.

Недавна открића сугеришу да штетни ефекти *SASP*-а засењују његова корисна својства. Инфламаторне *SASP* компоненте и акумулација незрелих имуносупресивних мијелоидних ћелија у чврстим туморима промовишу туморогенезу покретањем миграције ћелија, раста, инвазије, ангиогенезе и на крају метастаза(327-329). Ово показује вишеслојну интеракцију између *SASP*-а, имуних ћелија и карциномских ћелија, у складу са *Eggert*-ом и сарадницима(212), где је у почетним фазама *SASP* посредовао у регрутовању незрелих мијелоидних ћелија (*iMC*) које када се диференцирају у макрофаге чисте премалигне сенесцентне ћелије како би спречиле иницијацију тумора. С друге стране, у каснијим фазама туморске ћелије блокирају сазревање акумулираног *iMC* који на крају подстиче раст хепатоцелуларног карцинома инхибирањем функција *NK* ћелија(212). *SASP* такође посредује у штетним ефектима сенесцентних ћелија које се акумулирају након третмана хемотерапијом јер њихово хронично присуство промовише локалну и системску упалу. Елиминација сенесцентних ћелија изазваних терапијом може спречити поновну појаву тумора(330). Недавно се показало да други *SASP* фактор амфирегулин (*AREG*) покреће резистенцију карцинома путем *EFGR* пута и повећава малигност(331).

SASP компоненте имају потенцијал да промене различите ћелијске процесе унутар микроокружења при чему хронични *SASP* изазива негативне исходе, док је краткотрајни пролазни *SASP* користан. Анализа појединачних ћелија након индукције ћелијске сенесценције секвенцирањем *RNA* једне ћелије открила је изненађујуће значајне варијације од ћелије до ћелије у експресији *SASP* гена(332). Стога је могуће да нам профилисање једне ћелије може омогућити да разумемо која одређена *SASP* компонента покреће одређену функцију *in vivo* у специфичном контексту.

1.2.6. Учешће сенесценције у туморогенези

Добро је познато да се интензитет протока онкогене сигнализације прогресивно повећава током раних фаза туморогенезе док не постигне праг активације кључних путева сузбијања тумора *p16* и *p53*. Кад се то деси инхибитори ћелијског циклуса

надокнађују онкогену сигнализацију и ћелија улази у сенесценију, која спречава напредовање преканцерозних лезија. Сходно томе сенесценција се може детектовати у бенигној фази туморогенезе, која зависи од врсте ткива, позната као аденом, *in situ* карцином, интраепителна неоплазија и друго(132). Постоје докази да ћелије које подлежу оштећењу, изазваном сенесценцијом, могу бити уклоњене имунолошки посредованим клиренсом(333). То је делимично последица ангажовања инфламторних ћелија које имају улогу у фагоцитози, а који су вероватно привучени од стране *SASP* фактора(333). Ћелије са активацијом онкогена или губитком гена за сузбијање тумора *PTEN* пролазе кроз сенесценцију што сугерише да је ћелијска сенесценција баријера за туморогенезу. Иако *SASP* фактори могу да појачају сенесценцију многа истраживања су показала да они могу бити више штетни него корисни, јер у многим окружењима могу да промовишу туморогенезу и прогресију тумора(334-336). *SASP* може промовисати иницијацију тумора. Првобитно је предложено да је сенесценција механизам за сузбијање тумора(287, 337). Дакле, заобилажење или избегавање сенесценције је потребно за формирање тумора, а очекивало би се да ће елиминација сенесцентних ћелија смањити „базен“ почетних туморских ћелија и смањити формирање тумора. Трансгени модел миша, назван апоптоза повезана са *INK*-ом кроз циљану активацију каспазе (*INK-ATTAC*) омогућава индуцибилно убијање сенесцентних ћелија које експримирају *p16*(338). Иако је модел првобитно био узгајан за проучавање фенотипова повезаних са узрастом, селективно убијање сенесцентних ћелија у *INK-ATTAC* моделу значајно је смањило спонтано формирање тумора(339), подржавајући кључну улогу сенесценције у спречавању трансформације. Ово би могло указивати на то да уклањање почетних сенесцентних туморских ћелија може смањити „скуп“ ћелија које би касније могле да развију тумор. Алтернативно, уклањање сенесцентних стромалних ћелија које промовишу тумор може довести до смањене стопе тумора.

Значајна количина података подржава улогу сенесцентних стромалних ћелија у промоцији тумора. Показано је да сенесцентни фибробласти могу да промовишу пролиферацију пренеопластичних или неопластичних ћелија(340-342). Кондиционирани медијум сенесцентних фибробласта има исти ефекат који подстиче раст туморских ћелија као што је примећено у кокултури са сенесцентним фибробластима(343, 344), при чему ово указује да *SASP* може да промовише пролиферацију туморских ћелија, барем *in vitro*, преко паракриних фактора. На пример, *IL-6* је уобичајен *SASP* фактор који може убрзати раст туморских ћелија у мишјим моделима карцинома укључујући кожу(345), дојку(346, 347), простату (348) и плућа(349). Иако све ове студије нису биле повезане са сенесценцијом, оне наглашавају моћне про-пролиферативне ефекте *IL-6*. Други уобичајени *SASP* фактор, *CXCL1*, посредује у инвазији ћелија карцинома дојке(350). Утврђено је да сенесцентне ћелије луче повећане нивое *MMP*-а, при чему може да се експримира у стромалним фибробластима повезаним са епителним ћелијама карцинома, а висок ниво *MMP*-а, посебно *MMP11* је повезан са прогресијом и неповољном прогнозом карцинома дојке(351).

Узети заједно, горњи докази показују да *SASP* може промовисати пролиферацију туморских ћелија у различитим контекстима. *SASP* може промовисати и метастазирање тумора. *SASP* фактори могу промовисати различите процесе укључене у метастазирање. *SASP* фактори изведени из фибробласта могу покренути ангиогенезу (352) лучењем васкуларног ендотелног фактора раста (*VEGF*)(353), који може да подстакне инвазију ендотелних ћелија и повећа васкуларизацију. Други *SASP* фактор, фактор раста везивног ткива (*CTGF*), промовише ангиогенезу и туморогенезу у простати у моделу миша(354). *SASP* фактори такође могу снажно утицати на инвазију туморских ћелија и промовисати епително-мезенхималну транзицију (енгл. *Epithelial-Mesenchymal*

Transition, EMT) у туморским ћелијама, што доводи до појаве метастатских карактеристика *in vitro*(355). Матриксне металопротеиназе изведене из сенесцентних ћелија и ремоделирање екстрацелуларног матрикса могу директно утицати на метастазирање(356, 357). Конкретно, показало се да фибробласти коже који пролазе кроз репликативну сенесценцију луче *MMP-1* и *MMP-2*, што је довело до активације серин/треонин-протеин киназе *PAR-1* на туморогеним кератиноцитима и стимулисало њихову инвазивну активност(209). Коначно, индукција сенесценције у туморским ћелијама такође може утицати на метастатски потенцијал суседних несенесцентних туморских ћелија. Заиста, конститутивна експресија *HER2* индукује сенесценцију у ћелијама карцинома дојке које затим промовишу способност пролиферације ћелија карцинома дојке да метастазирају на ћелијски неаутономан начин(358).

1.2.7. Сенесценција у третману карцинома

До сада је већина студија сугерисала да неуспех пута индукције сенесценције у комбинацији са активираним онкогеном може довести до стварања тумора *in vivo*. Међутим, важно је питање, може ли се још и индуковати сенесценција у туморима како би се зауставио даљи раст? Недавне студије су показале да хемотерапијски лекови и зрачење могу изазвати сенесценцију у ћелијама тумора(359). Врло често тумори развијају отпорност на хемотерапијску апоптозу изазвану лековима. Индукција сенесценције у таквим случајевима може послужити као резервни план за инхибицију раста ћелија тумора. У ствари, недавно је објављено да комбиновани третман ћелија инхибитором пан-каспазе (*Q-VD-OPH*) и доксорубицином увелико убрзава сенесценцију и доводи до преокретања резистенције на лек у неколико ћелијских тумора(360). Индукција сенесценције у узгојеним туморским ћелијама средствима која оштећују *DNA* је охрабрујућа, али најважније питање је да ли се реакција сенесценције на хемотерапијске лекове дешава *in vivo*, и ако јесте, да ли сенесценција изазвана терапијом довољно доприноси терапијској ефикасности? Недавне студије пружају убедљиве доказе да ћелијска сенесценција заиста може бити индукована *in vivo* хемотерапијским лековима. У првој студији, *te Poele*-а и сарадника, обојени су пресеци карцинома дојке, код пацијената који су били подвргнути режиму хемотерапије, на *SA-β-GAL* маркер и *p53* и *p16* протеине. Док су нормална ткива у близини тумора била лишена *SA-β-GAL*, важно је да је 15 од 36 (41%) тумора обојено позитивно на маркер *SA-β-GAL*(361). Аутори су такође показали да су сегменти тумора код пацијената који нису примили хемотерапију позитивно обојени на *SA-β-GAL* само у 10% случајева, а ово бојење је било у неколико изолованих ћелија у поређењу са многим интензивним мрљама бојења присутним у леченом тумору. Поред тога, интензивно бојење *SA-β-GAL*-ом је корелирало са високом експресијом *p16* протеина, за који се зна да је повишен током сенесценције. Премда аутори нису покушали да повежу бојење *SA-β-GAL* са преживљавањем, спекулише се да индукција сенесценције хемотерапијом резултира стабилном болешћу, а не регресијом тумора, што се често примети током лечења цитотоксичним лековима код пацијената(361). Недавно је показана и индукција убрзане или превремене сенесценције током хемотерапијског лечења хуманог карцинома плућа *in vivo*. Иако је величина узорка у овој студији била врло мала, установљено је да су две од три пацијенткиње које су лечене карбоплатином и таксоллом интензивно експримирале *SA-β-GAL*, док још три узорка нелечених пацијената нису показала значајно бојење *SA-β-GAL*(362). Студија *Schmitt*-а и сарадника, такође пружа јасан доказ о улози сенесценције у хемотерапији карцинома у трансгеничном моделу миша. Аутори су показали да *CTX* (циклофосфамид), лек за хемотерапију, може да укључи програм сенесценције када апоптозу инхибира прекомерна експресија *Bcl2* током лимфома индукованог *Em-Myc*-ом у дивљем типу

трансгених мишева који садрже *p53*. Као резултат тога, лимфом који експримира *Bcl2* и дивљи тип *p53* није напредовао, а мишеви су имали бољу прогнозу после третмана СТХ-ом(363). Индукција фенотипа сличног сенесценцији је такође примећена код тумора дојке пацова који су били подвргнути лечењу хемопревентивним средствима(364). Стога, хемотерапијски лекови могу индуковати фенотип сличан сенесценцији *in vivo* и *in vitro* усходном регулацијом *p53* и/или *p16*. Више од 90% тумора садржи активност теломеразе која се лако открива(365). Сматра се да теломераза и разни протеини који регулишу теломеразу и протеини који везују теломере регулишу дужину теломера у ћелији. У принципу, теломераза и теломеразно-регулаторни протеини могу бити циљани да изазову дисфункцију теломера и изазову апоптозу или сенесценцију у преканцерозним ћелијама и карциномима(366-368). Комбиновани третман ћелија инхибиторима теломеразе и другим регулаторима теломеразе може бити од користи када тумори развију резистенцију на инхибиторе теломеразе(369).

1.2.8. Будуће перспективе и изазови

Ћелијска сенесценција је одговор на стрес и активацију онкогена који промовише поправку, доприноси хомеостазу ткива и штити нас од карцинома, изазивајући стабилно заустављање ћелијског циклуса и намећући комплексни секреторни фенотип који утиче на оближње ткиво. Програм сенесценције се стога вероватно примењује да би се избегла аберантна пролиферација ћелија изазвана онкогеном и оркестрирала поправка ткива у оштећеним областима. Пре више од једне деценије, колекција значајних чланака јасно је показала да сенесцентне ћелије обилују у премалигним лезијама многих ткива(132), постављајући темеље концепту *OIS-a in vivo*. Такви налази су укључивали мишеве са фенотипом склоном туморима којима недостају кључни регулатори сенесценције (нпр. *p53* и *p16*), који су касније проширене од стране других истраживачких група користећи бројне генетски модификоване моделе мишева различитих типова тумора. Сенесценција, као и карциногенеза, је изузетно хетероген процес у зависности од окидача, типова ћелија, контекста ткива и других фактора, а чини се да је хетерогеност сенесценције посебно висока у узорцима људског ткива. Ова карактеристика, уз фокус истраживања на преканцерозне лезије, довела је до веома непотпуног разумевања ћелијске сенесценције у узорцима пацијената у поређењу са претклиничким или мишијим моделима. Иако се чини да је сенесценција у изобилу у узорцима пренеопластичног ткива пацијената, потребне су детаљније студије на људима да би се схватио обим, контекст и улога ћелијске сенесценције. Такође се морамо позабавити кључним питањима о сенесценцији у људској патологији, укључујући разумевање: (а) улоге лучења просенесцентног *SASP-a* од стране сенесцентних ћелија, да ли и како ово проширује фенотип застоја на оближње пролиферативне (онкоген-активирани) ћелије у специфичним неопластичним процесима и како то може поћи по злу током прогресије тумора; (б) контексте у којима сенесценција доприноси ефектима који подстичу тумор, било ћелијским неаутономним (паракриним) или ћелијским аутономним активностима; (в) који се биомаркери могу користити као потписи ових наизглед антагонистичких процеса. Даље, кроз процену сенесценције, идентификација поузданих биомаркера сенесценције и његових повезаних ефеката у преканцерозним лезијама може пружити вредне клиничке информације за прогнозу и/или рано откривање карцинома. Као један пример, преканцерозне лезије у хуманом неситноћелијском карциному плућа укључују спектар хистопатолошких фенотипова за које се сматра да су прогресивни, атипична аденоматозна хиперплазија, аденокарцином *in situ* и минимално инвазивни аденокарцином(370). Кључна препрека у развоју нових дијагностичких алата за

сенесценцију је одсуство универзалног маркера – то може одражавати непотпуно разумевање (постоји један/више и он/они још увек нису откривени) или суштинску хетерогеност процеса (не постоји ниједан, али одређени биомаркери могу дефинисати специфичне фенотипове сенесценције, можда су специфични за тип ћелије, контекст мутације или окидач сенесценције). Дубље разумевање покретача, основних молекуларних механизма и сигналних путева, као и како се они понашају у различитим типовима ћелија и ткивима, олакшаће идентификацију и одређивање приоритета дијагностичких и циљаних биомаркера и развој нових алата за детекцију и праћење сенесцентних ћелија. Иако је састављена колекција обележја сенесценције и постоје неки невероватно корисни маркери, сада морамо дати приоритет истраживању у решавању празнина у знању за најнепосреднију клиничку корист. Ово укључује идентификацију специфичних или различито прекомерно експримираних, циљаних маркера.

2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Циљеви истраживања

Основни циљ овог истраживања је анализа експресије маркера *OIS* у бенигним и малигним променама дојке. У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. Испитивање присуства сенесценције у бенигним и малигним променама у дојци семиквантитативном имунохистохемијском анализом експресије *SA-β-GAL*.
2. Анализа експресије маркера *OIS* (*p16*, *pRb*, *p53* и *p21*) у бенигним и малигним променама у дојци, уз одређивање њихових међусобних односа.
3. Анализа утицаја експресије маркера *OIS* на индекс пролиферације у бенигним и малигним променама семиквантитативном имунохистохемијском анализом експресије пролиферативног индекса *Ki67*.
4. Испитивање експресије маркера *OIS* у различитим молекулским подтипovima инвазивног карцинома дојке (луминални А и Б тип, *HER-2* позитивни и троструко негативни) уз одређивање могуће повезаности са имунофенотипским карактеристикама тумора, тј. експресијом рецептора за естрогене (*ER*), прогестерон (*PR*) и *HER-2*.
5. Испитивање повезаности експресесије маркера *OIS* са макроскопским и хистопатолошким карактеристикама карцинома дојке (величина тумора, нодални статус, хистолошки тип и градус, степен некрозе, дезмоплазије).

2.2. Основне хипотезе

1. Експресија маркера *OIS* (*p16*, *pRB*, *p53* и *p21*) је значајно већа у карциному дојке него у бенигним променама.
2. Имунофенотип молекулских подтипова карцинома дојке је у корелацији са експресијом маркера *OIS* (*p16*, *pRb*, *p53* и *p21*).
3. Пролиферативни индекс *Ki67* је у корелацији са експресијом маркера *OIS*.
4. Експресија маркера *OIS* (*p16*, *pRb*, *p53* и *p21*) је у корелацији са стадијумом болести и хистоморфолошким карактеристикама карцинома дојке.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Врста студије

Клиничко-експериментална, ретроспективна, неинтервентна студија у области изучавања фундаменталних патогенетских механизма болести коришћењем патохистолошког материјала из постојеће архиве, по дизајну - студија пресека.

3.2. Одобрење етичког комитета

Експериментални део студије је изведен на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Србија и у Служби за патолошкоанатомску дијагностику, Универзитетског Клиничког центра Крагујевац, Србија, у периоду од јула 2017. до октобра 2020. године. Спровођење студије на материјалу узетом од болесника одобрио је Етички комитет Универзитетског Клиничког центра Крагујевац, Србија, као клиничко-експерименталну, неинтервентну студију, која се спроводи искључиво у научноистраживачке сврхе, број 01/17/2290 од 14.06.2017. године. Протокол је спроведен у складу са важећом регулативом Добре клиничке праксе (енгл. *Good Clinical Practice, GCP*) и Хелсиншке декларације (енгл. *The World Medical Association, WMA, Declaration of Helsinki*).

3.3. Популација која се истражује

Истраживање је обухватило анализу ткивног материјала пацијенткиња оперисаних у УКЦ Крагујевац, у периоду од 2007. до 2010. године, просечне старости од 29 до 84 година, којима је дијагностикован и патохистолошки потврђен карцином дојке (енгл. *Invasive Breast Cancer, IBC*) или бенигна, неинвазивна лезија (енгл. *Non-Invasive Lesions, NIL*, у оквиру које смо сврстали: *in situ* лобуларни и дуктални карцином, *ISC*, лобуларну и дукталну атипичну хиперплазију, *АН* и нормалан епител дуктуса и ацинуса, *NE*). На основу микроскопске анализе *IBC* су класификовани у три групе: дуктални, лобуларни и група осталих хистолошких типова. Експресија *E-cadherina* је диференцирала дуктални од лобуларног карцинома дојке. Истовремено, дефинисани су сви значајни макроскопски, патохистолошки и прогностички параметри (величина тумора, хистолошки тип и градус, нодални статус, присуство некрозе, интра и перитуморски моноклеарни инфилтрат, перинеурална, лимфна и васкуларна инвазија, молекуларни подтип *IBC* и стадијум болести), према препорукама Светске здравствене организације (енгл. *World Health Organization, WHO*)(52). У складу са препорукама, *IBC* су према свом имунофенотипу класификовани у четири молекуларне групе: Луминални А - *Lum A (ER+ and/or PR+, HER2-, Ki67<15)*, Луминални Б - *Lum B (ER+ and/or PR+, HER2- and Ki67≥15 or HER2+ and Ki67<15)*, *HER2* позитивни - *HER2+ (ER- and PR-, HER2+)* и троструко негативни подтип [(енгл. *Triple-Negative Breast Cancer, TNBC (ER-, PR-, HER2-)*](371).

Клинички подаци су прикупљени увидом у историје болести и конзилијарне одлуке испитиваних пацијената.

Истраживање је укључило 147 пацијенткиња оболелих од карцинома дојке у експерименталној групи и 60 у контролној, са дијагнозом бенигне промене. Анализиран је ткивни материјал добијен након хируршког уклањања туморских промена и укалупљен у парафинске блокове. Као методе коришћене су стандардно Хематоксилин/Еозин (*H&E*) бојење препарата, за макромикроморфолошку анализу тумора и имунохистохемијски метод за анализу експресије маркера *OIS*.

3.4. Фиксација ткива и бојење хематоксилином и еозином (H&E)

У рутинској обради препарата, узорци ткива су фиксирани у 10% неутралном, пуферисаном раствору формалина, на собној температури, у току 24 часа. Након моделирања, ткивни узорци су стављени у одговарајуће касете које су монтиране у ткивни процесор (*Leica TP 1020, Leica Biosystems, Nussloch, Germany*). Затим су узорци у ткивном процесору дехидратисани потапањем кроз серију алкохола растуће концентрације, просветљавани у ксилолу и прожимани парафинским воском на следећи начин: два пута у 86%-тном етанолу у трајању од по 90 минута; два пута у 96%-тном етанолу у трајању од по 90 минута; три пута у апсолутном алкохолу у трајању од по 90 минута; три пута у ксилолу у трајању од по 90 минута и потопљени три пута у парафински восак чија је температура од 58-60°C у трајању од по 90 минута. Након тога, ткивни узорци су разливани и калуљени у парафинске блокове. Попречни серијски пресеци дебљине 5 µm сечени су на ротационом микротому (*Leica RM 2135, Leica Biosystems, Nussloch, Germany*), пласирани у водено купатило (*Leica HI 1210, Leica Biosystems, Nussloch, Germany*) на температури од 40°C до 45°C и на крају монтирани на плочице.

Након сушења у трајању од 30 минута уследило је бојење ткивних пресека, методом хематоксилин-еозин. Плочице са ткивним пресецима су загрејане у термостату на температури од 58°C у трајању од 60 минута. Рехидратација је постигнута потапањем ткивних пресека исечака у серију алкохола опадајућих концентрација и то следећим редом: 10 минута у апсолутном алкохолу, 10 минута у 96%-тном алкохолу, затим 1 минут у 86%-тном алкохолу, након чега су исечци испирани 5 минута у дестилованој води. Након испирања плочице са ткивним исечцима потопљене су 4 минута у Mayer-ов хематоксилин (*Hematoksilin M, HEMM-OT-1L, BioGnost S, Zagreb, Croatia*). Након тога су ткивни исечци испирани 1 минут у текућој води и бојени алкохолним еозином у трајању од 3 минута (*Eozin Y 1% vodeni, EOY-10-OT-1L, BioGnost, Zagreb, Croatia*). Потом је уследила дехидратација исечака потапањем у серију растућих концентрација алкохола: најпре 1 минут у 86%-тном алкохолу, затим 10 минута у 96%-тном алкохолу и на крају 10 минута у апсолутном алкохолу. Затим је уследио поступак просветљавања када су исечци потопљени 10 минута у мешавину ксилола и алкохола у односу 1:1, а затим два пута по 10 минута само у ксилолу. На овако обојене ткивне пресеке на крају смо наносили Канада балзам (*Canada balsam, Centrohem, Београд, Србија*) и прекрили их покровним стаклима. Овако припремљени ткивни исечци су анализирани светлосним микроскопом (x100, x200, x400).

3.5. Фотографисање ткивних пресека

Ткивни пресеци тумора дојке, бојени H&E методом, фотографисани су дигиталном камером (*Axiocam ICc1, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany*) појединачним фотографијама применом микроскопског увећања 200x и софтвера *AxioVision* (*AxioVision v.4.8.2.0, Carl Zeiss Microscopy GmbH, München, Germany*). Просветљивање фотографија је учињено непосредно након фотографисања и укључивала је примену опције *Automatic White Balance* која је калибрисана на основу референтних параметара произвођача. За потребе софтверске анализе коришћене су фотографије високе резолуције.

3.6. Имунохистохемија

3.6.1. Имунохистохемијски метод бојења ткивних исечака калуљених у парафину

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

Депарафинизација и рехидратација је обављена монтирањем ткивних пресека на плочице и провлачењем истих кроз серију алкохола опадајућих концентрација. Фиксација ткива у формалину, као и калуљење ткивних узорака у парафину изазивају конфигурацијске промене протеина и формирање интермолекулских веза које маскирају антигене и смањују ефекат имунохистохемијског бојења. Поступком ослобађања, обнавља се примарна конфигурација антигена уклањањем нежељених интермолекулских веза. Демаскирање антигена је извршено у микроталасној пећници (*Samsung MG23F301TAS, Seoul, South Korea*), у трајању од 20 минута, према препорукама произвођача примарних антитела, у 0,1 М цитратном пуферу (pH 6,0) или комерцијалним пуферским системима [*10mM EDTA Buffer for Heat-Induced Epitope Retrieval (pH 8), AP-9004-125, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA* или *Target Retrieval Solution, High pH (50x Tris/EDTA buffer, pH 9), K8014, Dako, Glostrup, Denmark*] на температури од 96°C. Након тога плочице са ткивним пресецима су испиране дестилованом водом у трајању од 5 минута. Како би елиминисали неспецифично бојење и блокирали ефекат ендогене пероксидазе плочице су постављене у кивете са 3% раствором водоник-пероксида (H_2O_2), у трајању од 10 минута. Након испирања дестилованом водом, плочице су пласиране у кивете са фосфатним пуфером (енгл. *Phosphate-Buffered Saline, PBS*). По сушењу плочица и „овичавању“ ткивних пресека посебном оловком за ту намену, плочице су постављене на носач у влажној комори. Ткивни пресеци су на собној температури инкубирани са 100-200 μl примарног антитела, у трајању од 20-60 минута, према препорукама произвођача за свако антитело. Примењена су следећа антитела, спремна за употребу или у одговарајућем разблажењу: *p16^{INK4a} antibody (CINtec Histology Kit, ROCHE, Germany)*, *mAb Retinoblastoma gene protein (13A10, 1:25, NCL-L-RB-358, NovocastraTM, UK)*, *mAb p21^{WAF1/CIP1} (SX118, 1:50, M7202, DAKO, Denmark)*, *mAb GLB1 (OTIIC9, 1:150, MA5-26152, INVITROGEN, USA)*, *mAb p53 protein (DO-7, ready to use, IR616, DAKO, Denmark)*, *mAb ER (1D5, ready to use, IR657, DAKO, Denmark)*, *mAb PR (PgR636, ready to use, IR068, DAKO, Denmark)*, *pAb HER2 (1:1200, AO485, DAKO, Denmark)*, *Ki67 (1:200, MIB-1, IR626, DAKO, Denmark)*. Као растварач примарних антитела коришћен је 0,1 М *PBS (pH 7,6)* или комерцијални растварач (*Antibody diluent, TA-125-ADQ, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*). Током бојења, анализирани су раније тестирани негативни и позитивни узорци ткива на примењена антитела. Након инкубације, плочице су, кроз три кивете, испиране у *PBS*-у, а затим је накапано секундарно антитело, дефинисано препорукама произвођача за свако примарно антитело (*UltraVision LP Large Volume Detection System: HRP Polymer (Ready-To-Use), TL-125-HL, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA* или *EnVision FLEX, High pH, k8000, Dako, Glostrup, Denmark*). Инкубација секундарним антителом у трајању од 30-60 минута је обављена на собној температури, према протоколу произвођача. Визуализација имунохистохемијске реакције је постигнута накапавањем хромогенског супстрата за детекцију пероксидазе из рена (енгл. *Horse-radish peroxidase, HRP*). Као хромаген накапан је *DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)*, а затим су ткивни пресеци инкубирани 5-10 минута. После испирања уследило је бојење са *Mayer*-овим хематоксилином. Ткивни пресеци су потом, као што је раније описано, дехидратисани у растућим концентрацијама алкохола, просветљени у ксилолу и прекривени покровним стаклом применом *Canada balsam*-а. Као негативне контроле имунохистохемијске

реакције су коришћени ткивни узорци код којих је изостављена инкубација примарним антителима, а као позитивне контроле су коришћени инвазивни тумори дојке са познатом експресијом анализираних маркера.

3.6.2. Очитавање имунохистохемијске експресије испитиваних маркера

Анализа експресије рецептора за естрогене (*ER*) и прогестерон (*PR*) је урађена применом *Allred skora* (372) као збир процента позитивних једара туморских ћелија и интензитета *IHC* бојења. Вредност *Allred score* се креће у опсегу од 0 до 8.

Експресија *HER2* је анализирана на основу стандардних препорука(373). У зависности од континуираности и интензитета мембранског бојења, све инвазивне карциноме дојке класификовали смо на *HER2* негативне (0 и 1+) и *HER2* позитивне (3+). Еквивокал *HER2* (2+) је ретестиран техником *SISH* (енгл. *silver in situ hybridization*) након чега су пацијенткиње сврставане у *HER2* позитивне или негативне инвазивне туморе.

IHC експресија *Ki67* је дефинисана као проценат позитивних туморских ћелија на 100 избројаних у зони највеће пролиферације тумора. Према раније дефинисаној граничној вредности *Ki67* експресије у нашој лабораторији, инвазивни карциноми су сврстани у 3 групе: ниска (*Ki67* <15%), умерена (*Ki67*: 15-30%) и висока пролиферативна активност (*Ki67* >30%)(371, 374, 375).

Експресија *p16* је одређивана очитавањем процентуалне једарне и/или цитоплазматске експресије у епителним ћелијама *IBC* и *NIL*, али и у стромалним фибробластима. Анализирањем експресије дефинисали смо *cut off* за *p16*. На основу добијеног резултата све инвазивне туморе смо поделили на *p16* позитивне (>17,5%) и *p16* негативне (≤17,5%). Истовремено, експресија *p16* је очитавана у фибробластима строме и класификована на: негативну (<10%), ниску (10% - 24%), умерену (25% - 50%), високу (>50% позитивних ћелија)(376). Присуство интра и перитуморског мононуклеарног инфилтрата дефинисано је као: одсутан (0%), низак (<30%), умерен (30% - 60%), висок (> 60%)(377).

Експресија *p53* је одређивана очитавањем процентуалне једарне експресије у епителним ћелијама *IBC* и *NIL*. Анализирањем експресије дефинисали смо *cut off* за *p53*. На основу добијеног резултата све инвазивне туморе смо поделили на *p53* позитивне (>4%) и *p53* негативне (≤4%).

Експресија *p21* је одређивана очитавањем процентуалне једарне експресије у епителним ћелијама *IBC* и *NIL*. Анализирањем експресије дефинисали смо *cut off* за *p21*. На основу добијеног резултата све инвазивне туморе смо поделили на *p21* позитивне (>7,5%) и *p21* негативне (≤7,5%).

Експресија *pRb* је одређивана очитавањем процентуалне једарне експресије у епителним ћелијама *IBC* и *NIL*. Анализирањем експресије дефинисали смо *cut off* за *pRb*. На основу добијеног резултата све инвазивне туморе смо поделили на *pRb* позитивне (>7,5%) и *pRb* негативне (≤7,5%).

Експресија *SA-β-GAL* одређена је применом *GLB1* антитела и очитавањем процентуалне цитоплазматске експресије у епителним ћелијама *IBC* и *NIL*. Анализирањем експресије дефинисали смо *cut off* за *GLB1*. На основу добијеног резултата све инвазивне туморе смо поделили на *GLB1* позитивне (>27,5%) и *GLB1* негативне (≤27,5%). Истовремено, експресија *GLB1* је очитавана у фибробластима строме и класификована на позитивне (≥1%) и негативне (без бојења).

3.7. Узорковање

Критеријуми за укључење пацијената у студију су патохистолошки верификоване бенигне и малигне промене у дојци.

Искључујући критеријуми за одабир испитаница су: непотпуни клинички подаци, пацијенткиње са мултиплим синхроним и метахроним туморима, примењена преоперативна хемиотерапија и/или радиотерапија.

3.8. Варијабле које се мере у студији

Независне варијабле: експресија маркера сенесценције у бенигим и малигним туморима дојке, испитивана имунохистохемијском анализом, а мерена семиквантитативним методом.

Зависне варијабле: имунофенотип малигнух ћелија карцинома дојке и пролиферативни индекс одређивани имунохистохемијском анализом и мерењем експресије *ER*, *PR*, *HER2* и *Ki67* семиквантитативним методом.

Збуњујуће варијабле:

- варијабле везане за личну и породичну анамнезу
- хистоморфолошке и клиничке карактеристике карцинома дојке

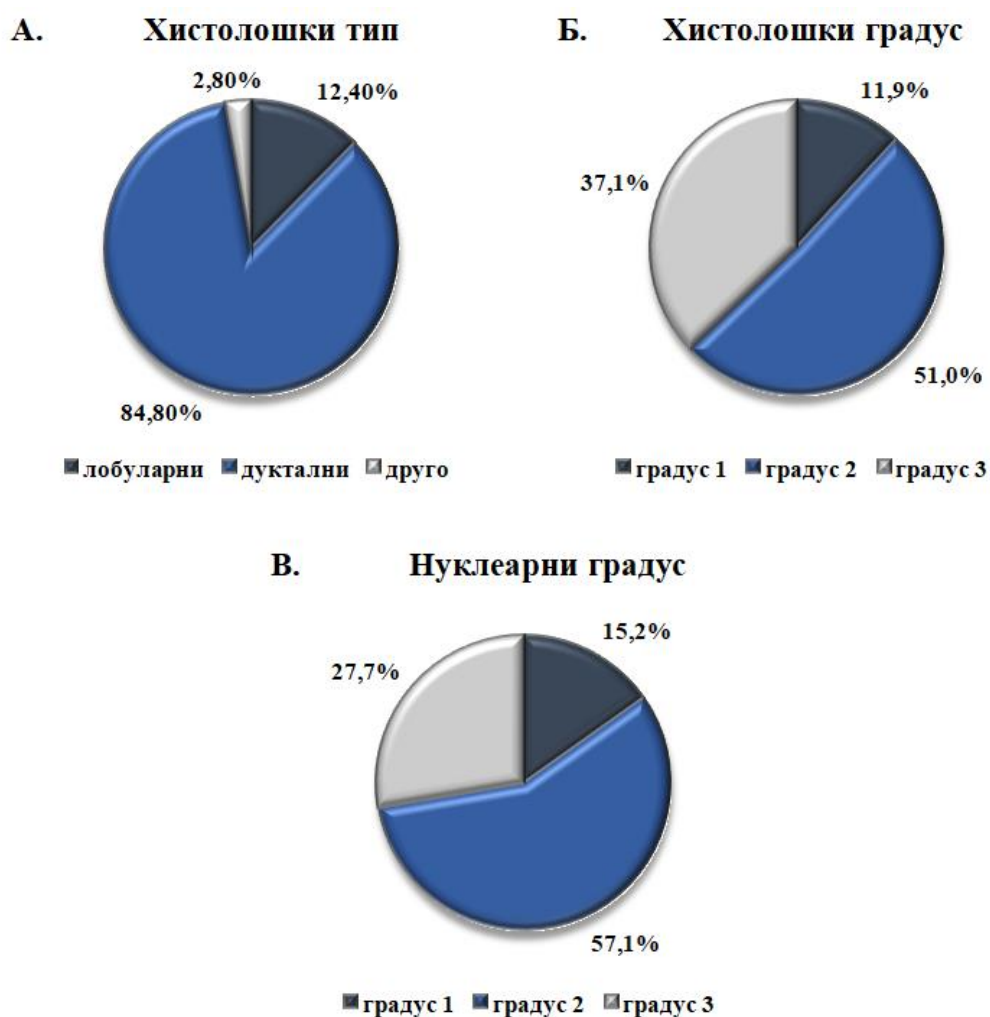
3.9. Статистичка обрада података

За статистичку обраду података добијених резултата коришћен је програмски пакет *SPSS* (верзија 22.0, *SRSS Inc., Chicago, IL*). С обзиром на број пацијената, нормалност расподеле података је испитивана употребом *Kolmogorov-Smirnov* теста. Дескриптивна статистика обухватала је приказивање категоријских обележја као апсолутне и релативне учесталости. За нумеричке варијабле представљана је средња вредност и стандардна девијација, или медијана и интерквartilни ранг у зависности од нормалности расподеле. За поређење две групе коришћен је независни *t* тест и *Mann-Whitney*-јев тест, док је код поређења више група коришћена *ANOVA* или *Kruskal-Wallis*-ов тест. За испитивање међусобне повезаности између категоријских варијабли коришћен је χ^2 тест независности, док се повезаност између нумеричких варијабли утврђивала *Pirson*-овим или *Spearman*-овим коефицијентом корелације. Коришћењем *ROC (Receiver operating characteristic curve)* криве анализирана је могућност променљивих да буду маркери прогресије карцинома дојке уз одређивање *cut off* вредности, сензитивности и специфичност. Подаци су приказани у графичком и табеларном облику. Праг значајности (α) за сва статистичка израчунавања био је 0,05.

4. РЕЗУЛТАТИ

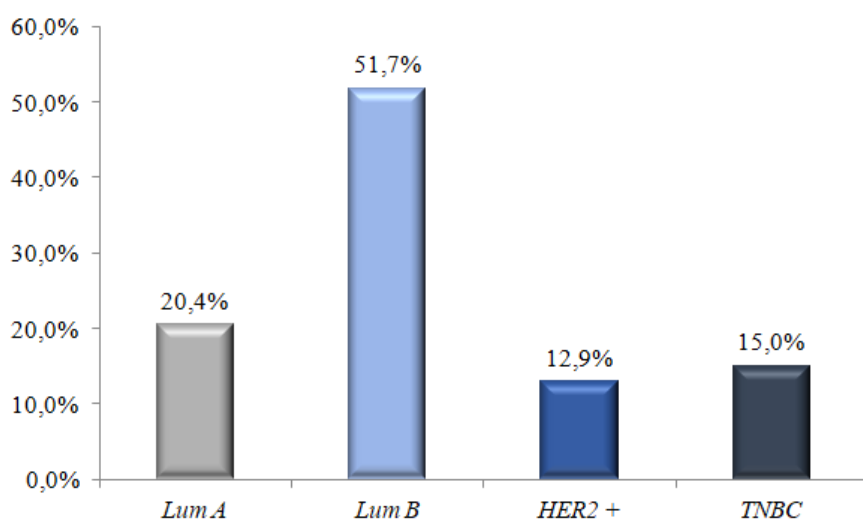
4.1. Опште карактеристике

У експерименталну групу истраживања укључено је 147 жена са дијагностикованим инвазивним карциномом дојке, просечне старости 58 година при чеми је најмлађа пацијенткиња имала 29, а најстарија 84 године. Истовремено код 79 пацијенткиња је био присутан *in situ* карцином (*ISC*), код 82 атипична хиперплазија (*AH*), а у 109 случајева су нотирана поља жлезданог паренхима без знакова пролиферације и атипичности епитела (*NE* - нормалан епител дуктуса и ацинуса). Контролну групу је чинило 60 бенигну промена. Дистрибуција хистолошког типа, хистолошког градуса и нуклеарног градуса код пацијенткиња представљени су на Фигури 1.



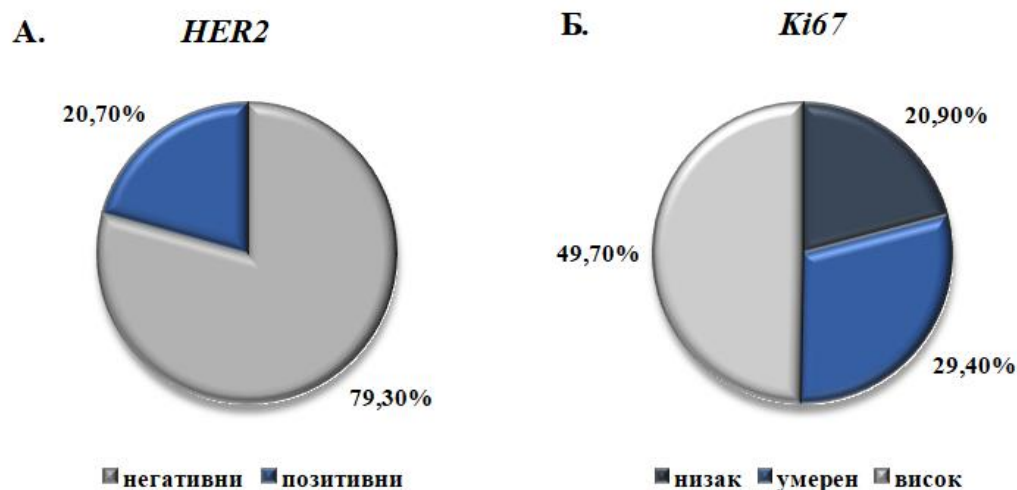
Фигура 1. Учесталост *ISC* у односу на хистолошки тип, хистолошки и нуклеарни градус. А. У односу на хистолошки тип сви *ISC* су подељени на лобуларни (n=18), дуктални (n=123) и друго (n=4), у односу на Б. хистолошки градус на градус 1 (n=17), градус 2 (n=73) и градус 3 (n=53), као и односу на В. нуклеарни градус: градус 1 (n=17), градус 2 (n=64) и градус 3 (n=31). Резултат је представљен као процентуална учесталост у односу на укупан број (n=147).

У односу на молекуларни подтип, учесталост *IBC* приказана је на Фигури 2.



Фигура 2. Учесталост *IBC* у односу на молекуларни подтип. Сви *IBC* су груписани у четири молекуларна подтипа: *Lum A* (n=30), *Lum B* (n=76), *HER2+* (n=19) и *TNBC* (n=22). Резултат је представљен као процентуална учесталост у односу на укупан број (n=147).

Учесталост *IBC* у односу на експресију *HER2* и експресију пролиферативног индекса *Ki67* приказана је на Фигури 3.



Фигура 3. Учесталост *IBC* у односу на експресију *HER2* и експресију *Ki67*. Сви *IBC* су класификовани на **А.** *HER2* негативне (n=115) и *HER2* позитивне (n=30), а на основу **Б.** експресије *Ki67* на мању од 15% - низак (n=30), 15-30% - умерен (n=42) и преко 30% - висок (n=70). Резултат је представљен као процентуална учесталост у односу на укупан број (n=147).

Просечна величина карцинома је била 22,5mm (најмањи 9mm а највећи 68mm). Просечна експресија рецептора за естрогене износи 54,27±35,48% док је просек експресије рецептора за прогестерон 34,49±34,43. Представљено кроз *Allred* скор, просечна вредност скорa за естрогене је била 5,36±3,17 а за прогестерон 3,92±3,21. Остале клиничко-патолошке карактеристике *IBC* приказане су у Табели 1.

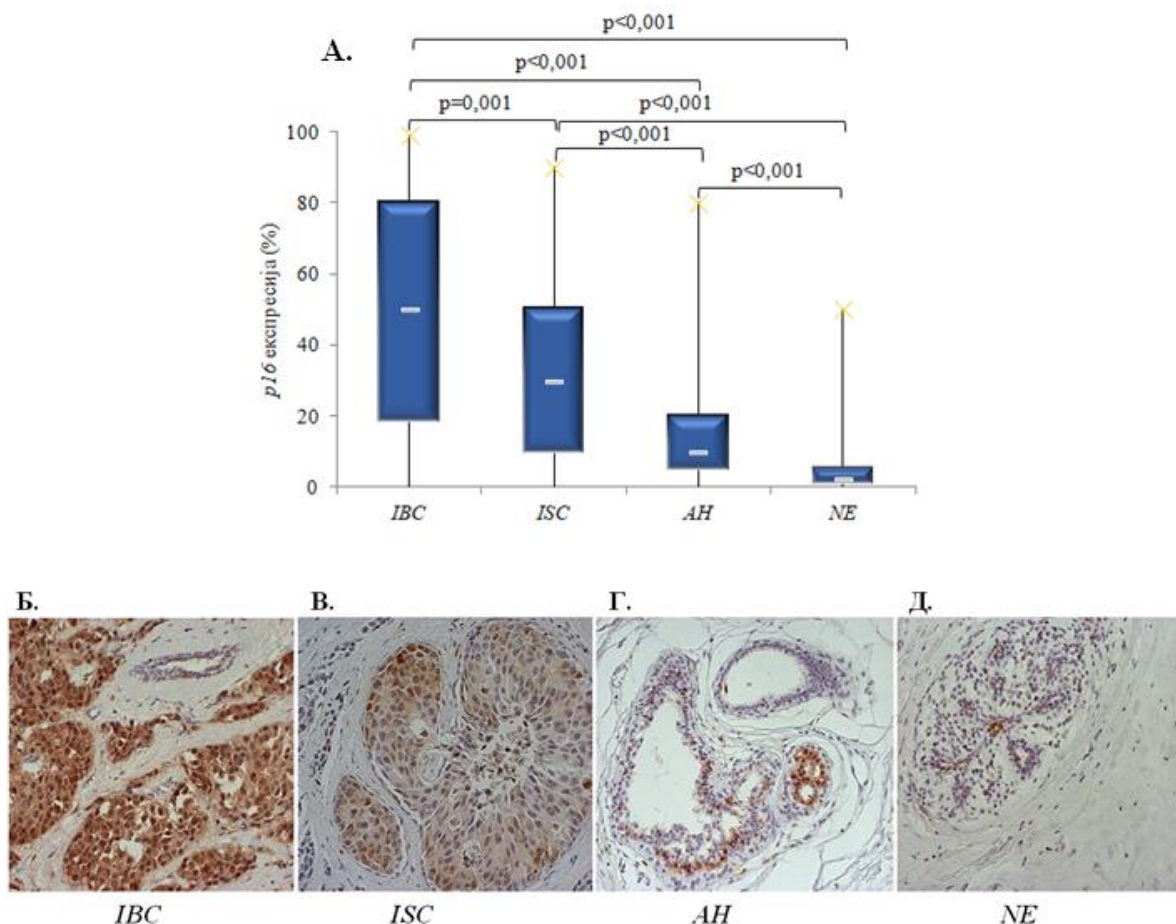
Табела 1. Клиничко-патолошке карактеристике свих *IBC*

Клиничко-патолошке карактеристике		N	%
Локализација	лева дојка	66	44,9
	десна дојка	81	55,1
Некроза тумора	одсутна	26	21,7
	присутна	94	78,3
Перинеурална инвазија	одсутна	101	68,7
	присутна	46	31,3
Лимфна инвазија	одсутна	72	48,9
	присутна	75	51,1
Васкуларна инвазија	одсутна	113	76,9
	присутна	34	23,1
T статус	T1	48	35,8
	T2	64	47,8
	T3	9	6,7
	T4	13	9,7
N статус	N0	50	37,3
	N1	48	35,8
	N2	19	14,2
	N3	17	12,7
Дезмоплазија	лакостепена	17	16,3
	умерена	55	52,9
	изражена	32	30,8
Перидуктална еластоza	лакостепена	19	20,0
	умерена	20	44,4
	изражена	16	35,6
Митотски индекс	градус 1	19	42,2
	градус 2	20	44,4
	градус 3	6	13,3

4.2. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ *p16*

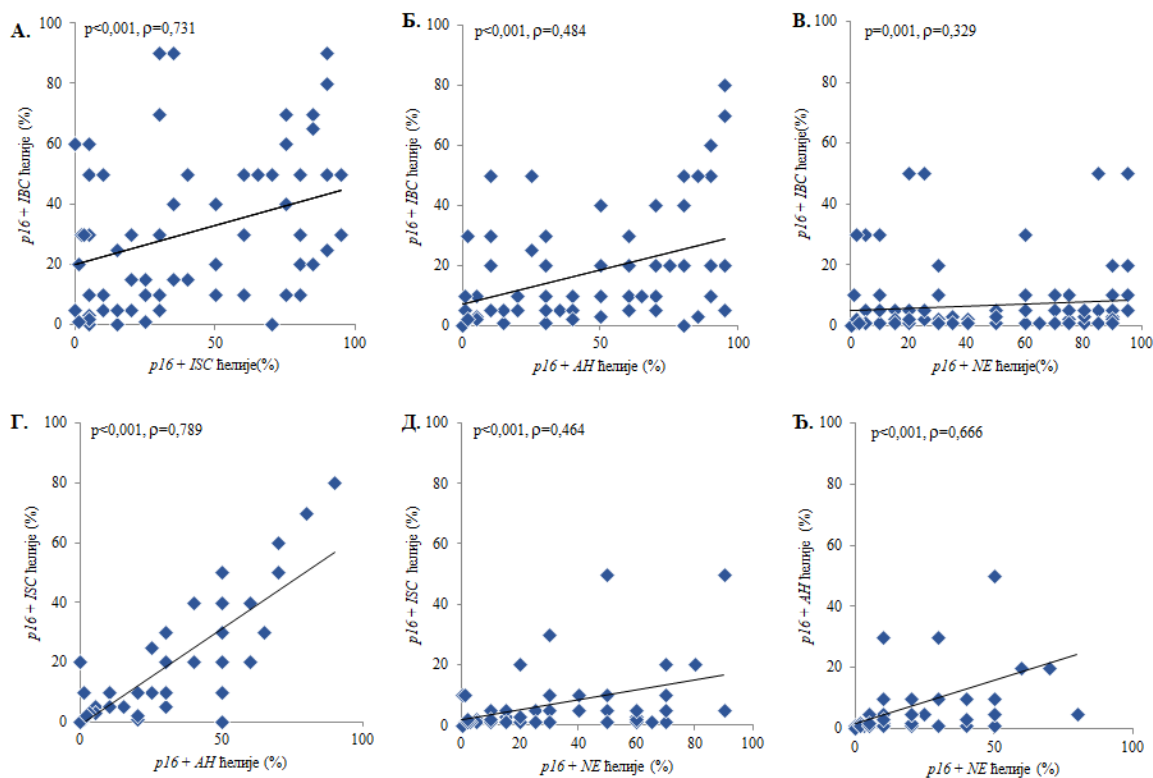
4.2.1. Експресије *p16* у односу на цитолошке промене у епителу

Просечна вредност експресије *p16* се значајно разликује међу групама у односу на цитолошке промене у епителу (*Kruskal-Wallis*, $p < 0,001$). Експресија статистички значајно расте од *NE*, преко *AH* и *ISC* до *IBC*. Просечна вредност износи у *NE* 2,5%, у *AH* 10%, у *ISC* 30%, и у *IBC* 50% (Фигура 4А). На Фигури 4Б-Д приказана је имунохистохемијска експресија *p16* у различитим хисто и цитоморфолошким променама.



Фигура 4. Експресија *p16* у односу на цитолошке промене у епителу. **А.** Статистички значајна разлика је уочена између сваке од наведених група (*Mann Whitney U*, $p < 0,001$). Резултат је приказан као медијана. Микроскопска слика експресије *p16* у различитим хисто и цитоморфолошким променама: **Б.** *IBC*. **В.** *ISC*. **Г.** *AH*. **Д.** *NE* (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x).

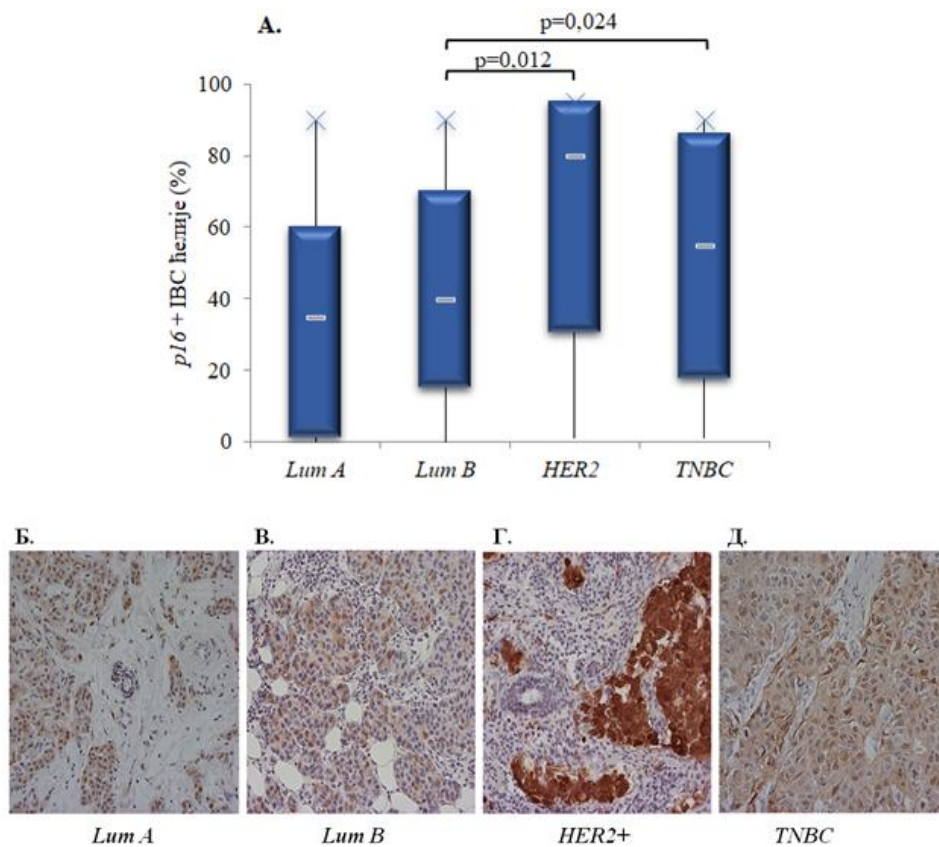
Утврђена је позитивна корелација (*Spearman ρ*) између *p16* експресије у свим наведеним променама односно експресија *p16* у ћелијама *IBC* расте са порастом експресије истог маркера у ћелијама *NIL* (Фигура 5).



Фигура 5. Корелација експресије *p16* између група у односу на цитолошке промене у епителу (*Spearman* ρ). Између А. *IBC* и *ISC* ($p < 0,001$, $\rho = 0,731$), Г. *ISC* и *AH* ($p < 0,001$, $\rho = 0,789$) и Ђ. *AH* и *NE* ($p < 0,001$, $\rho = 0,666$) утврђена је јака позитивна корелација, док је између Б. *IBC* и *AH* ($p < 0,001$, $\rho = 0,484$), В. *IBC* и *NE* ($p < 0,001$, $\rho = 0,329$) и Д. *ISC* и *NE* ($p < 0,001$, $\rho = 0,464$) утврђена умерена позитивна корелација.

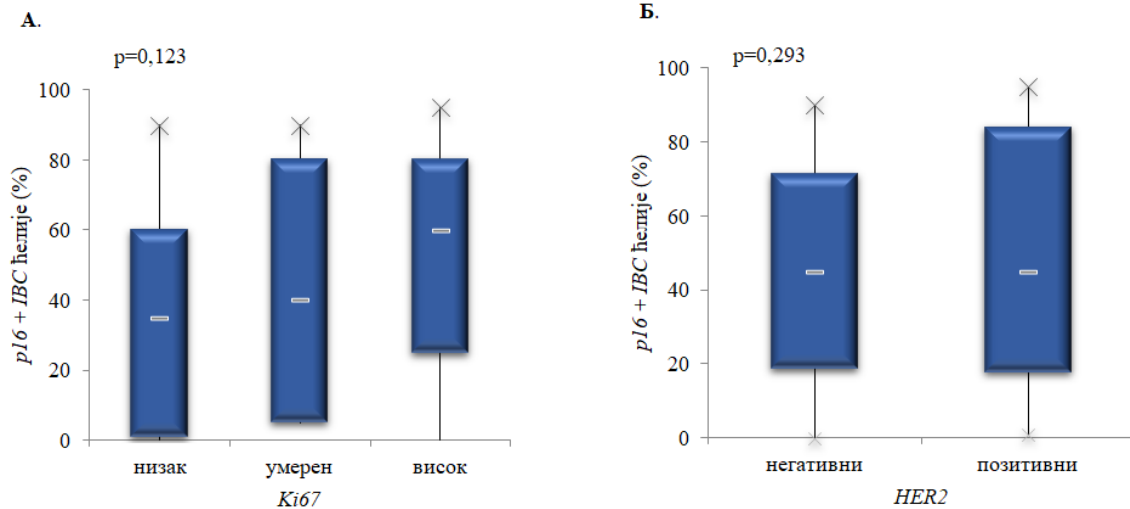
4.2.2. Експресије *p16* у туморским ћелијама у односу на молекуларни подтип *IBC*

Постоји значајна разлика у експресији *p16* између различитих молекуларних подтипова *IBC* (*Kruskal-Wallis*, $p = 0,025$). Највећа *p16* експресија је присутна код *HER2+* подтипа *IBC* (Фигура 6А). Имунохистохемијска експресија *p16* у различитим молекуларним подтипovima приказана је на Фигури 6Б-Д.



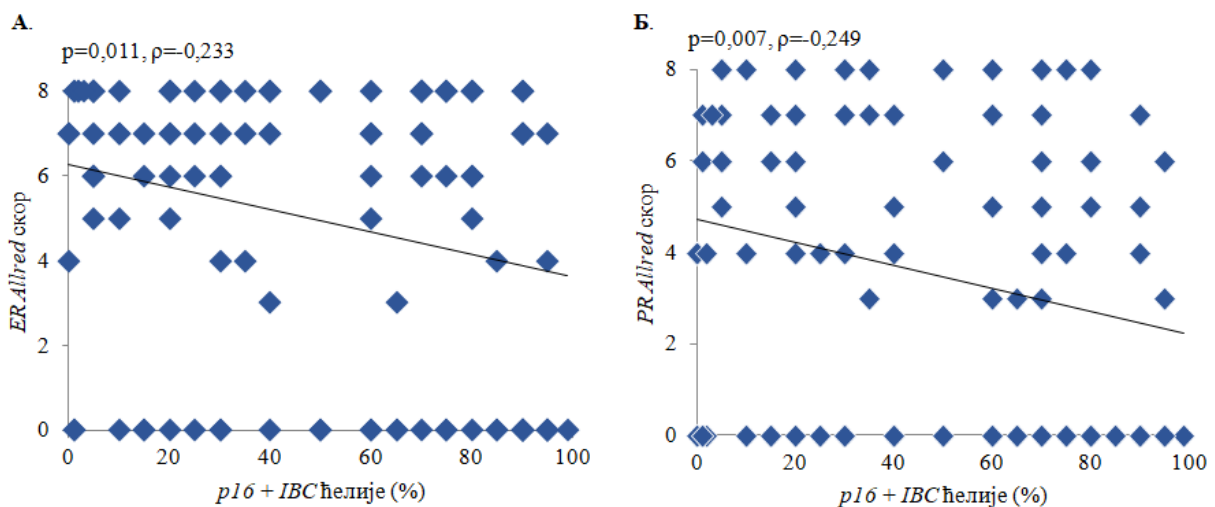
Фигура 6. Експресија *p16* у различитим молекуларним подтипovima карцинома дојке. **А.** Постоји статистички значајна разлика између група *Lum B* и *HER2+* (*Mann-Whitney U*, $p=0,012$) као и између група *Lum B* и *TNBC* (*Mann-Whitney U*, $p=0,024$). Резултат је приказан као медијана. Микроскопска слика експресија *p16* у молекуларним субтипovima *IBC* - **Б.** *Lum A*. **В.** *Lum B*. **Г.** *HER2+*. **Д.** *TNBC* (имунихистохемијска анализа, оригинално увећање 200x).

Не постоји статистички значајна разлика у експресији *p16* у зависности од експресија *HER2*, као ни између експресије *p16* и пролиферативног индекса *Ki67* (Фигура 7).



Фигура 7. Експресија *p16* у зависности од експресије А. *Ki67* и експресије Б. *HER2*. Експресија *p16* у туморским ћелијама не зависи од експресије *Ki67*. Резултат је приказан као медијана (*Kruskal-Wallis*, $p=0,123$). Нема статистички значајне разлике у експресији *p16* у зависности од експресије *HER2*. Резултат је приказан као медијана (*Mann Whitney U*, $p=0,293$).

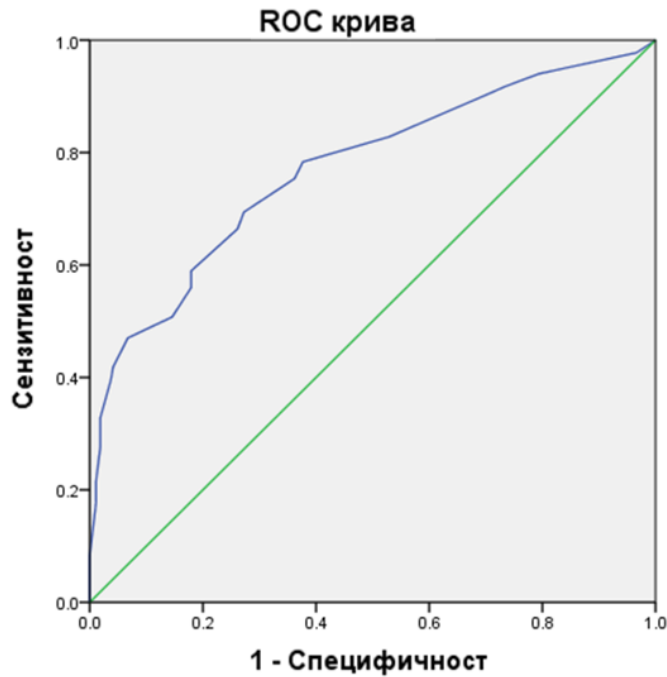
Међутим, са порастом експресије *p16* у туморским ћелијама статистички значајно опада експресија рецептора за естрогене и прогестерон (*Spearman ρ*) (Фигура 8).



Фигура 8. Експресија *p16* у зависности од експресије *ER* и *PR*. Експресија *ER* и *PR* анализирана је кроз *Allred* скор. Пораст експресије *p16* у туморским ћелијама је праћена статистички значајно смањеном експресијом А. *ER* ($p=0,011$, $\rho=-0,233$) и Б. *PR* ($p=0,007$, $\rho=-0,249$) (слаба негативна корелација).

4.2.3. Експресија *p16* као маркер прогресије карцинома дојке

Као што је приказано на слици, добијена *ROC* (*Receiver operating characteristic*) крива, указује да повећана експресија *p16* може бити поуздан маркер прогресије *IBC* ($AUC=0,770$; $p<0,001$).



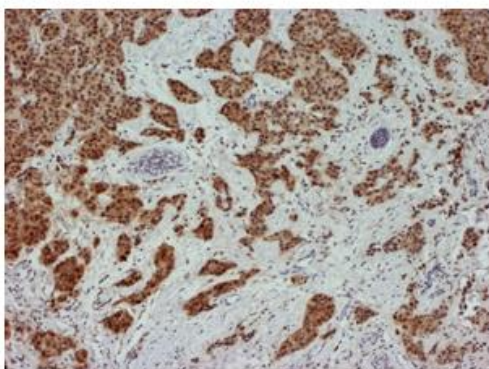
Фигура 9. ROC крива експресије *p16* у *NIL* и *IBC*. Израчуната вредност $AUC=0,770$ уз сензитивност 75,4% и специфичност 63,8% одређена је гранична вредност од 17,5%.

Резултати показују да гранична вредност од 17,5% *p16* позитивних туморских ћелија омогућава јасно раздвајање пацијенткиња са *NIL* од пацијенткиња са *IBC* (сензитивност 0,754, специфичност 0,638). Статистичка анализа је потврдила да повећана експресија *p16* указује на малигну трансформацију епителних ћелија ткива дојке. За анализу повезаности експресије *p16* са параметрима који указују на прогресију тумора, применили смо граничне вредности нашег израчунавања и *IBC* су подељени на групу са негативном ($\leq 17,5\%$) и позитивном *p16* експресијом ($> 17,5\%$) при чему је учесталост *IBC* у односу на граничну вредност представљена на Фигури 10А. Такође, на Фигури 10Б-В приказана је имунохистохемијска експресија *p16* у односу на израчунату граничну вредност.

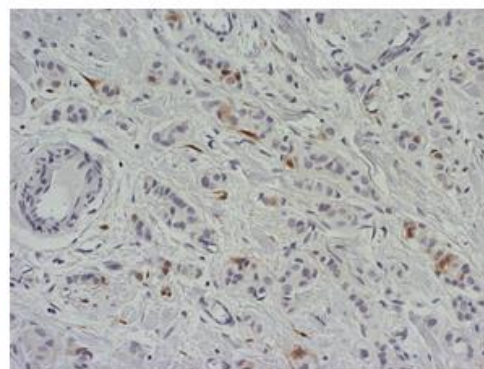
A. *p16* cut off 17,5 %



Б.



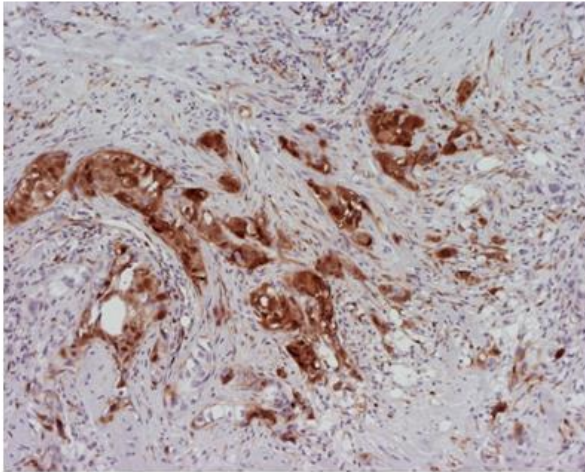
В.



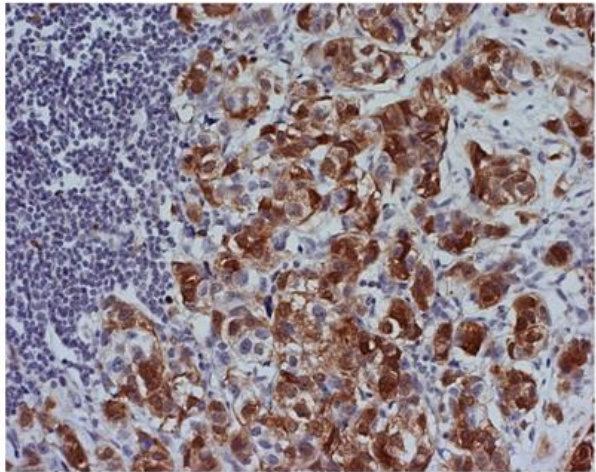
Фигура 10. А. Учесталост *p16*+ и *p16*- *IBC* у односу на граничну вредност експресије *p16*. Микроскопска слика експресије *p16* у односу на граничну вредност: **Б. *p16*+ и **В.** *p16*- (имунихистохемијска анализа, оригинално увећање 200x).**

Даље, анализа је показала да је у групи *p16* позитивних *IBC* забележена повећана експресија *p16* у стромалним фибробластима, и повећана заступљеност стромалног мононуклеарног инфилтрата (Фигура 11).

А.



Б.



Фигура 11. А. прекомерна експресија *p16* у фибробластима строме и Б. богат стромални мононуклеарни инфилтрат у *p16* позитивним *IBC* (имунихистохемијска анализа, оригинално увећање 200х).

Такође, постоји повезаност између *p16* позитивних *IBC* и испитиваних клиничко-патолошких карактеристика (Табела 2).

Табела 2. Повезаност експресије *p16* у *IBC* и испитиваних клиничко-патолошких карактеристика.

Клиничко-патолошке карактеристике		<i>p16 cut off 17,5%</i>		Chi-Square	<i>p</i>
		-	+		
Стромални мононуклеарни инфилтрат	одсутан	2 (10,0%)	2 (2,7%)	7,959	0,047
	низак	13 (65,0%)	30 (41,1%)		
	умерен	5 (25,0%)	30 (41,1%)		
	висок	0 (0,0%)	11 (15,1%)		
Стромални фибробласти	одсутан	2 (9,1%)	2 (3,2%)	8,120	0,044
	низак	7 (31,8%)	32 (50,8%)		
	умерен	3 (13,6%)	17 (27,0%)		
	висок	10 (45,5%)	12 (19,0%)		
Хистолошки тип	лобуларни	4 (13,8%)	6 (6,7%)	1,410	0,494
	дуктални	24 (82,8%)	80 (89,9%)		
	остало	1 (3,4%)	3 (3,4%)		
Хистолошки градус	градус 1	2 (8,3%)	8 (10,5%)	2,709	0,258
	градус 2	15 (62,5%)	33 (43,4%)		
	градус 3	7 (29,2%)	35 (46,1%)		
Нуклеарни градус	градус 1	1 (4,8%)	11 (14,8%)	2,468	0,291
	градус 2	15 (71,4%)	40 (54,1%)		
	градус 3	5 (23,8%)	23 (31,1%)		
Некроза тумора	одсутна	6 (23,1%)	20 (21,3%)	0,000	1,000
	присутна	20 (76,9%)	74 (78,7%)		
Перинеурална инвазија	одсутна	18 (60,0%)	65 (72,2%)	1,055	0,304
	присутна	12 (40,0%)	25 (27,8%)		
Лимфна инвазија	одсутна	10 (33,3%)	45 (50,0%)	1,891	0,169
	присутна	20 (66,7%)	45 (50,0%)		
Васкуларна инвазија	одсутна	23 (76,7%)	66 (73,3%)	0,014	0,904
	присутна	7 (23,3%)	24 (26,7%)		
Молекуларни подтип <i>IBC</i>	<i>Lum A</i>	4 (14,3%)	11 (13,8%)	3,029	0,387
	<i>Lum B</i>	19 (67,9%)	41 (51,2%)		
	<i>HER2 +</i>	2 (7,1%)	11 (13,8%)		
	<i>TNBC</i>	3 (10,7%)	17 (21,2%)		
<i>HER2</i>	негативни	24 (82,8%)	67 (75,3%)	0,334	0,563
	позитивни	5 (17,2%)	22 (24,7%)		
<i>Ki67</i>	низак	4 (16,7%)	11 (15,3%)	7,217	0,027
	умерен	11 (45,8%)	14 (19,4%)		
	висок	9 (37,5%)	47 (65,3%)		
<i>T</i> статус	<i>T1</i>	6 (22,2%)	30 (37,0%)	3,802	0,284
	<i>T2</i>	14 (51,9%)	40 (49,4%)		
	<i>T3</i>	3 (11,1%)	3 (3,7%)		
	<i>T4</i>	4 (14,8%)	8 (9,9%)		
<i>N</i> статус	<i>N0</i>	6 (33,3%)	24 (40,7%)	0,959	0,811
	<i>N1</i>	9 (50,0%)	22 (37,3%)		
	<i>N2</i>	2 (11,1%)	8 (13,6%)		
	<i>N3</i>	1 (5,6%)	5 (8,4%)		

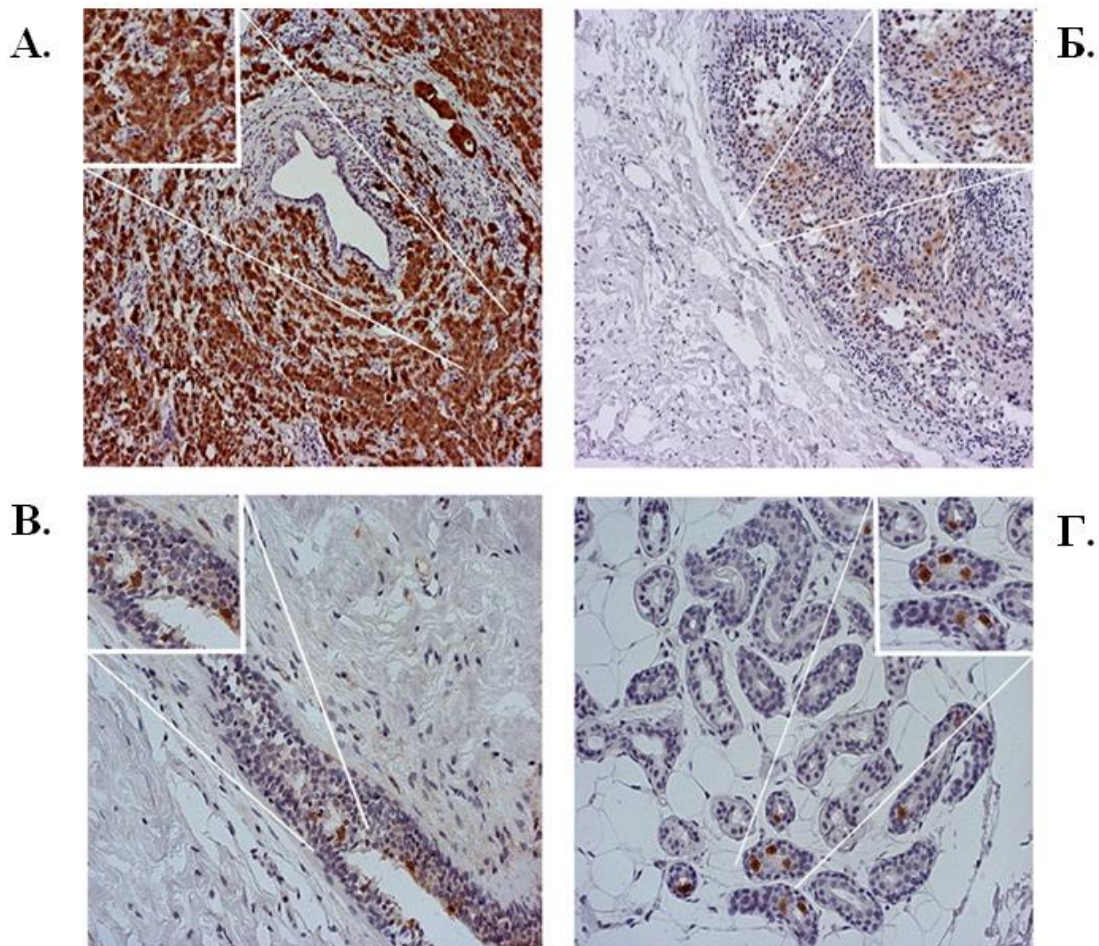
4.2.4. Субцелуларна локализација експресије *p16* протеина и инвазивност тумора

Цитоплазматска експресија *p16* може да укаже на прогрессију тумора, насупротив нуклеарном бојењу које је карактеристично за већину неинвазивних промена (Табела 3).

Табела 3. Учесталост експресије *p16* у различитим субцелуларним локализацијама епителних ћелија *NIL* и *IBC*

<i>p16</i> нуклеарна/цитоплазматска експресија				
	<i>p16 IBC</i> n (%)	<i>p16 ISC</i> n (%)	<i>p16 AH</i> n (%)	<i>p16 NE</i> n (%)
Негативно	3 (2,3)	3 (3,8)	3 (3,7)	3 (2,8)
Нуклеарно	28 (21,1)	20 (25,6)	38 (46,3)	99 (90,8)
Цитоплазматско	102 (76,6)	55 (70,6)	41 (50,0)	7 (6,4)
Укупно	133 (100)	78 (100)	82 (100)	109 (100)

Доминантна нуклеарна експресија *p16* присутна је у *NE* и *AH*, за разлику од цитоплазматске експресије у *ISC* и *IBC* где је била највиша (Фигура 12).



Фигура 12. Субцелуларна локализација *p16* експресије. А. *IBC* - доминантно цитоплазматско бојење. Б. *ISC* - доминантно цитоплазматско бојење, са појединачним нуклеарним бојењем. В. *AH* - доминантно нуклеарно бојење и појединачно цитоплазматско бојење. Г. *NE* - нуклеарно бојење (имунихистохемијска анализа, оригинално увећање 200x).

Процентуална заступљеност тумора са цитоплазматском експресијом *p16* је била значајно већа у групи тумора са присутном некрозом и израженом моноклеарном инфилтрацијом. Поред тога у истој групи тумора пронађен је већи степен *p16* позитивних фибробласта иако разлика није статистички значајна (Табела 4). Даље, субцелуларна локализација *p16* није повезана са другим клиничко-патолошким параметрима.

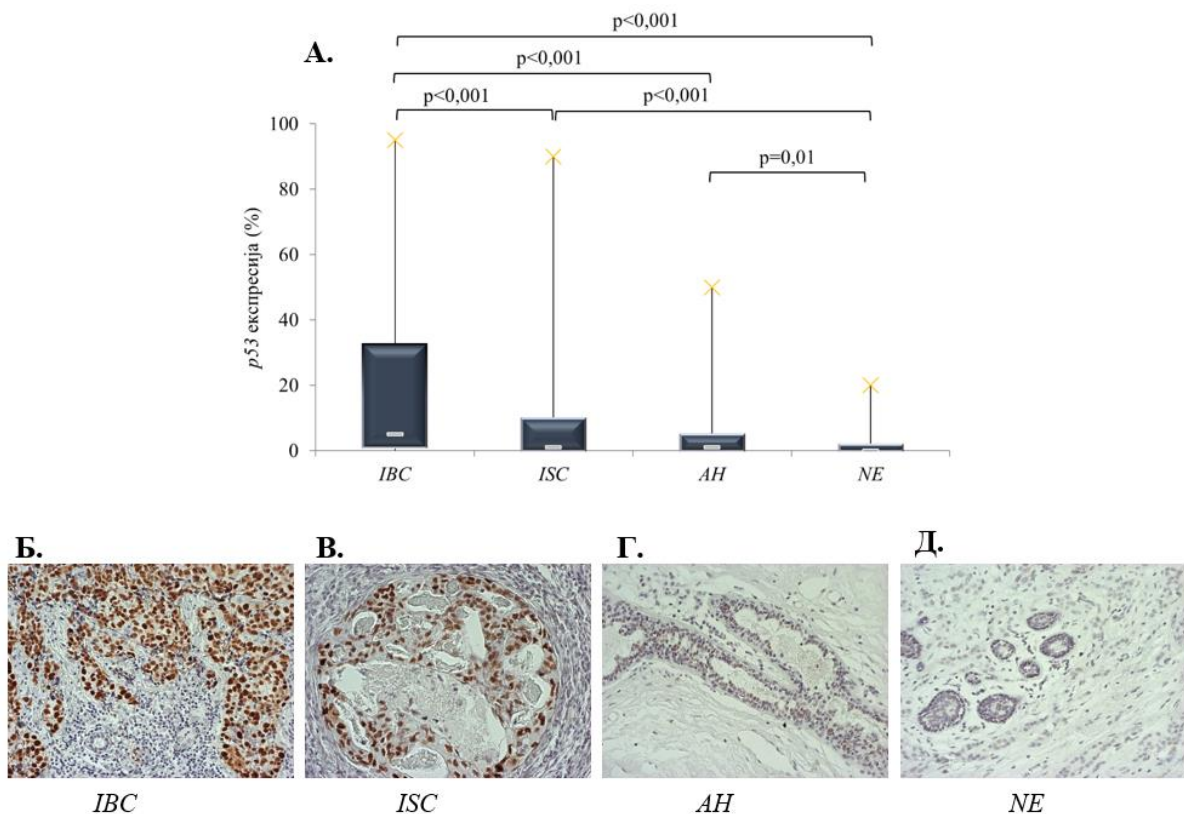
Табела 4. Повезаност субцелуларне локализације *p16* протеина са клиничко-патолошким карактеристикама *IBC*.

Клиничко-патолошке карактеристике	<i>p16</i> експресија у <i>IBC</i>		Chi-Square	<i>p</i>	
	нуклеарна	цитоплазматска			
Стромални моноклеарни инфилтрат	одсутан	1 (5,0%)	2 (2,9%)	16,236	0,013
	низак	14 (70,0%)	26 (37,7%)		
	умерен	5 (25,0%)	30 (43,5%)		
	висок	0 (0,0%)	11 (15,9%)		
Стромални фибробласти	одсутан	1 (5,0%)	2 (3,2%)	11,638	0,071
	низак	8 (40,0%)	31 (50,0%)		
	умерен	6 (30,0%)	13 (21,0%)		
	висок	5 (25,0%)	16 (25,8%)		
Некроза тумора	одсутна	7 (58,3%)	19 (17,6%)	6,609	0,037
	присутна	5 (41,7%)	89 (82,4%)		

4.3. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ *p53*

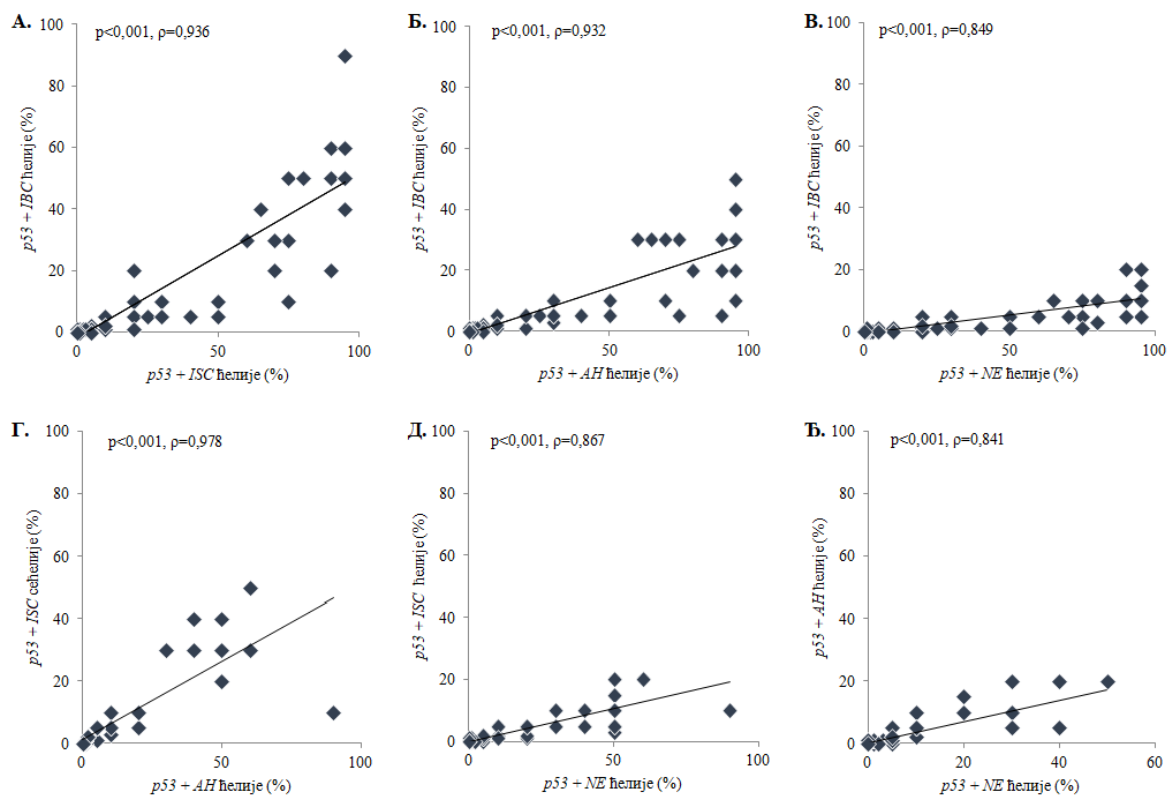
4.3.1. Експресија *p53* у односу на цитолошке промене у епителу

Просечна вредност експресије *p53* расте од *NE* ка *IBC* при чему у *NE* износи 2,5%, у *АН* 6%, у *ISC* 11% и у *IBC* 24%. Разлика између свих наведених група је била статистички значајна (*Kruskal-Wallis*, $p < 0,001$). Такође, потврђена је статистички значајна разлика између сваке групе појединачно, при чему је она изостала једино између групе *ISC* и *АН* ($p = 0,362$) (Фигура 13А). На Фигури 13Б-Д приказана је имунохистохемијска експресија *p53* у различитим хисто и цитоморфолошким променама.



Фигура 13. Експресија *p53* у односу на цитолошке промене у епителу. **А.** Статистички значајна разлика је уочена између сваке од наведених група осим између групе *ISC* и *AH* (*Mann Whitney U*, $p=0,362$). Резултат је приказан као медијана. Микроскопска слика експресије *p53* у различитим хисто и цитоморфолошким променама: **Б.** *IBC*. **В.** *ISC*. **Г.** *AH*. **Д.** *NE* (имунихистохемијска анализа, оригинално увећање 200x).

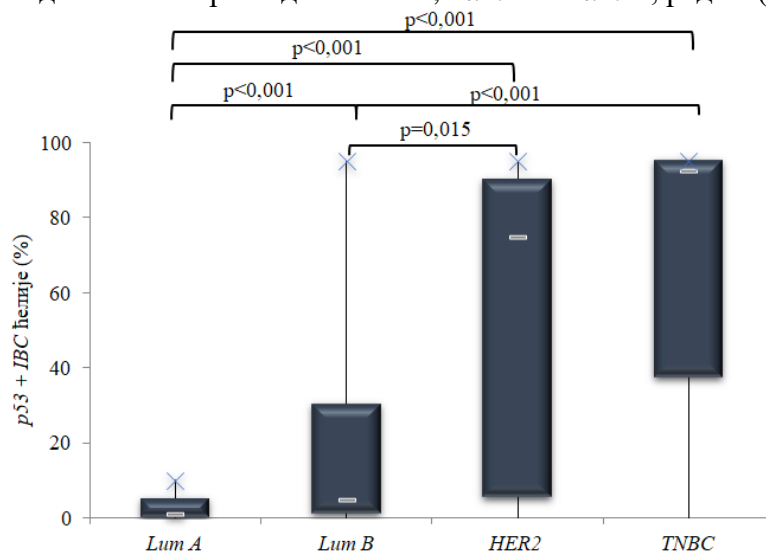
Утврђена је јака позитивна корелацију између *p53* експресије у свим наведеним променама (*Spearman ρ*). Повећање експресије *p53* у *IBC* је праћено повећањем у свим осталим променама. Такође, повећање експресије *p53* у *ISC* је праћено повећањем у *AH* и *NE*. Са повећањем експресије у *AH* расте и експресија у *NE* (Фигура 14).



Фигура 14. Корелација експресије *p53* између група у односу на цитолошке промене у епителу (*Spearman rho*). Између свих група је утврђена јака позитивна корелација: **А.** *IBC* и *ISC* ($p < 0,001$, $\rho = 0,936$), **Б.** *IBC* и *AH* ($p < 0,001$, $\rho = 0,932$), **В.** *IBC* и *NE* ($p < 0,001$, $\rho = 0,849$), **Г.** *ISC* и *AH* ($p < 0,001$, $\rho = 0,978$), **Д.** *ISC* и *NE* ($p < 0,001$, $\rho = 0,867$) и **Б.** *AH* и *NE* ($p < 0,001$, $\rho = 0,841$).

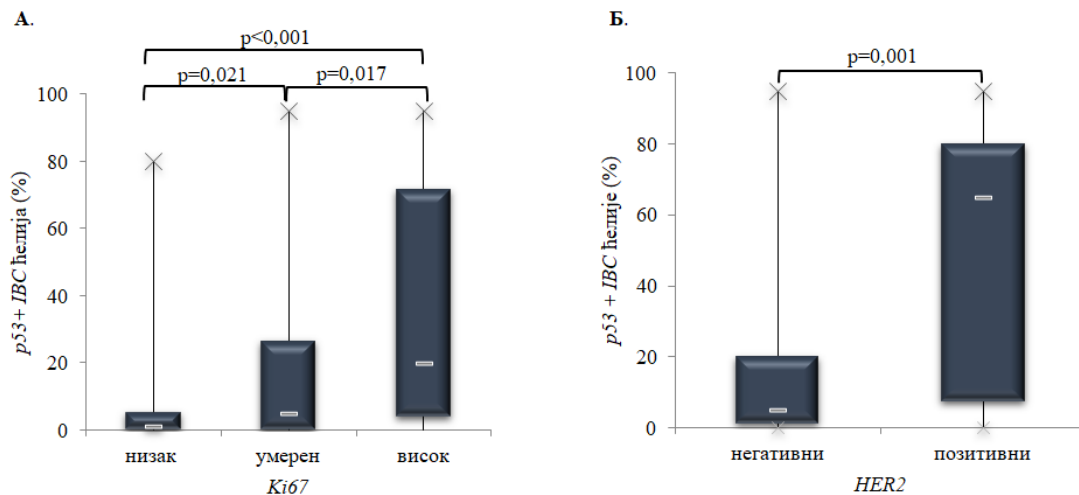
4.3.2. Експресија *p53* у туморским ћелијама у односу на молекуларни подтип *IBC*

Експресија *p53* се значајно разликује у односу на 4 молекуларна подтипа *IBC* (*Kruskal-Wallis*, $p < 0,001$). Између сваке од наведених група је детектована статистички значајна разлика (*Mann-Whitney U*). Највећа експресија је показана код *TNBC* подтипа, при чему значајно опада када се посматра подтип *HER2*, *Lum B* и *Lum A*, редом (Фигура 15).



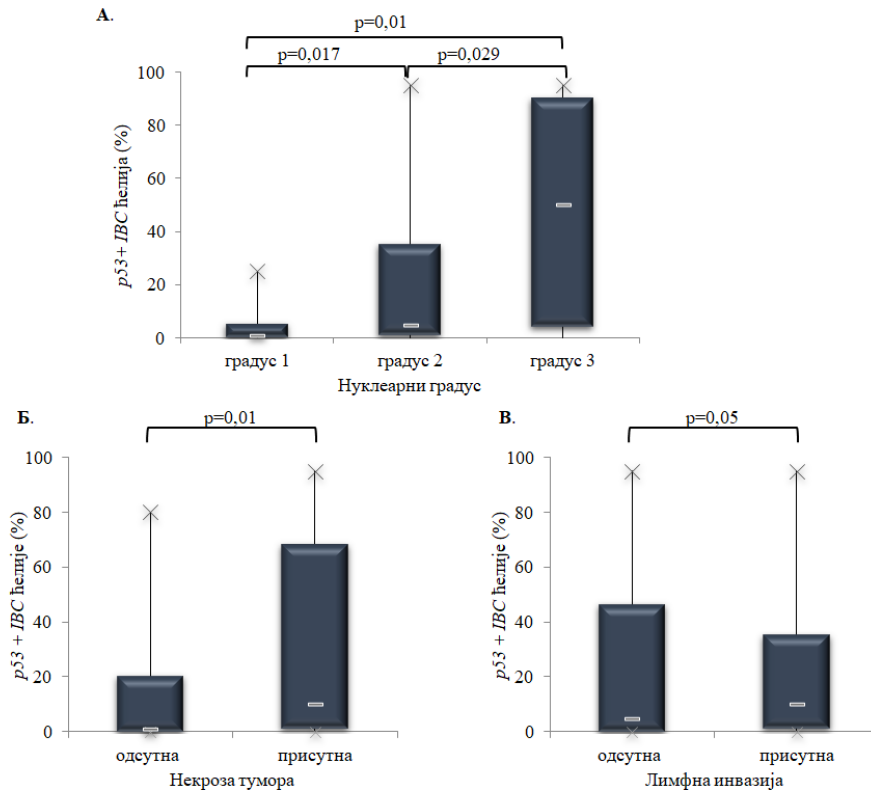
Фигура 15. Експресија *p53* у различитим молекуларним подтипима *IBC*. Статистички значајна разлика је показана између свих испитиваних група (*Mann-Whitney U*). Резултат је представљен као медијана.

У односу на експресију *HER2* и експресију пролиферативног индекса *Ki67*, значајно веће вредности експресије *p53* су уочене код оних *IBC* који су *HER2* позитивни и код оних који су имали високу експресију *Ki67* (Фигура 16).



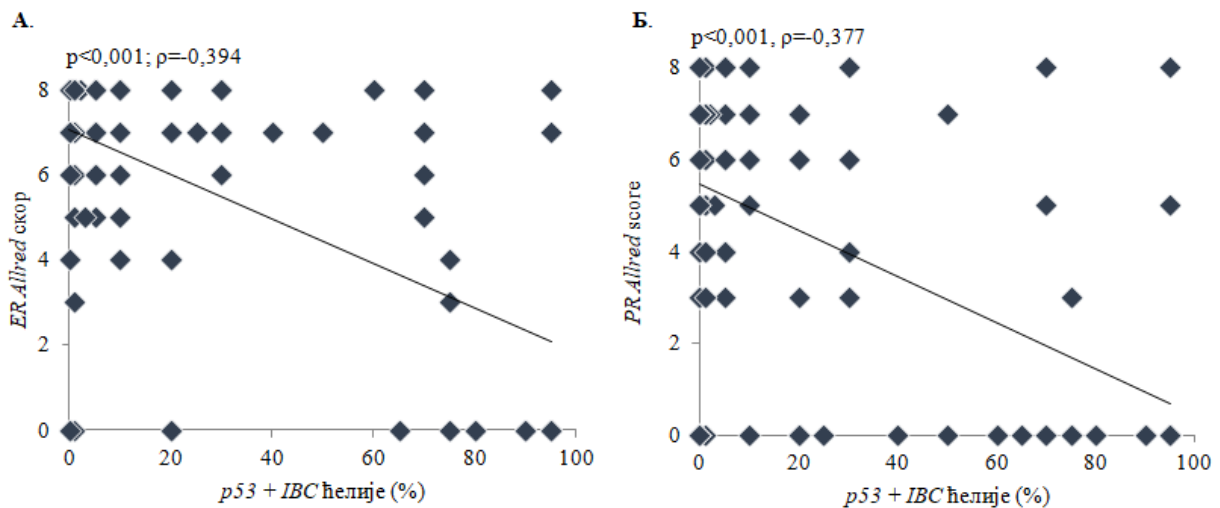
Фигура 16. Експресија *p53* у зависности од експресије *Ki67* и експресије *HER2*. **А.** Експресија *p53* у туморским ћелијама зависи од експресије *Ki67*. Резултат је приказан као медијана (*Kruskal-Wallis*, $p < 0,001$). **Б.** Постоји значајна разлика у експресији *p53* у зависности од експресије *HER2*. Резултат је приказан као медијана (*Mann-Whitney U*, $p = 0,001$).

Такође, *IBC* који су имали присутну некрозу тумора и лимфну инвазију одликовали су се већом експресијом *p53* у односу на оне *IBC* код којих су ове карактеристике биле одсутне. Са порастом нуклераног градуса и експресија *p53* је била статистички значајно већа (Фигура 17). Статистички значајна разлика није постојала код осталих испитиваних клиничко-патолошких карактеристика.



Фигура 17. Експресија $p53$ у зависности од експресије нуклеарног градуса, некрозе тумора и лимфне инвазије. А. Експресија $p53$ у туморским ћелијама зависи од нуклеарног градуса. Резултат је приказан као медијана (*Kruskal-Wallis*, $p=0,001$). Постоји значајна разлика у експресији $p53$ у зависности од Б. некрозе тумора (*Mann Whitney U*, $p=0,01$) и В. лимфне инвазије (*Mann Whitney U*, $p=0,05$). Резултат је приказан као медијана.

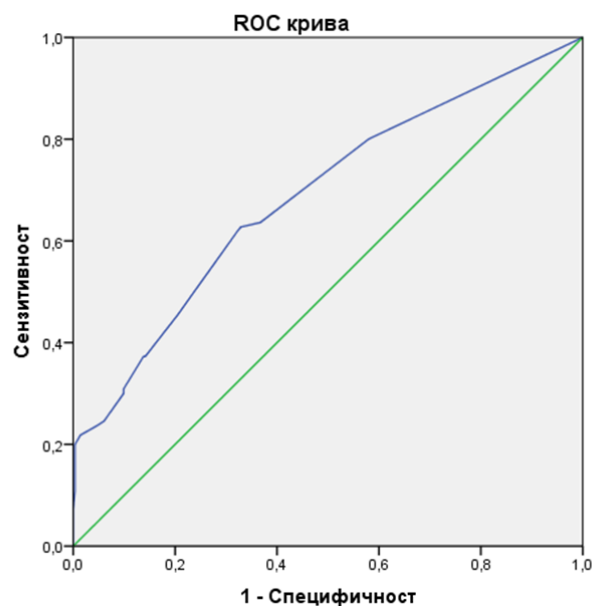
Показана је умерена негативна корелација између експресије *p53* у *IBC* и експресије рецептора за естрогене и прогестерон, односно са порастом експресије *p53* у *IBC* значајно опада експресија рецептора за естрогене и прогестерон (*Spearman ρ*) (Фигура 18).



Фигура 18. Експресија *p53* у зависности од експресије *ER* и *PR*. Експресија *ER* и *PR* анализирана је кроз *Allred* скор. Пораст експресије *p53* у туморским ћелијама је праћена статистички значајно смањеном експресијом **А. *ER*** ($p < 0,001$, $\rho = -0,394$) и **Б. *PR*** ($p < 0,001$, $\rho = -0,377$) (умерена негативна корелација).

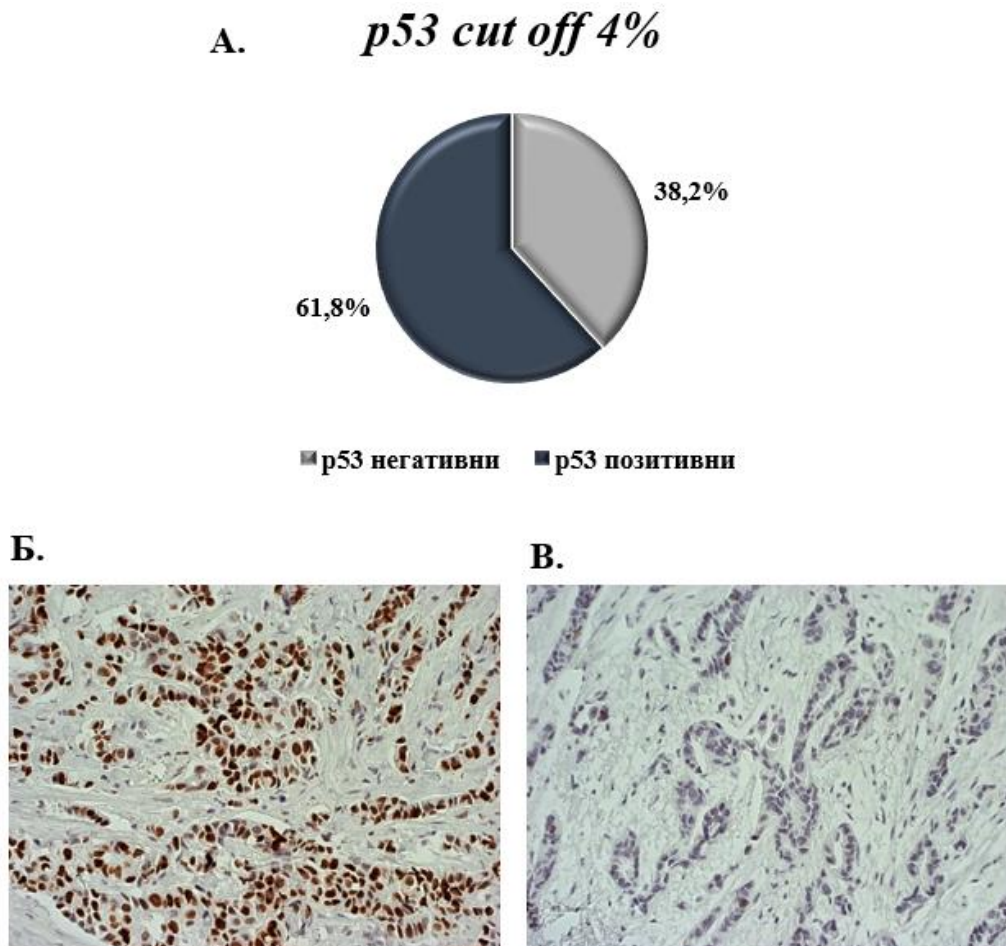
4.3.3. Експресија *p53* као маркера прогресије карцинома дојке

Анализирана је експресија *p53* као маркера прогресије карцинома дојке и добијена је *ROC* крива ($AUC = 0,687$, $p < 0,001$) која указује да повећање експресије *p53* може бити предиктивни маркер прогресије (Фигура 19).



Фигура 19. *ROC* крива експресије *p53* у *NIL* и *IBC*. Израчуната вредност $AUC = 0,687$ уз сензитивност 61,8% и специфичност 67,8% одређена је гранична вредност од 4%.

На основу ове анализе издвојена је оптимална гранична вредност експресије *p53* која раздваја пацијенте са и без *IBC*. Она износи 4% уз сензитивност од 61,8% и специфичност од 67,8%. Како би се испитала повезаност клиничко-патолошких карактеристика са вредностима експресије *p53*, сви *IBC* су на основу дефинисане граничне вредности сврстане у групу са негативном ($\leq 4\%$) и позитивном ($>4\%$) експресијом *p53* (Фигура 20А). На Фигури 20Б-В приказана је имунохистохемијска експресија *p53* у односу на израчунату граничну вредност. Повезаност експресије *p53* и клиничко-патолошких карактеристика приказна је у Табели 5.



Фигура 20. А. Учесталост *p53+* и *p53-* *IBC* у односу на граничну вредност експресије *p53*. Микроскопска слика експресије *p53* у односу на граничну вредност: Б. *p53+* и В. *p53-* (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200х).

Табела 5. Повезаност експресије *p53* у *IBC* и испитиваних клиничко-патолошких карактеристика.

Клиничко-патолошке карактеристике	<i>p53 cut off 4%</i>		Chi-Square	p	
	-	+			
Стромални Мононуклеарни инфилтрат	одсутан	1 (4,5%)	3 (6,5%)	0,148	0,986
	низак	10 (45,5%)	20 (43,5%)		
	умерен	8 (36,4%)	16 (34,8%)		
	висок	3 (13,6%)	7 (15,2%)		
Хистолошки тип	лобуларни	7 (16,7%)	6 (8,8%)	2,759	0,252
	дуктални	33 (78,6%)	61 (89,7%)		
	остало	2 (4,8%)	1 (1,5%)		
Хистолошки градус	градус 1	6 (14,6%)	8 (12,1%)	0,157	0,924
	градус 2	21 (51,2%)	34 (51,5%)		
	градус 3	14 (34,1%)	24 (36,4%)		
Нуклеарни градус	градус 1	7 (25,0%)	6 (10,7%)	3,585	0,167
	градус 2	16 (57,1%)	33 (58,9%)		
	градус 3	5 (17,9%)	17 (30,4%)		
Некроза тумора	одсутна	12 (37,5%)	10 (17,2%)	3,551	0,050
	присутна	20 (62,5%)	48 (82,8%)		
Перинеурална инвазија	одсутна	31 (73,8%)	45 (66,2%)	0,396	0,529
	присутна	11 (26,2%)	23 (33,8%)		
Лимфна инвазија	одсутна	27 (64,3%)	30 (44,1%)	3,461	0,063
	присутна	15 (35,7%)	38 (55,9%)		
Васкуларна инвазија	одсутна	34 (81,0%)	46 (67,6%)	1,695	0,193
	присутна	8 (19,0%)	22 (32,4%)		
Молекуларни подтип <i>IBC</i>	<i>Lum A</i>	16 (38,1%)	8 (11,8%)	12,260	0,007
	<i>Lum B</i>	22 (52,4%)	43 (63,2%)		
	<i>HER2 +</i>	3 (7,1%)	10 (14,7%)		
	<i>TNBC</i>	1 (2,4%)	7 (10,3%)		
<i>HER2</i>	негативни	37 (88,1%)	47 (70,1%)	3,743	0,050
	позитивни	5 (11,9%)	20 (29,9%)		
<i>Ki67</i>	низак	15 (35,7%)	8 (11,8%)	11,927	0,003
	умерен	14 (33,3%)	19 (27,9%)		
	висок	13 (31,0%)	41 (60,3%)		
<i>T</i> статус	<i>T1</i>	19 (51,4%)	17 (26,2%)	9,104	0,028
	<i>T2</i>	12 (32,4%)	38 (58,5%)		
	<i>T3</i>	3 (8,1%)	2 (3,1%)		
	<i>T4</i>	3 (8,1%)	8 (12,3%)		
<i>N</i> статус	<i>N0</i>	17 (44,7%)	22 (36,7%)	9,004	0,029
	<i>N1</i>	9 (23,7%)	28 (46,7%)		
	<i>N2</i>	8 (21,1%)	3 (5,0%)		
	<i>N3</i>	4 (10,5%)	7 (11,7%)		

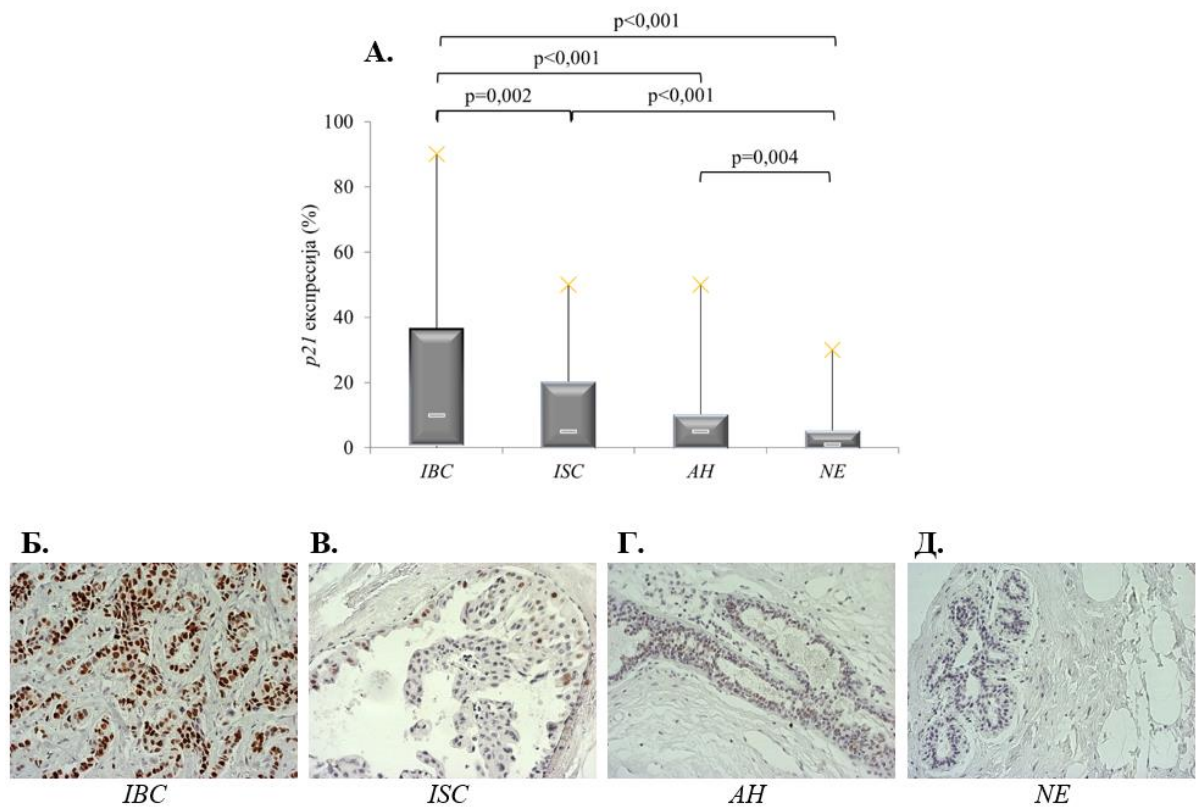
Сем молекуларног подтипа, експресије *HER2* и експресија пролиферативног индекса *Ki67* као значајних клиничко-патолошких карактеристика, показано је да су *T* статус, *N* статус и некроза тумора били повезани са *p53* позитивним *IBC*. *HER2+* подтип *IBC* и

TNBC су били заступљенији код *p53* позитивних (14,7% *HER2+* и 10,3% *TNBC*) у односу на *p53* негативне (7,1% *HER2+* и 2,4% *TNBC*) *IBC*. Укупно 30% *IBC* који су *p53* позитивни су и *HER2* позитивни, док је код *p53* негативних само 12% *HER2* позитивних. Расподела *p53* негативних је била подједнака у зависности од експресије *Ki67* односно постојао је приближно једнак број пацијената који су имали ниску, умерену и високу експресију *Ki67*. Насупрот томе, код *p53* позитивних *IBC* 60,3% (41) пацијената је спадало у групу са високом експресијом *Ki67*. Највећи проценат *p53* позитивних *IBC* је имао *T2* (58,5%) и *N1* (46,7%) статус док је код *p53* негативних најчесталији био *T1* (51,4%) и *N0* (44,7%) статус. Такође, некроза тумора је била присутна код већег броја *p53* позитивних (82,8%) у односу на *p53* негативне (62,5%) *IBC*.

4.4. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ *p21*

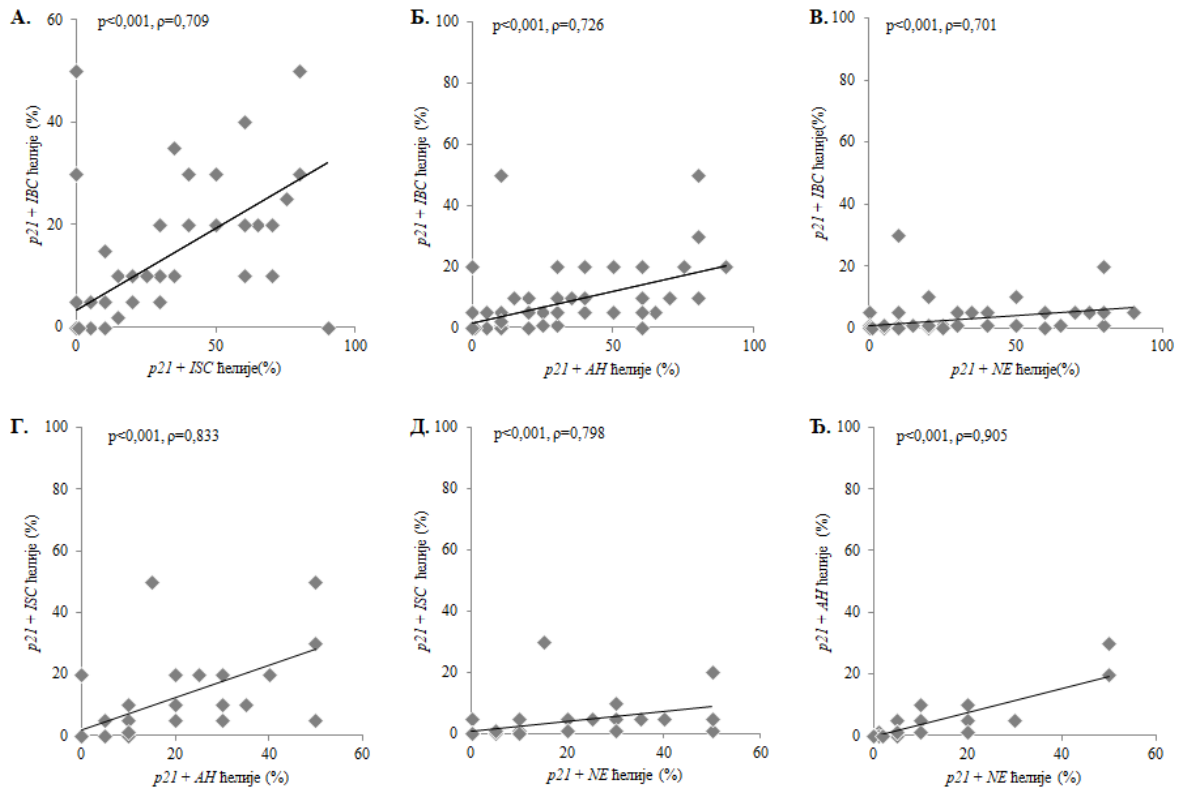
4.4.1. Експресија *p21* у односу на цитолошке промене у епителу

Израчуната је просечна вредност експресије *p21* у зависности од врсте ћелија при чему је уочено статистички значајно повећање са порастом инвазивности (у *NE* 2%, у *AH* 7%, у *ISC* 11% и у *IBC* 23%) (*Kruskal-Wallis*, $p < 0,001$). Статистички значајна разлика је изостала једино у случају поређења групе *ISC* и *AH* (*Mann-Whitney U*, $p = 0,06$), док је између свих осталих група ова разлика показана (Фигура 21А). Имунохистохемијска експресија *p21* у различитим хисто и цитоморфолошким променама приказана је на Фигури 21Б-Д.



Фигура 21. Експресија *p21* у односу на цитолошке промене у епителу. **А.** Статистички значајна разлика је уочена између сваке од наведених група осим између групе *ISC* и *AH* (*Mann Whitney U*, $p=0,06$). Резултат је приказан као медијана. Микроскопска слика експресије *p21* у различитим хисто и цитоморфолошким променама: **Б.** *IBC*. **В.** *ISC*. **Г.** *AH*. **Д.** *NE* (имунихистохемијска анализа, оригинално увећање 200x).

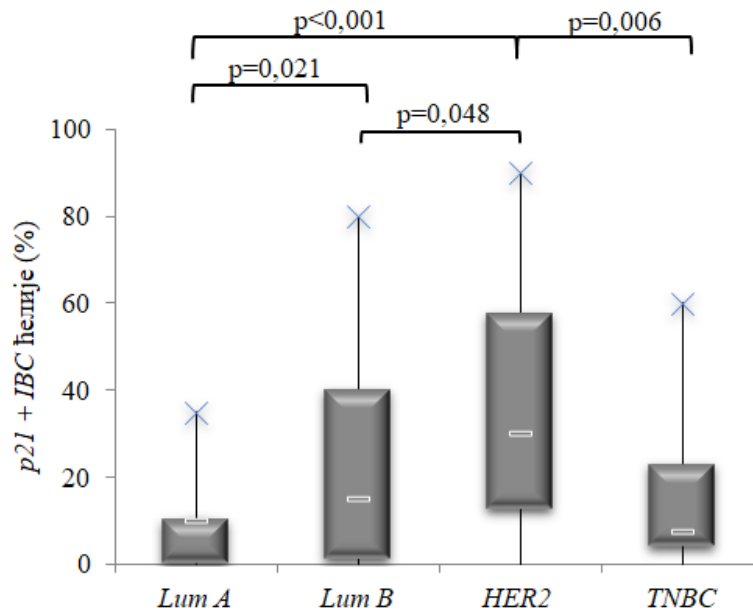
Јака позитивна корелација је утврђена између *p21* експресије у свим наведеним променама (*Spearman ρ*). Са порастом експресије *p21* у ћелијама *IBC* расте и експресија у ћелијама *NIL* (Фигура 22). Такође, повећање експресије *p21* у *ISC* је праћено повећањем у *AH* и *NE*. Са повећањем експресије у *AH* расте и експресија у *NE*.



Фигура 22. Корелација експресије *p21* између група у односу на цитолошке промене у епителу (*Spearman* ρ). Између свих група је утврђена јака позитивна корелација: **А.** *IBC* и *ISC* ($p < 0,001, \rho = 0,709$), **Б.** *IBC* и *AH* ($p < 0,001, \rho = 0,726$), **В.** *IBC* и *NE* ($p < 0,001, \rho = 0,701$), **Г.** *ISC* и *AH* ($p < 0,001, \rho = 0,833$), **Д.** *ISC* и *NE* ($p < 0,001, \rho = 0,798$) и **Ђ.** *AH* и *NE* ($p < 0,001, \rho = 0,905$).

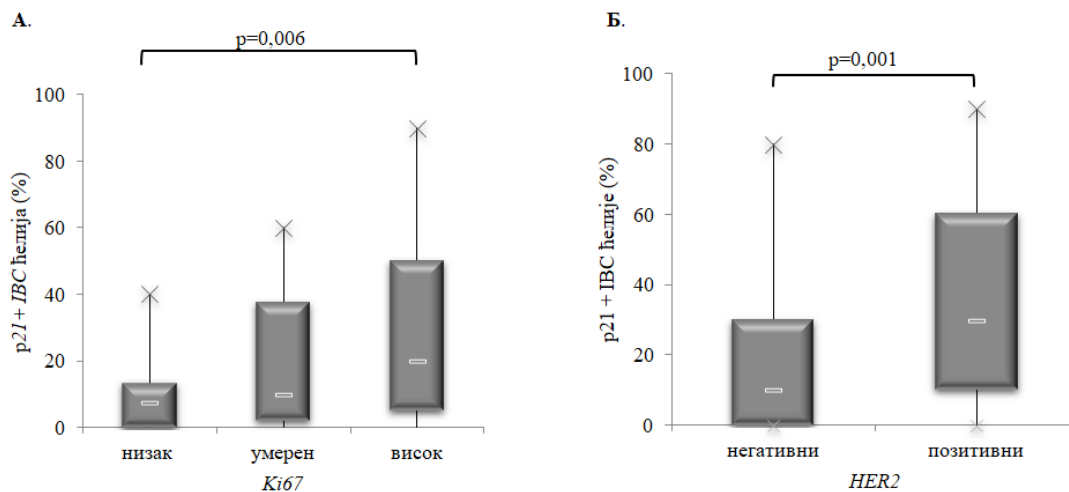
4.4.2. Експресија *p21* у туморским ћелијама у односу на молекуларни подтип *IBC*

Када се посматра експресија *p21* у односу на молекуларне подтипове *IBC*, уочена је статистички значајна разлика међу различитим подтиповима (*Kruskal-Wallis*, $p = 0,004$). Највећа експресија је забележена код *HER2+* подтипа *IBC*. У односу на *HER2+* подтип *IBC*, молекуларни подтипови *Lum B* и *Lum A* су имали статистички значајно нижу вредност експресије *p21* док је најнижа вредност забележена код *TNBC* (Фигура 23).



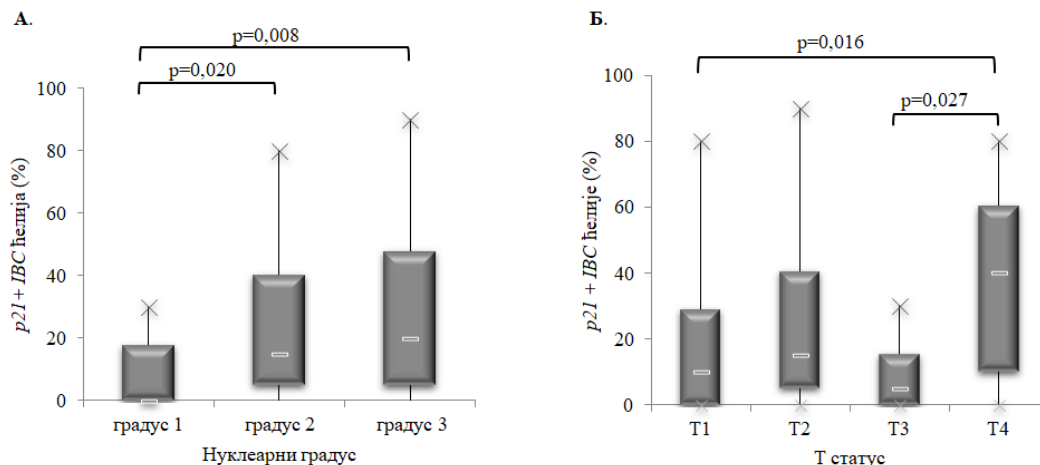
Фигура 23. Експресија $p21$ у различитим молекуларним подтипима IBC . Показана је статистички значајна разлику између следећих група: *Lum A* и *Lum B* (*Mann-Whitney U*, $p=0,021$), *Lum A* и *HER2* (*Mann-Whitney U*, $p<0,00$), *Lum B* и *HER2* (*Mann-Whitney U*, $p=0,048$), *HER2* и *TNBC* (*Mann-Whitney U*, $p=0,006$). Резултат је представљен као медијана.

Статистички значајно веће вредности експресије $p21$ су уочене код оних IBC који су показивали прекомерну експресију $HER2$ у односу на $HER2$ негативне туморе. У зависности од експресије $Ki67$, највећа експресија $p21$ је у групи са високим вредностима експресије $Ki67$ (Фигура 24).



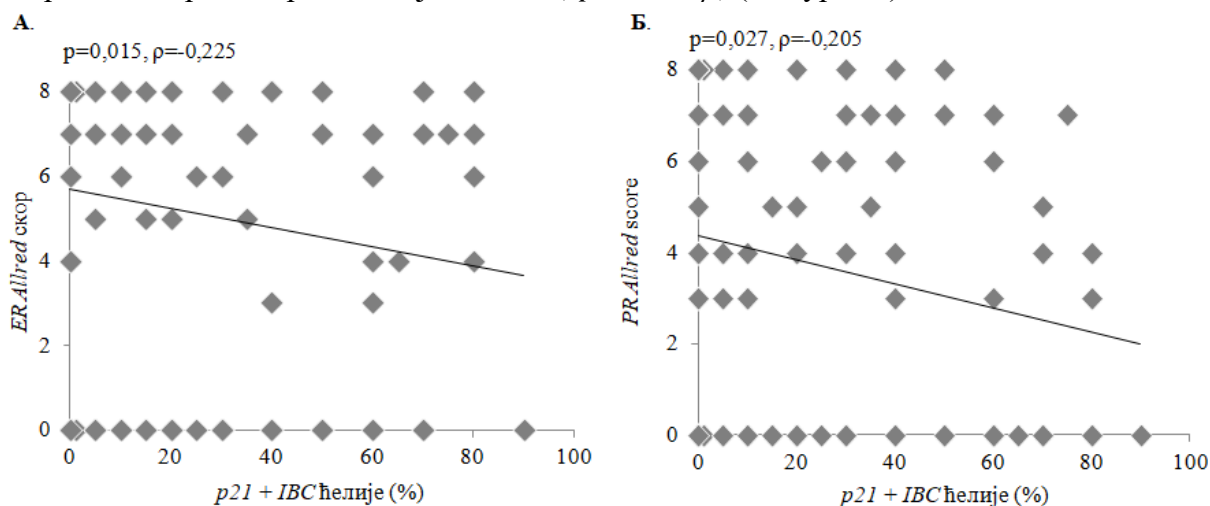
Фигура 24. Експресија $p21$ у зависности од експресије $Ki67$ и експресије $HER2$. А. Експресија $p21$ у туморским ћелијама зависи од експресије $Ki67$. Резултат је приказан као медијана. (*Kruskal-Wallis*, $p=0,019$) Б. Постоји значајна разлика у експресији $p21$ у зависности од експресије $HER2$. Резултат је приказан као медијана (*Mann-Whitney U*, $p=0,001$).

У односу на нуклеарни градус, показана је статистички значајно већа експресија *p21* код *IBC* нуклеарног градуса 3 у односу на нуклеарни градус 1 и 2. Такође, *IBC* који су спадали у *T4* групу, у односу на *T* статус, су имали значајно већу експресију у односу на групе *T1* и *T2* (Фигура 25).



Фигура 25. Експресија *p21* у зависности од експресије нуклеарног градуса и *T* статуса. Експресија *p21* у туморским ћелијама зависи од **А.** нуклеарног градуса (*Kruskal-Wallis*, $p=0,026$) и **Б.** *T* статуса (*Kruskal-Wallis*, $p=0,05$). Резултат је приказан као медијана.

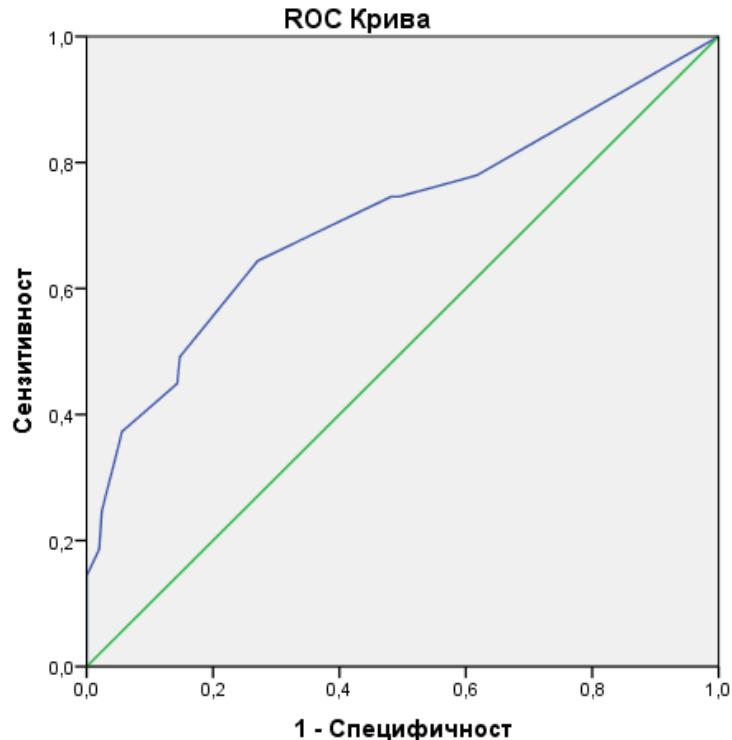
Када је посматрана експресија *p21* у односу на експресију рецептора за естрогене и прогестерон, уочено је да са порастом експресије *p21* у *IBC* експресија рецептора за естрогене и прогестерон значајно опада (*Spearman ρ*) (Фигура 26).



Фигура 26. Експресија *p21* у зависности од експресије *ER* и *PR*. Експресија *ER* и *PR* анализирана је кроз *Allred* скор. Пораст експресије *p21* у туморским ћелијама је праћена статистички значајно смањеном експресијом **А.** *ER* ($p=0,015$, $\rho=-0,225$) и **Б.** *PR* ($p=0,027$, $\rho=-0,205$) (мала негативна корелација).

4.4.3. Експресија *p21* као маркера прогресије карцинома дојке

Анализом експресије *p21*, показано је да њено повећање може бити маркер прогресије карцинома дојке уз издвајање вредности експресије од 7,5% као граничне вредности која раздваја пацијенте у односу на инвазивност ћелија (са и без *IBC*) уз сензитивност од 64,4% и специфичност 72,9% ($AUC=0,712$, $p<0,001$) (Фигура 27).



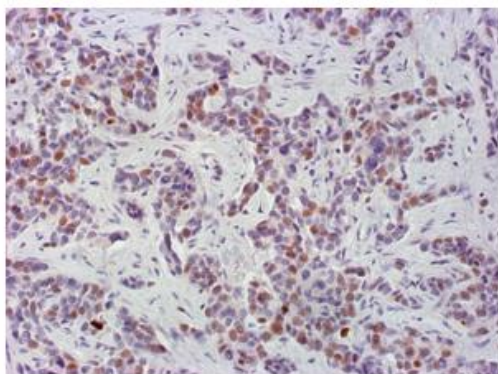
Фигура 27. ROC крива експресије *p21* у *NIL* и *IBC*. Израчуната вредност $AUC=0,712$ уз сензитивност 64,4% и специфичност 64,4% одређена је гранична вредност од 7,5%.

Користећи добијену граничну вредност сви *IBC* су даље подељени у две групе: негативни чија је вредност експресије *p21* била $\leq 7,5\%$, и позитивни чија је експресија *p21* била $>7,5\%$ (Фигура 28А). Имунохистохемијска експресија *p21* у односу на граничну вредност приказана је на Фигури 28Б-В.

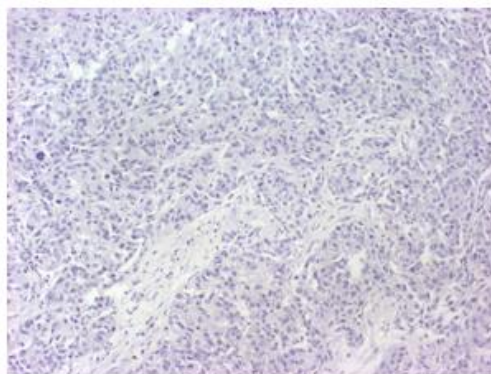
А. *p21 cut off 7,5%*



Б.



В.



Фигура 28. А. Учесталост *p21+* и *p21-* *IBC* у односу на граничну вредност експресије *p21*. Микроскопска слика експресије *p21* у односу на граничну вредност: Б. *p21+* и В. *p21-* (имунихистохемијска анализа, оригинално увећање 200х).

Показана је статистички значајна повезаност са молекуларним подтипом *IBC* као и са експресијом *HER2*. Значајна разлика у процентуалној заступљености молекуларних подтипова *IBC* може се уочити код *HER2+* подтипа где је 19,7% *p21* позитивних док ниједан *p21* негативан *IBC* не спада у молекуларни подтип *HER2+*. Такође, када се посматра *HER2* статус, добијено је да сви *IBC* који су били негативни у односу на експресију *p21*, су такође били и *HER2* негативни, док је код *p21* позитивних било њих 33,8% *HER2* позитивних. Остале клиничко-патолошке карактеристике нису показале статистички значајну повезаност (Табела 6).

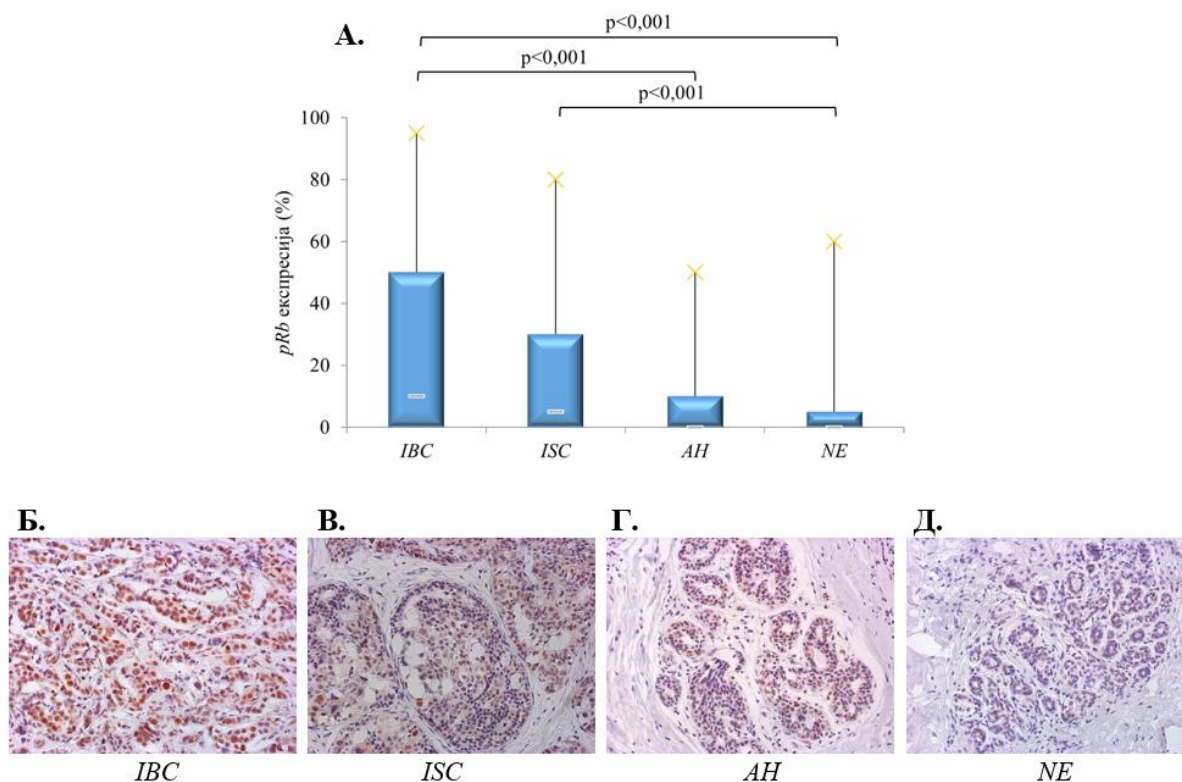
Табела 6. Повезаност експресије *p21* у *IBC* и испитиваних клиничко-патолошких карактеристика.

Клиничко-патолошке карактеристике	<i>p21 cut off 7,5%</i>		Chi-Square	<i>p</i>	
	-	+			
Стромални мононуклеарни инфилтрат	одсутан	1 (9,1%)	3 (5,8%)	0,666	0,881
	низак	4 (36,4%)	20 (38,5%)		
	умерен	5 (45,5%)	20 (38,5%)		
	висок	1 (9,1%)	9 (17,3%)		
Хистолошки тип	лобуларни	1 (6,7%)	5 (6,7%)	0,622	0,733
	дуктални	14 (93,3)	67 (89,3)		
	остало	0 (0,0%)	3 (4,0%)		
Хистолошки градус	градус 1	2 (12,5%)	8 (11,0%)	0,364	0,834
	градус 2	7 (43,8%)	38 (52,1%)		
	градус 3	7 (43,8%)	27 (37,0)		
Нуклеарни градус	градус 1	0 (0,0%)	6 (9,7%)	2,096	0,351
	градус 2	7 (53,8%)	37 (59,7%)		
	градус 3	6 (46,2%)	19 (30,6%)		
Некроза тумора	одсутна	2 (15,4%)	17 (27,0%)	0,278	0,598
	присутна	11 (84,6%)	46 (73,0%)		
Перинеурална инвазија	одсутна	13 (81,3%)	49 (64,5%)	1,015	0,314
	присутна	3 (18,8)	27 (35,5%)		
Лимфна инвазија	одсутна	5 (31,3%)	37 (48,7%)	0,993	0,319
	присутна	11 (68,8%)	39 (51,3%)		
Васкуларна инвазија	одсутна	12 (75,0%)	57 (75,0%)	0,000	1,000
	присутна	4 (25,0%)	19 (25,0%)		
Молекуларни подтип <i>IBC</i>	<i>Lum A</i>	1 (6,3%)	10 (13,2%)	11,490	0,009
	<i>Lum B</i>	8 (50,0%)	42 (55,3%)		
	<i>HER2 +</i>	0 (0,0%)	15 (19,7%)		
	<i>TNBC</i>	7 (43,8%)	9 (11,8%)		
<i>HER2</i>	негативни	16 (100,0%)	49 (66,2%)	5,895	0,015
	позитивни	0 (0,0%)	25 (33,8%)		
<i>Ki67</i>	низак	2 (13,3%)	10 (13,5%)	1,075	0,584
	умерен	6 (40,0%)	20 (27,0%)		
	висок	7 (46,7%)	44 (59,5)		
<i>T</i> статус	<i>T1</i>	3 (20,0%)	22 (32,4%)	2,924	0,404
	<i>T2</i>	9 (60,0%)	34 (50,0%)		
	<i>T3</i>	2 (13,3%)	3 (4,4%)		
	<i>T4</i>	1 (6,7%)	9 (13,2%)		
<i>N</i> статус	<i>N0</i>	4 (26,7%)	23 (33,3%)	1,504	0,681
	<i>N1</i>	8 (53,3%)	26 (37,7%)		
	<i>N2</i>	1 (6,7%)	10 (14,5%)		
	<i>N3</i>	2 (13,3%)	10 (14,5%)		

4.5. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ *pRb*

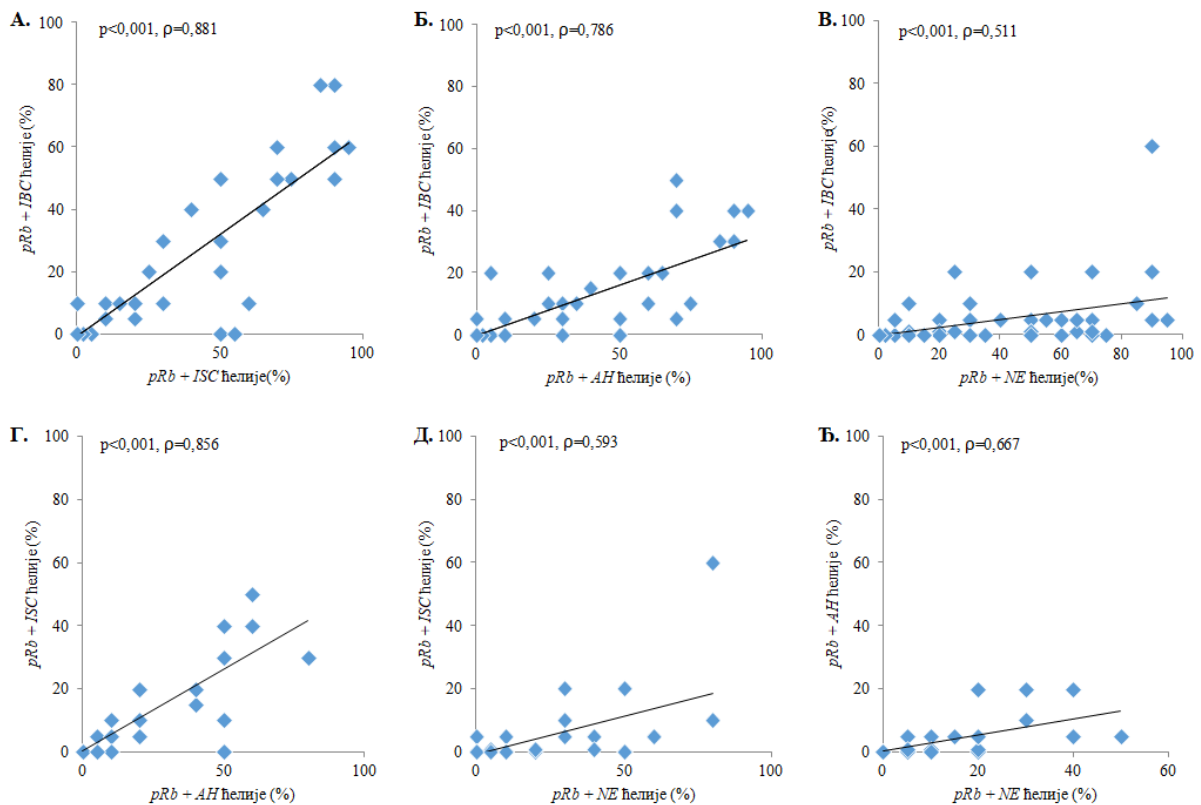
4.5.1. Експресија *pRb* у односу на цитолошке промене у епителу

У зависности од цитолошких промена у епителу израчуната је просечна вредност експресије *pRb* и она је износила у *NE* 3%, у *AH* 8%, у *ISC* 18% и у *IBC* 25%. Показана је статистички значајна разлика између наведених група (*Kruskal-Wallis*, $p < 0,001$). Показано је да статистички значајна разлика постоји између следећих група: *IBC* и *AH* (*Mann-Whitney U*, $p < 0,001$), *IBC* и *NE* (*Mann-Whitney U*, $p < 0,001$), *ISC* и *NE* (*Mann-Whitney U*, $p < 0,001$) (Фигура 29А). На Фигури 29Б-Д приказана је имунохистохемијска експресија *pRb* у различитим хисто и цитоморфолошким променама.



Фигура 29. Експресија *pRb* у односу на цитолошке промене у епителу. **А.** Статистички значајна разлика је уочена између следећих група: *IBC* и *AH* (*Mann-Whitney U*, $p < 0,001$), *IBC* и *NE* (*Mann-Whitney U*, $p < 0,001$), *ISC* и *NE* (*Mann-Whitney U*, $p < 0,001$). Резултат је приказан као медијана. Микроскопска слика експресије *pRb* у различитим хисто и цитоморфолошким променама: **Б.** *IBC*. **В.** *ISC*. **Г.** *AH*. **Д.** *NE* (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x).

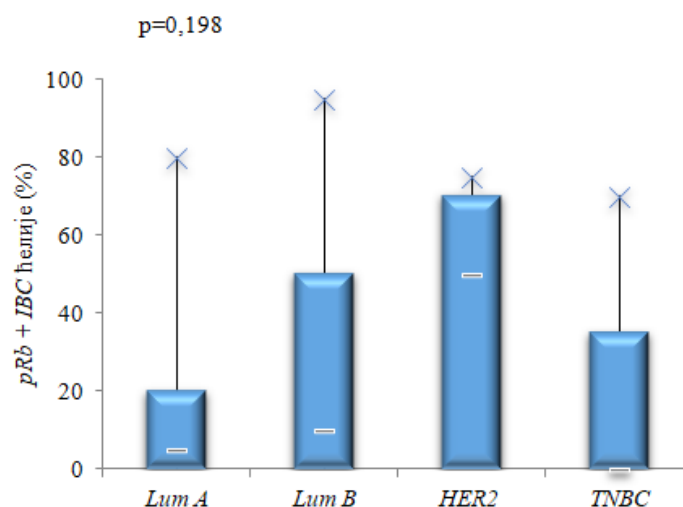
Показана је јака позитивна корелација између *pRb* експресије у свим наведеним променама (*Spearman ρ*). Са порастом експресије *pRb* у ћелијама *IBC* расте и експресија у ћелијама *NIL*. Даље, повећање експресије *pRb* у *ISC* је праћено повећањем у *AH* и *NE*, а повећањем експресије у *AH* расте и експресија у *NE* (Фигура 30).



Фигура 30. Корелација експресије *pRb* између група у односу на цитолошке промене у епителу (*Spearman ρ*). Између свих група је утврђена јака позитивна корелација: **А.** *IBC* и *ISC* ($p < 0,001$, $\rho = 0,881$), **Б.** *IBC* и *АН* ($p < 0,001$, $\rho = 0,786$), **В.** *IBC* и *NE* ($p < 0,001$, $\rho = 0,511$), **Г.** *ISC* и *АН* ($p < 0,001$, $\rho = 0,856$), **Д.** *ISC* и *NE* ($p < 0,001$, $\rho = 0,593$) и **Б.** *АН* и *NE* ($p < 0,001$, $\rho = 0,667$).

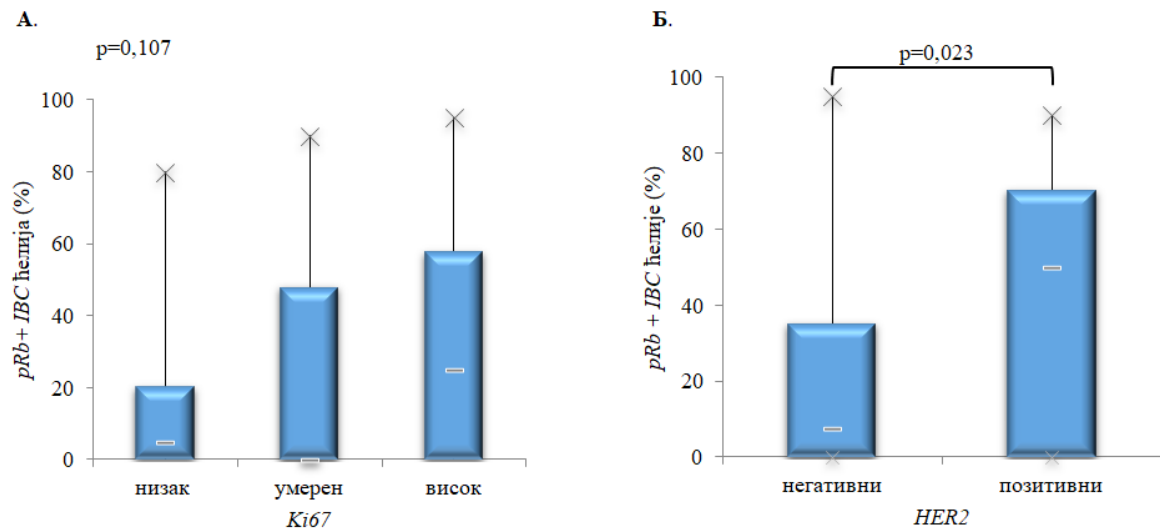
4.5.2. Експресија *pRb* у туморским ћелијама у односу на молекуларни подтип *IBC*

Највећу вредност експресије *pRb*, у односу на молекуларни подтип имао је *HER2+* подтип *IBC*, затим *Lum B* и *Lum A*, док је најмања експресија уочена у *TNBC* подтипу (Фигура 31). Међутим, разлика међу групама није статистички значајна (*Kruskal-Wallis*, $p = 0,198$).



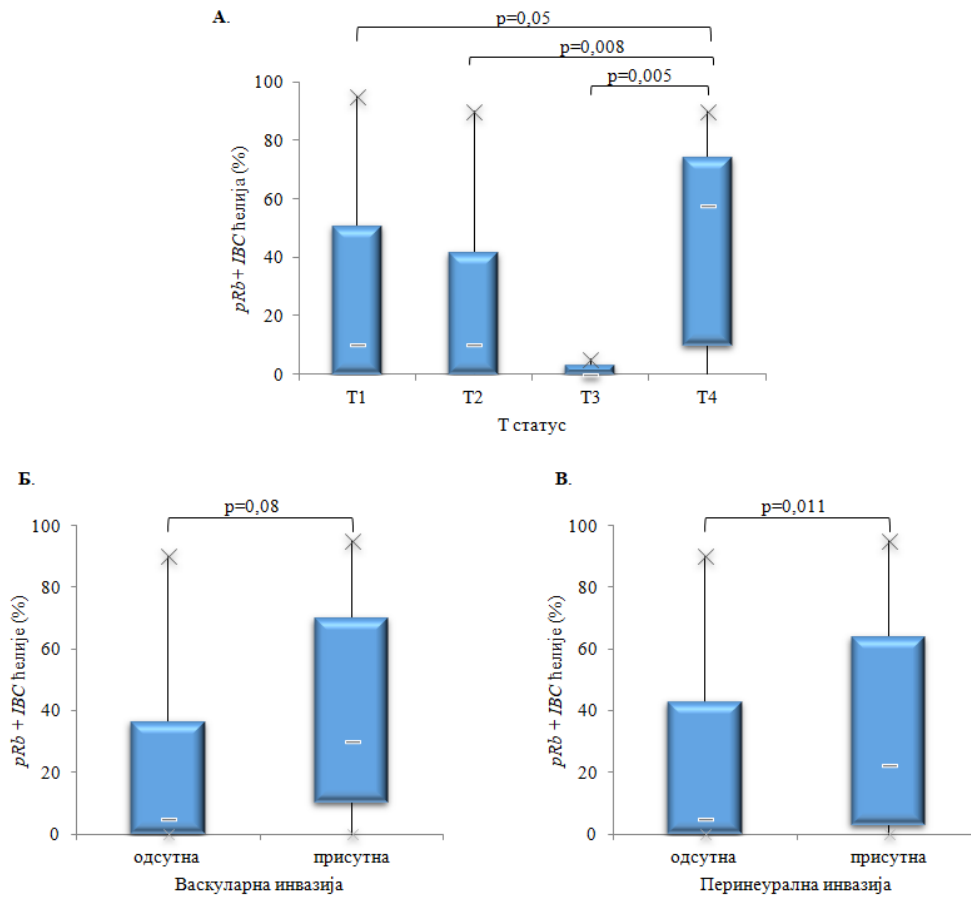
Фигура 31. Експресија *pRb* у различитим молекуларним подтипима *IBC*. Није показана статистички значајна разлика између испитиваних група (*Kruskal-Wallis*, $p=0,198$). Резултат је представљен као медијана.

Код оних *IBC* који су *HER2* позитивни показане су статистички значајно веће вредности експресије *pRb* у односу на оне које су *HER2* негативни. У односу на експресију *Ki67* није показана статистички значајна разлика код оних пацијента који су имали ниску, умерену или високу експресију *Ki67* (Фигура 32).



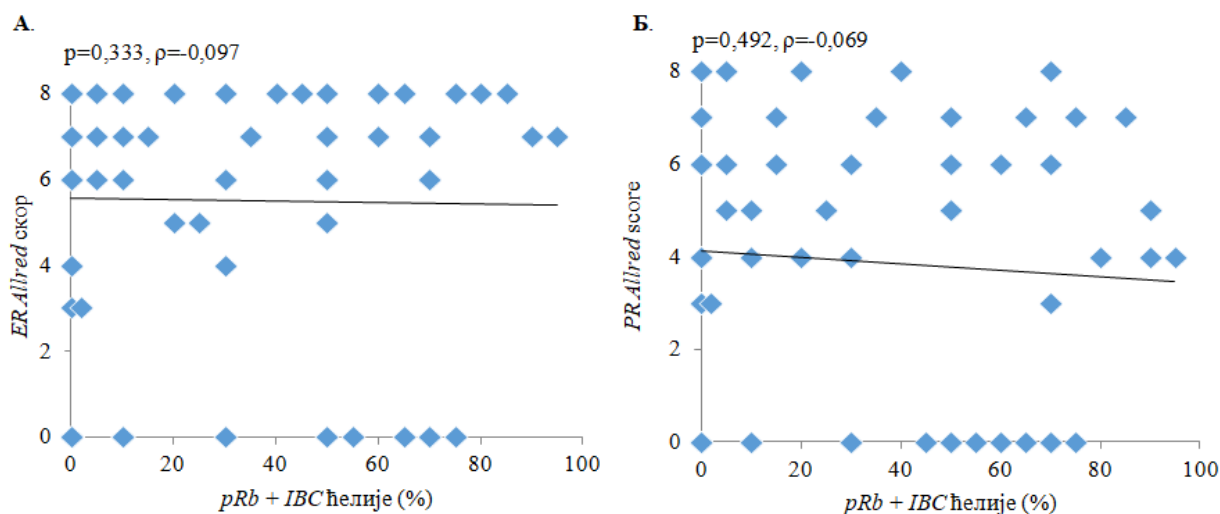
Фигура 32. Експресија *pRb* у зависности од експресије *Ki67* и експресије *HER2*. **А.** Експресија *pRb* у туморским ћелијама не зависи од експресије *Ki67*. Резултат је приказан као медијана (*Kruskal-Wallis*, $p=0,107$). **Б.** Постоји статистички значајна разлика у експресији *pRb* у зависности од експресије *HER2* (*Mann Whitney U*, $p=0,001$). Резултат је приказан као медијана.

Присуство васкуларне и перинеуралне инвазије код *IBC* било је повезано са статистички значајно већом експресијом *pRb*. Такође, статистички значајно веће вредности експресије *pRb* биле су код пацијената који су на основу *T* статуса сврстани у групу *T4* у односу на све остале групе (Фигура 33).



Фигура 33. Експресија pRb у зависности од експресије T статуса, васкуларне и перинеуралне инвазије. А. Експресија $p21$ у туморским ћелијама зависи од експресије T статуса. Резултат је приказан као медијана (*Kruskal-Wallis*, $p=0,011$). Постоји значајна разлика у експресији pRb у зависности од Б. васкуларне (*Mann Whitney U*, $p=0,08$) и В. перинеуралне инвазије (*Mann Whitney U*, $p=0,011$). Резултат је приказан као медијана.

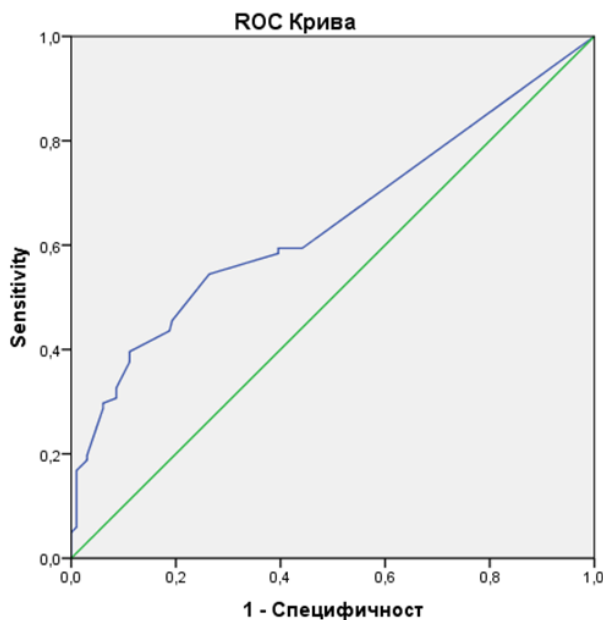
Не постоји статистички значајна корелација између експресије pRb у IBC и експресије рецептора за естрогене и прогестерон (*Spearman ρ*) (Фигура 34).



Фигура 34. Експресија *pRb* у зависности од експресије *ER* и *PR*. Експресија *ER* и *PR* анализирана је кроз *Allred* скор. Не постоји статистички значајна експресија *pRb* у односу на експресију А. *ER* ($p=0,333$, $\rho=-0,097$) и Б. *PR* ($p=0,492$, $\rho=-0,069$).

4.5.3. Експресија *pRb* као маркера прогресије карцинома дојке

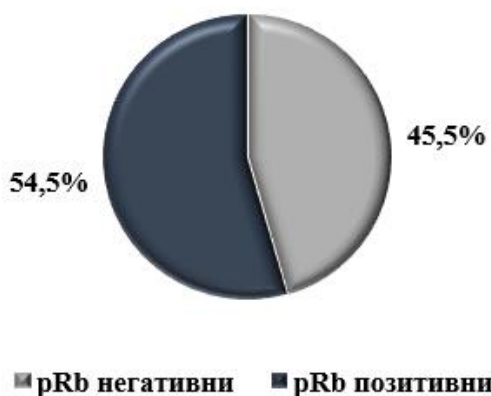
Коришћењем *ROC* криве ($AUC=0,644$ уз сензитивност 54,5% и специфичност 73,6%) добијена је гранична вредност експресије *pRb* од 7,5% као показатељ прогресије карцинома дојке (Фигура 35).



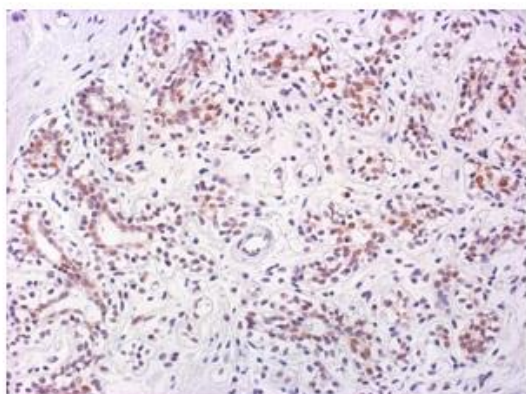
Фигура 35. *ROC* крива експресије *pRb* у *NIL* и *IBC*. Израчуната вредност $AUC=0,644$ уз сензитивност 54,5% и специфичност 73,6% одређена је гранична вредност од 7,5%.

Сви *IBC* су подељени на *pRb* негативне ($\leq 7,5\%$) и *pRb* позитивне ($> 7,5\%$) (Фигура 36А). Имунохистохемијска експресија *pRb* у односу на граничну вредност приказана је на Фигури 36Б-В.

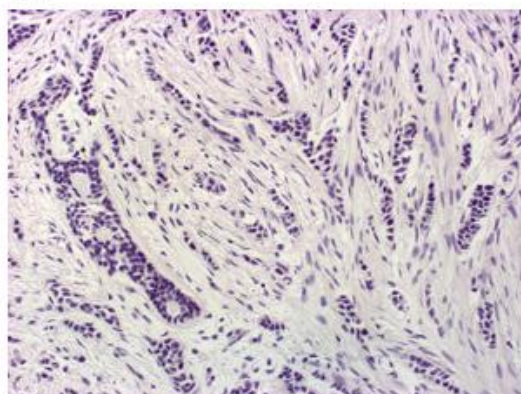
А. *pRb* cut off 7,5%



Б.



В.



Фигура 36. А. Учесталост *pRb*+ и *pRb*- *IBC* у односу на граничну вредност експресије *pRb*. Микроскопска слика експресије *pRb* у односу на граничну вредност: Б. *pRb*+ и В. *pRb*- (имунихистохемијска анализа, оригинално увећање 200х).

Након тога је утврђивана њихова повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама (Табела 7). Васкуларна инвазија је била присутна код већег броја *pRb* позитивних *IBC* односно 38,2%, док је код *pRb* негативних *IBC* то било само 13,0%. Такође, и перинеурална инвазија је била присутна код већег броја *pRb* позитивних *IBC* (41,8%) у односу на *pRb* негативне *IBC* (19,6%). У *T4* групи у односу на *T* статус је било 17,3% *pRb* позитивних *IBC* док је од негативних *IBC* то био само један пацијент односно 2,3%.

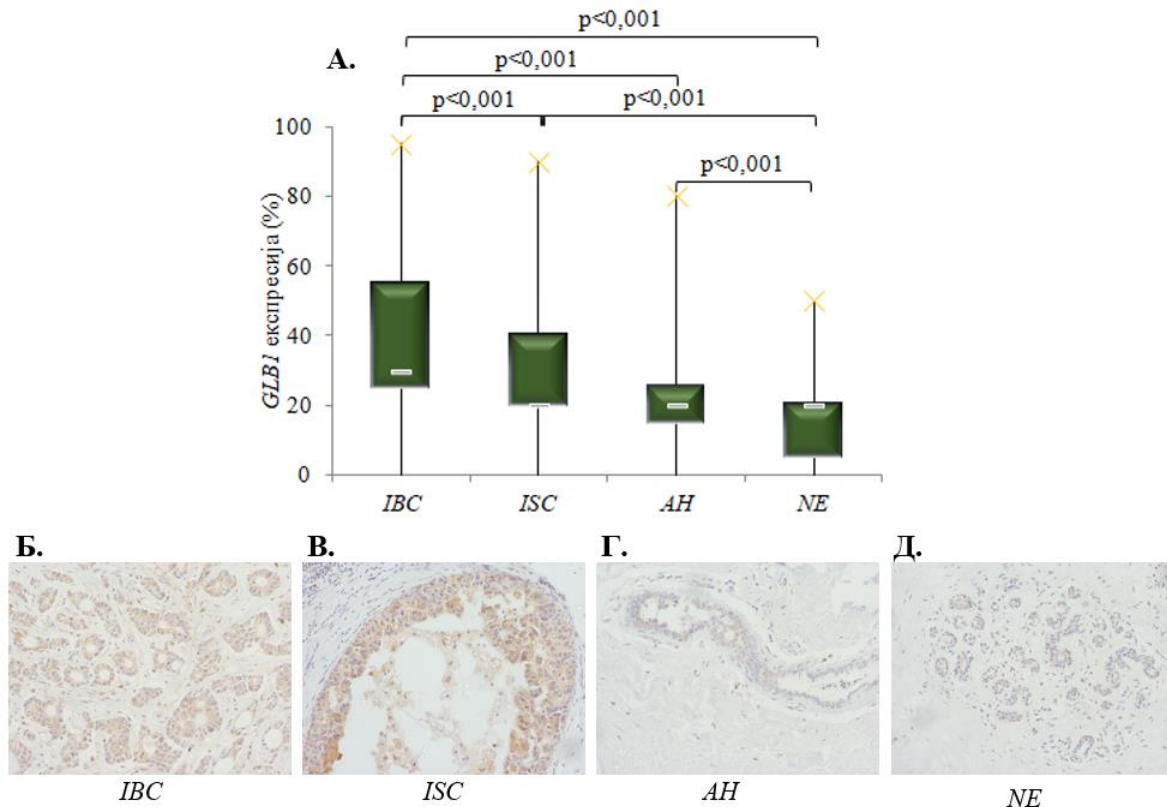
Табела 7. Повезаност експресије *pRb* у *IBC* и испитиваних клиничко-патолошких карактеристика.

Клиничко-патолошке карактеристике		<i>pRb cut off 7,5%</i>		Chi-Square	p
		-	+		
Стромални мононуклеарни инфилтрат	одсутан	2 (6,5%)	1 (2,6%)	1,367	0,713
	низак	16 (51,6%)	17 (43,6%)		
	умерен	9 (29,0%)	15 (38,5%)		
	висок	4 (12,9%)	6 (15,4%)		
Хистолошки тип	лобуларни	5 (10,9%)	7 (12,7%)	0,832	0,660
	дуктални	40 (87,0%)	45 (81,8%)		
	остало	1 (2,2%)	3 (5,5%)		
Хистолошки градус	градус 1	8 (17,4%)	6 (11,3%)	3,552	0,169
	градус 2	27 (58,7%)	25 (47,2%)		
	градус 3	11 (23,9%)	22 (41,5%)		
Нуклеарни градус	градус 1	5 (13,5%)	5 (12,2%)	0,596	0,742
	градус 2	24 (64,9%)	24 (58,5%)		
	градус 3	8 (21,6%)	12 (29,3%)		
Некроза тумора	одсутна	9 (22,0%)	12 (26,1%)	0,040	0,842
	присутна	32 (78,0%)	34 (73,9%)		
Перинеурална инвазија	одсутна	37 (80,4%)	32 (58,2%)	4,749	0,029
	присутна	9 (19,6%)	23 (41,8%)		
Лимфна инвазија	одсутна	25 (54,3%)	23 (41,8%)	1,114	0,291
	присутна	21 (45,7%)	32 (58,2%)		
Васкуларна инвазија	одсутна	40 (87,0%)	34 (61,8%)	6,850	0,009
	присутна	6 (13,0%)	21 (38,2%)		
Молекуларни подтип <i>IBC</i>	<i>Lum A</i>	11 (23,9%)	9 (16,4%)	2,628	0,453
	<i>Lum B</i>	24 (52,2%)	32 (58,2%)		
	<i>HER2 +</i>	5 (10,9%)	10 (18,2%)		
	<i>TNBC</i>	6 (13,0%)	4 (7,3%)		
<i>HER2</i>	негативни	38 (84,4%)	38 (69,1%)	2,412	0,120
	позитивни	7 (15,6%)	17 (30,9%)		
<i>Ki67</i>	низак	11 (23,9%)	9 (16,4%)	2,751	0,253
	умерен	15 (32,6%)	13 (23,6%)		
	висок	20 (43,5%)	33 (60,0%)		
<i>T</i> статус	<i>T1</i>	16 (37,2%)	16 (30,8%)	11,400	0,010
	<i>T2</i>	21 (48,8%)	27 (51,9%)		
	<i>T3</i>	5 (11,6%)	0 (0,0%)		
	<i>T4</i>	1 (2,3%)	9 (17,3%)		
<i>N</i> статус	<i>N0</i>	21 (48,8%)	17 (34,0%)	2,835	0,418
	<i>N1</i>	15 (34,9%)	22 (44,0%)		
	<i>N2</i>	4 (9,3%)	4 (8,0%)		
	<i>N3</i>	3 (7,0%)	7 (14,0%)		

4.6. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ *GLB1*

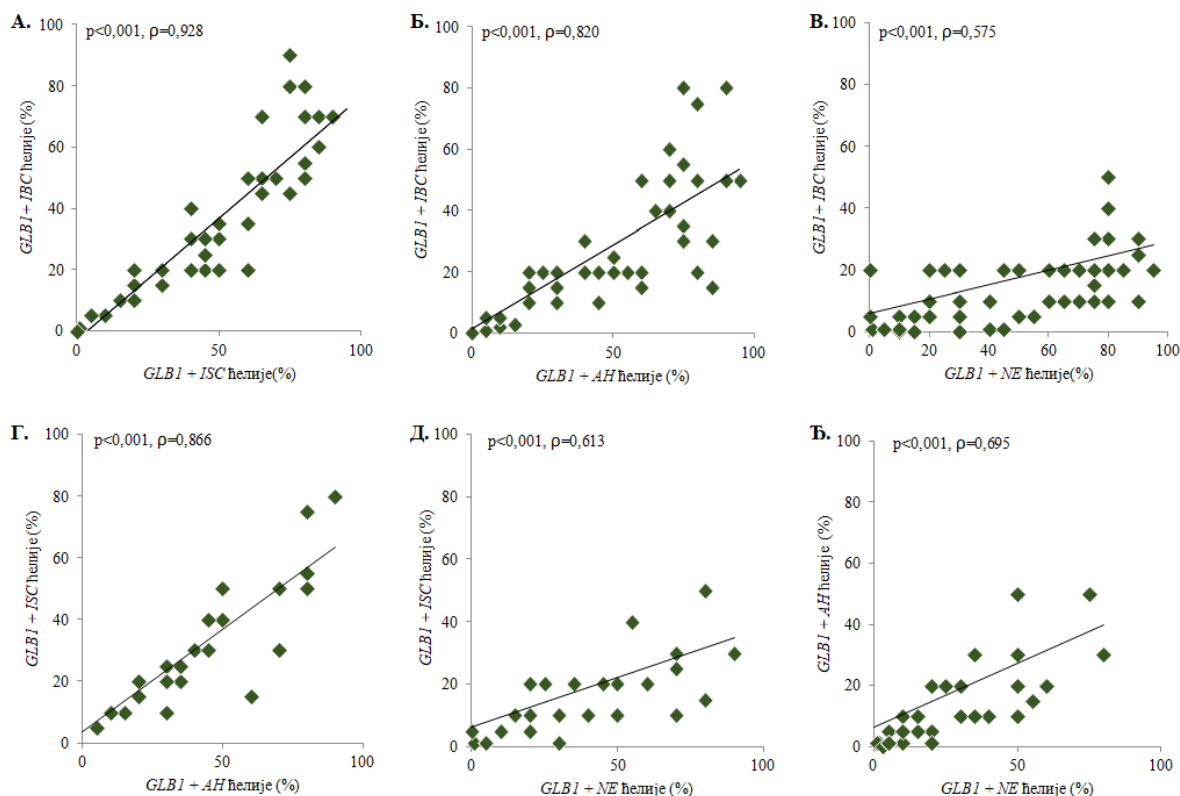
4.6.1. Експресија *GLB1* у односу на цитолошке промене у епителу

Експресија *GLB1* значајно расте од *NE*, преко *AH* и *ISC* до *IBC* и просечна вредност износи у *NE* 15%, у *AH* 24%, у *ISC* 29%, и у *IBC* 39% (*Kruskal-Wallis*, $p < 0,001$). Између група *ISC* и *AH* статистички значајна разлика не постоји (*Mann-Whitney U*, $p = 0,211$), док је између свих осталих група она показана (Фигура 37А). Имунохистохемијска експресија *GLB1* у различитим хисто и цитоморфолошким променама је приказана на Фигури 37Б-Д.



Фигура 37. Експресија *GLB1* у односу на цитолошке промене у епителу. **А.** Статистички значајна разлика је уочена између свих група осим између *ISC* и *AH* (*Mann-Whitney U*, $p = 0,211$). Резултат је приказан као медијана. Микроскопска слика експресије *GLB1* у различитим хисто и цитоморфолошким променама: **Б.** *IBC*. **В.** *ISC*. **Г.** *AH*. **Д.** *NE* (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x).

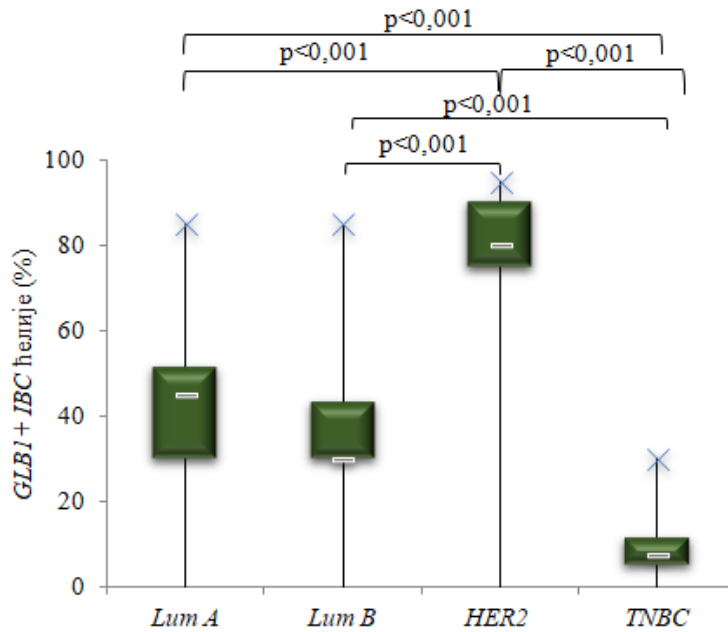
Испитивањем повезаности експресије *GLB1* између 4 наведене групе у односу на цитолошке промене у епителу утврђено је да са порестом експресије у било којој од наведених група расте и експресија у осталим групама, односно са порастом експресије *GLB1* у ћелијама *IBC* расте и експресија у ћелијама *NIL*. Даље, повећање експресије *GLB1* у *ISC* је праћено повећањем у *AH* и *NE*, а повећањем експресије у *AH* расте и експресија у *NE* (*Spearman ρ*) (Фигура 38).



Фигура 38. Корелација експресије *GLB1* између група у односу на цитолошке промене у епителу. Између свих група је утврђена јака позитивна корелација: **А.** *IBC* и *ISC* ($p < 0,001$, $\rho = 0,928$), **Б.** *IBC* и *AH* ($p < 0,001$, $\rho = 0,820$), **В.** *IBC* и *NE* ($p < 0,001$, $\rho = 0,575$), **Г.** *ISC* и *AH* ($p < 0,001$, $\rho = 0,866$), **Д.** *ISC* и *NE* ($p < 0,001$, $\rho = 0,613$) и **Ђ.** *AH* и *NE* ($p < 0,001$, $\rho = 0,695$).

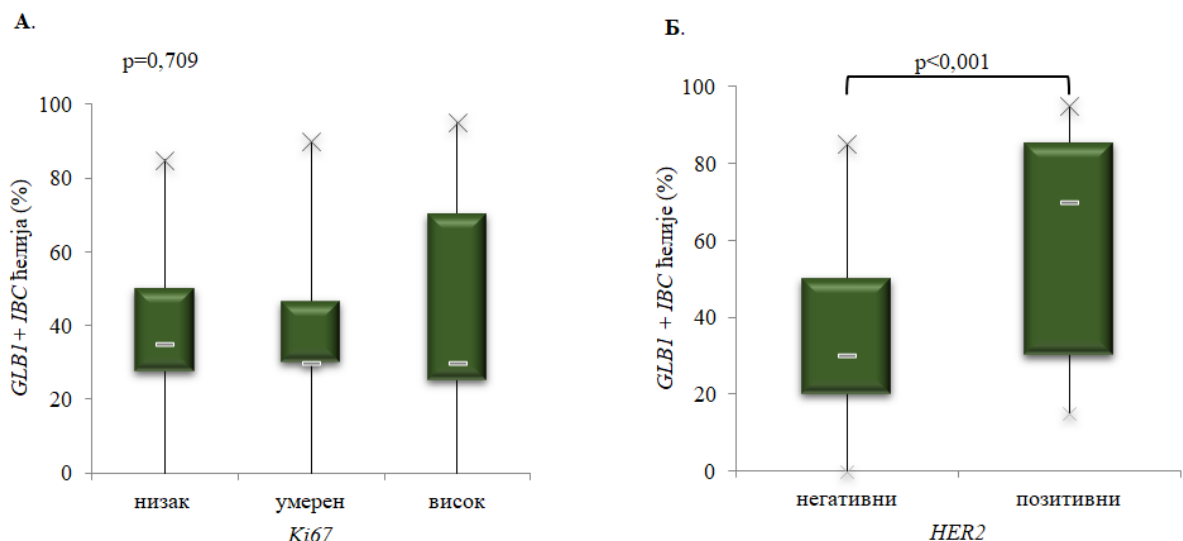
4.6.2. Експресија *GLB1* у туморским ћелијама у односу на молекуларни подтип *IBC*

Показано је постојање статистички значајне разлике у експресији *GLB1* у односу на молекуларни подтип *IBC* (*Kruskal-Wallis*, $p < 0,001$). Највећа експресија је показана код *HER2+* подтипа *IBC*, док је најмања вредност експресије *GLB1* била код *TNBC*-а. Статистички значајна разлика није показана између *Lum A* и *Lum B* подтипа *IBC* (*Mann-Whitney U*, $p = 0,128$), док је између свих осталих група значајна разлика постоји (Фигура 39).



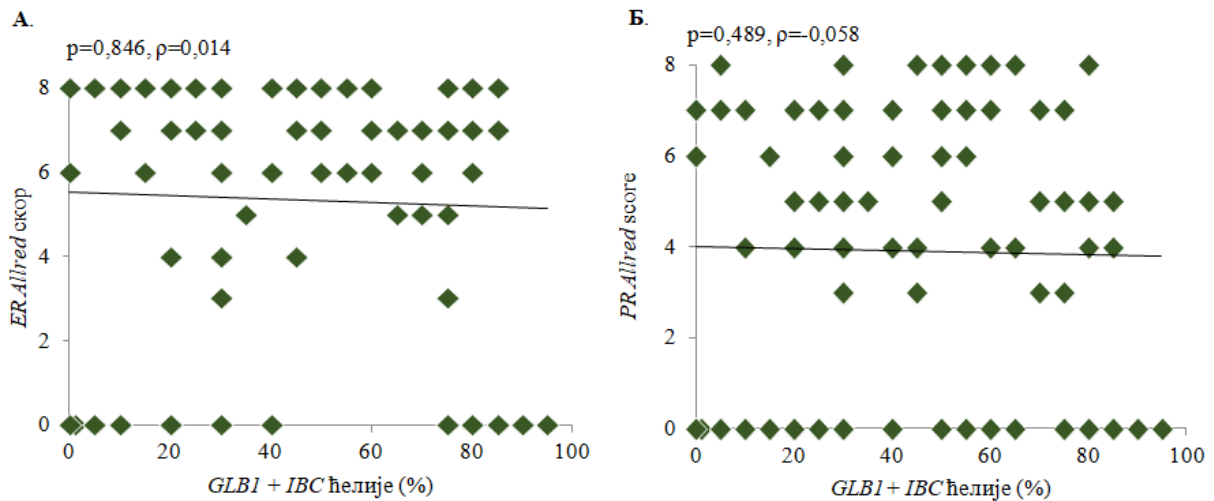
Фигура 39. Експресија *GLB1* у различитим молекуларним подтипима *IBC*. Показана је статистички значајна разлику између свих испитиваних група осим између *Lum A* и *Lum B* подтипова *IBC* (*Mann-Whitney U*, $p=0,128$). Резултат је представљен као медијана.

IBC са прекомерном експресијом *HER2* су имали значајно веће вредности експресије *GLB1* у односу на *GLB1* негативне *IBC*. Што се тиче експресије у односу на експресију *Ki67*, не постоји значајна разлика између оних који су имали ниску, умерену или високу експресију (Фигура 40). Остале клиничко-патолошке карактеристике *IBC* нису биле повезане са експресијом *GLB1*.



Фигура 40. Експресија *GLB1* у зависности од експресије *Ki67* и експресије *HER2*. А. Експресија *GLB1* у туморским ћелијама не зависи од експресије *Ki67*. Резултат је приказан као медијана (*Kruskal-Wallis*, $p=0,709$). Б. Постоји значајна разлика у експресији *GLB1* у зависности од експресије *HER2*. Резултат је приказан као медијана (*Mann-Whitney U*, $p<0,001$).

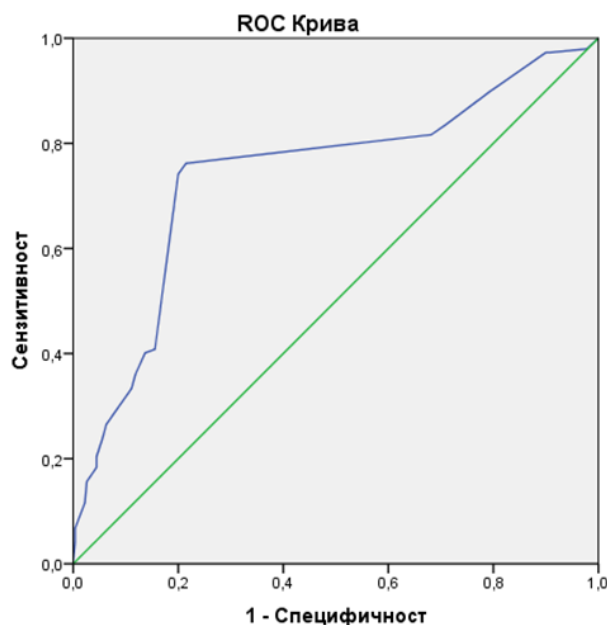
Утврђено је да не постоји значајна корелација између експресије рецептора за естрогене и прогестерон и експресије *GLB1* у *IBC* (*Spearman* ρ) (Фигура 41).



Фигура 41. Експресија *GLB1* у зависности од експресије *ER* и *PR*. Експресија *ER* и *PR* анализирана је кроз *Allred* скор. Не постоји статистички значајна експресија *GLB1* у односу на експресију **А.** *ER* ($p=0,846$, $\rho=0,014$) и **Б.** *PR* ($p=0,489$, $\rho=-0,058$).

4.6.3. Експресија *GLB1* као маркера прогресије карцинома дојке

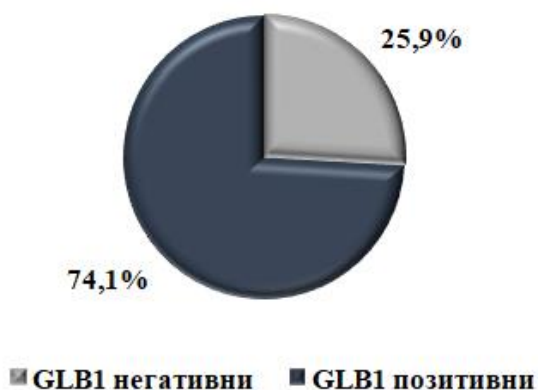
Добијена *ROC* крива приказана на Фигури 42, указују да повећана експресија *GLB1* може бити поуздан маркер прогресије *IBC* ($AUC = 0,740$; $p < 0,001$). Резултати анализе указују да гранична вредност од 27,5% *GLB1* позитивних туморских ћелија омогућава раздвајање пацијенткиња са *IBC* од пацијенткиња са *NIL* (сензитивност 74,1%, специфичност 80,0%).



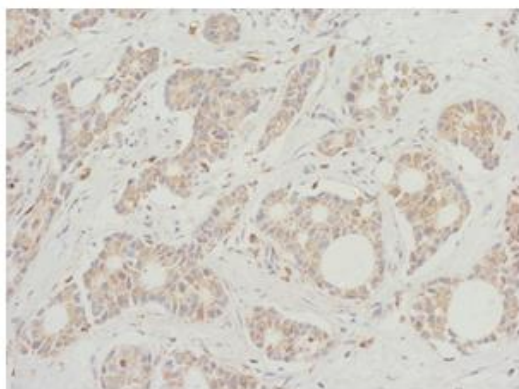
Фигура 42. *ROC* крива експресије *GLB1* у *NIL* и *IBC*. Израчуната вредност $AUC=0,740$ уз сензитивност 74,1% и специфичност 80,0% одређена је гранична вредност од 27,5%.

Након анализе и добијене граничне вредности сви *IBC* су свртани у групу са негативном ($\leq 27,5\%$) и позитивном ($>27,5\%$) експресијом *GLB1* (Фигура 43А). На Фигури 43Б-В приказана је имунохистохемијска експресија *GLB1* у односу на граничну вредност.

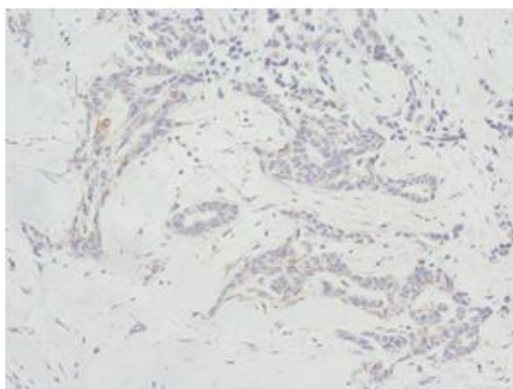
GLB1 cut off 27,5%



Б.



В.



Фигура 43. А. Учесталост *GLB1+* и *GLB1-* *IBC* у односу на граничну вредност експресије *GLB1*. Микроскопска слика експресије *GLB1* у односу на граничну вредност: Б. *GLB1+* и В. *GLB1-* (имунохистохемијска анализа, оригинално увећање 200x).

Показана је повезаност експресије *GLB1* са следећим клиничко-патолошким карактеристикама: хистолошки градус, нуклеарни градус, молекуларни подтип *IBC*, *HER2* статус (Табела 8). Укупно 94,7% *IBC* који су били негативни у односу на експресију *GLB1*, су такође били и *HER2* негативни, док је код *GLB1* позитивних било њих 26,2% *HER2* позитивно. Повезаност експресије *HER2* је показана и када се посматрају молекуларни подтипови *IBC*, односно код *GLB1* негативних није било *HER2+* подтипа *IBC*, док код *GLB1* позитивних тај проценат износи 17,4%. Насупрот томе највећи проценат односно 55,1% *GLB1* негативних спада у *TNBC* молекуларни подтип док у овај молекуларни подтип од *GLB1* позитивних спада само један *IBC* односно 0,9%.

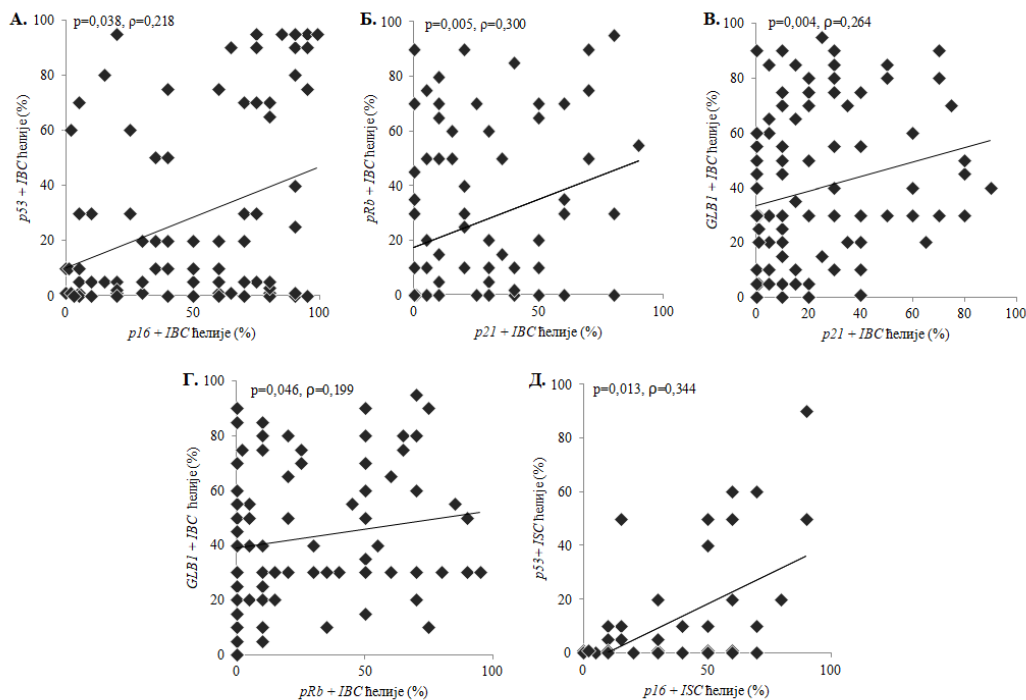
Табела 8. Повезаност експресије *GLB1* у *IBC* и испитиваних клиничко-патолошких карактеристика.

Клиничко-патолошке карактеристике	<i>GLB1 cut off 27,5%</i>		<i>Chi-Square</i>	<i>p</i>	
	-	+			
Стромални мнуклеарни инфилтрат	одсутан	2 (6,5%)	2 (3,2%)	3,892	0,273
	низак	10 (32,3%)	33 (53,2%)		
	умерен	14 (45,2%)	21 (33,9%)		
	висок	5 (16,1%)	6 (9,7%)		
Фибробласти	негативно	4 (22,2%)	13 (17,3%)	0,020	0,887
	позитивно	14 (77,8%)	62 (82,7%)		
Хистолошки тип	лобуларни	4 (10,8%)	14 (13,0%)	0,120	0,942
	дуктални	32 (86,5%)	91 (84,3%)		
	остало	1 (2,7%)	3 (2,8%)		
Хистолошки градус	градус 1	2 (5,3%)	15 (14,3%)	10,016	0,007
	градус 2	14 (36,8%)	59 (56,2%)		
	градус 3	22 (57,9%)	31 (29,5%)		
Нуклеарни градус	градус 1	2 (6,7%)	15 (18,3%)	8,080	0,018
	градус 2	14 (46,7%)	50 (61,0%)		
	градус 3	14 (46,7%)	17 (20,7)		
Некроза тумора	одсутна	5 (16,7%)	21 (23,3%)	0,262	0,609
	присутна	25 (83,3%)	69 (76,7)		
Перинеурална инвазија	одсутна	27 (71,1%)	74 (67,9%)	0,025	0,874
	присутна	11 (28,9%)	35 (32,1%)		
Лимфна инвазија	одсутна	14 (36,8%)	58 (53,2%)	2,402	0,121
	присутна	24 (63,2%)	51 (46,8%)		
Васкуларна инвазија	одсутна	31 (81,6%)	82 (75,2%)	0,639	0,424
	присутна	7 (18,4%)	27 (24,8%)		
Молекуларни подтип <i>IBC</i>	<i>Lum A</i>	5 (13,2%)	25 (22,9%)	67,563	0,000
	<i>Lum B</i>	12 (31,6%)	64 (58,7%)		
	<i>HER2 +</i>	0 (0,0%)	19 (17,4%)		
	<i>TNBC</i>	21 (55,3%)	1 (0,9%)		
<i>HER2</i>	негативни	36 (94,7%)	79 (73,%)	6,249	0,012
	позитивни	2 (5,3%)	28 (26,2%)		
<i>Ki67</i>	низак	7 (20,0%)	23 (21,3%)	0,433	0,805
	умерен	9 (25,7%)	33 (30,6%)		
	висок	19 (54,3%)	52 (48,1%)		
<i>T</i> статус	<i>T1</i>	10 (28,6%)	38 (38,4%)	2,457	0,507
	<i>T2</i>	18 (51,4%)	46 (46,5%)		
	<i>T3</i>	4 (11,4%)	5 (5,1%)		
	<i>T4</i>	3 (8,6%)	10 (10,1%)		
<i>N</i> статус	<i>N0</i>	9 (25,0%)	41 (41,8%)	4,862	0,182
	<i>N1</i>	13 (36,1%)	35 (35,7%)		
	<i>N2</i>	8 (22,2%)	11 (11,2%)		
	<i>N3</i>	6 (16,7%)	11 (11,2%)		

У односу на хистолошки градус, *IBC* који су *GLB1* негативни у највећој мери су хистолошког градуса 3 57,9% (22), док код *GLB1* позитивних највећи проценат спада у градус 2 односно 56,2% (59). Такође, у односу на нуклеарни градус, код *GLB1* негативних, подједнак је проценат *IBC* који су градус 2 и градус 3 односно 46,7% (14) док код *GLB1* позитивних 61,0% (50) спада у градус 2.

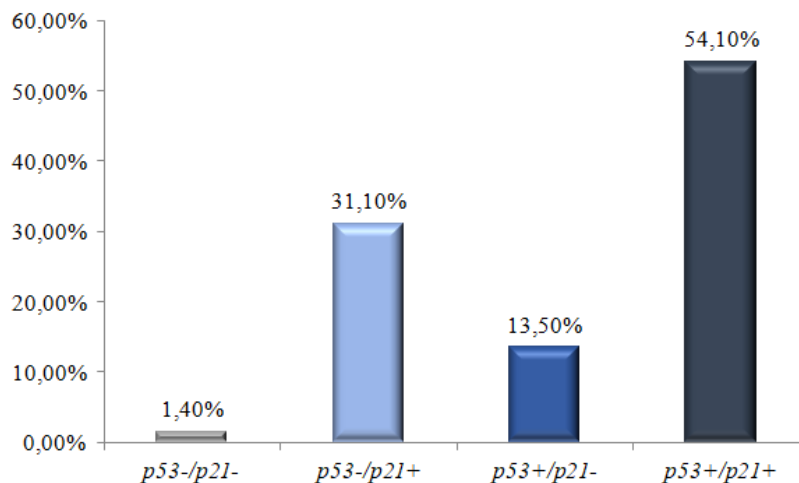
4.7. Анализа међусобних односа експресије маркера *OIS*

Испитивана је повезаност између различитих белега *OIS* (*p16*, *p21*, *p53*, *pRb* и *GLB1*) у свакој од група у односу на цитолошке промене (*IBC*, *ISC*, *AH* и *NE*) (*Spearman ρ*). Код *IBC*, статистички значајна корелација је утврђена између експресије *p16* и *p53*, између *p21* и *pRb*, *p21* и *GLB1*, као и између *pRb* и *GLB1*. Такође, значајна корелација постоји и између *p16* и *p53* у оквиру *ISC* групе (Фигура 44). Код *AH* и *NE* није показана статистички значајна корелације у експресији између испитиваних параметара.



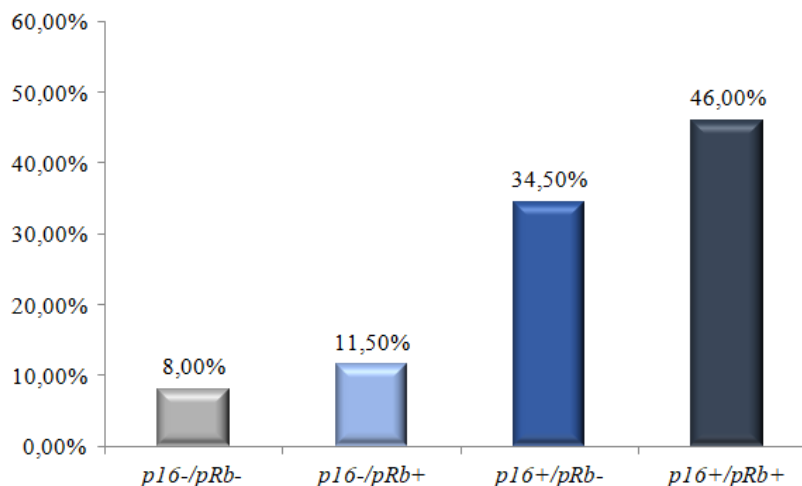
Фигура 44. Корелација експресије између *p16*, *p21*, *p53*, *pRb* и *GLB1* у оквиру група у односу на цитолошке промене у епителу. Између А. *p16 IBC* и *p53 IBC* ($p=0,038$, $\rho=0,218$), В. *p21 IBC* и *GLB1 IBC* ($p=0,004$, $\rho=0,264$) као и Г. *pRb IBC* и *GLB1 IBC* ($p=0,046$, $\rho=0,199$) утврђена је слаба позитивна корелација док је између Б. *p21 IBC* и *pRb IBC* ($p=0,005$, $\rho=0,300$), и Д. *p16 ISC* и *p53 ISC* ($p=0,013$, $\rho=0,344$) утврђена умерена позитивна корелација.

Сви *IBC* су сврстани на основу претходно дефинисаних *cut off* вредност за експресију *p53* и *p21* у једну од следећих група $p53-/p21-$, $p53-/p21+$, $p53+/p21-$ и $p53+/p21+$. Највећи број *IBC* односно 40 (54,1%) спада у групу $p53+/p21+$ (Фигура 45).



Фигура 45. Учесталост *IBC* у односу на експресију *p53* и *p21*. Сви *IBC* су класификовани на: *p53*-/*p21*-(*n*=1), *p53*-/*p21*+ (*n*=23), *p53*+/*p21*-(*n*=10) и *p53*+/*p21*+ (*n*=40).

Такође, у односу на дефинисане *cut off* вредности за експресију *p16* и *pRb* сви *IBC* су сврстани у следеће групе *p16*-/*pRb*-, *p16*-/*pRb*+, *p16*+/*pRb*- и *p16*+/*pRb*+. Укупно 40 *IBC* односно 46,0% спада у групу *p16*+/*pRb*+ (Фигура 46).



Фигура 46. Учесталост *IBC* у односу на експресију *p16* и *pRb*. Сви *IBC* су класификовани на: *p16*-/*pRb*-(*n*=7), *p16*-/*pRb*+(*n*=10), *p16*+/*p21*-(*n*=30) и *p16*+/*p21*+ (*n*=40).

5. ДИСКУСИЈА

Карцином дојке је најчешћи малигнитет код жена широм света и представља веома хетерогену болест(1). Повећани програм скрининга и свест имају значајан утицај на стопу преживљавања код карцинома дојке. Рано откривање омогућава и рано ефикасно лечење(378). Међутим, још увек постоји потреба да се разуме основни аспект туморогенезе дојке. Утврђено је да маркери повезани са сенесценцијом играју важну улогу у развоју широког спектра људских карцинома. Бројна истраживања указују на парадоксалну улогу ћелијске сенесценције у карциномима(324). Толико је интересовање за ћелијску сенесценцију у туморогенези да се сугерише да се „индекс сенесценције“ може користити као прогностички индикатор и да би употреба онкогеном индукованих маркера сенесценције у клиници могла бити корисна у откривању карцинома у раној фази болести.

Пут ћелијске сенесценције је заштитни механизам ћелија против мутација неповратним заустављањем раста. За разлику од апоптозе, сенесцентне ћелије су и даље метаболички активне упркос њиховој трајној цитостатској фази. Биолошки, постоје два основна подтипа сенесценције и то репликативна сенесценција и онкогенима индукована сенесценција. Репликативна сенесценција углавном укључује прогресивно скраћивање теломера, док онкогенима индукована сенесценција може бити покренута активираним онкогеном *RAS*, оштећењем *DNA* или другим ћелијским стресом преко два добро успостављена пута; односно *p16-pRb* и *p53-p21*(379). Познато је да у патогенези карцинома дојке *p53*, *p21*, *p16* и *pRb* играју важну улогу у контроли ћелијског циклуса(379). Свака фаза ћелијског циклуса је строго регулисана у нормалним ћелијама. Међутим, након излагања митогеним стимулансима, ове регулаторне компоненте постају дерегулисане, што предиспонира ћелијску трансформацију епителних ћелија дојке. Бројне студије имплицирају улоге онкогених и тумор-супресивних компоненти у различитим типовима карцинома код људи, укључујући иницијацију и развој карцинома дојке(380-382). Постоје значајне информације о регулацији и улози компоненти ћелијског циклуса у ћелијама карцинома дојке, а претходне студије могу се користити у терапијске сврхе. Налази из експерименталних студија такође подржавају да су промене у овим компонентама клинички значајне(383).

5.1. *p16*

Молекуларно профилисање пружило је доказе о хетерогености тумора дојке, па стога постоји стални интерес за идентификовањем нових маркера који ће помоћи у предвиђању прогнозе и одговору на терапију. Један од маркера који је протеклих неколико година у жижи интересовања је инхибитор ћелијског циклуса *p16*. Резултати нашег истраживања су показали да се експресија повећава од *NE*, преко *AH* и *ISC* до *IBC*. У складу са чињеницом да је *p16* тумор супресорски протеин, његова експресија се повећава са повећањем пролиферације епителних ћелија, као природни одговор тумор супресора да се супростави неконтролисаном расту. У таквим околностима експресија би требала да достигне свој максимум у *ISC* променама, а затим и плато код *IBC*, што би указивало на улогу *p16* у спречавању малигне трансформације преинвазивних промена у дојци(183). Бенигни тумори прекомерно експримирају *p16*, који инхибира пролиферацију ћелија као одговор на онкогене стимулусе, штитећи ћелије од малигне трансформације. Међутим, активацијом алтернативних сигналних путева, туморска супресија зависна од *p16*, у неким случајевима, неће испољити адекватну функцију што ипак резултује неконтролисаним и несврхисходном пролиферацијом ћелија(180, 384). На основу тога, експресија *p16* може имати дијагностички значај у диференцијацији

премалигних и малигних лезија(182). *OIS* има снажну антитуморску улогу, што је показано у различитим бенигним лезијама попут невуса, неурофиброма и шванома, а праћена је прекомерном експресијом *p16* и заустављањем ћелијског циклуса(181, 337, 385-388). Насупрот, малигне форме ових тумора показују слабу или потпуно одсутну *p16* имунореактивност што се доводи у везу са малигном трансформацијом и прогресијом(386, 387, 389, 390).

Резултати наше студије показују значајно већу *p16* експресију у групи *IBC*, него у *NIL*. Прогресивно повећање експресије *p16* од нормалног ткива до неопластичног, описано је код више различитих малигнитета(266, 281-283, 288, 391, 392). Сличан образац је примећен у променама коже где се експресија *p16* повећава од ниских нивоа код премалигних лезија (актиничне кератозе) до високих нивоа експресије у *in situ* и инвазивним карциномима(393, 394). Поред тога, показана је повећана једарна експресија *p16* у премалигним и малигним лезијама жучне кесе, у поређењу са нормалним епителом(395). Проучавањем цитолошких промена у сквамозном епителу грлића материце, доказана је значајно већа експресија *p16* у инвазивном карциному у односу на експресију у нискоградусним и високоградусним диспластичним сквамозним интраепителним лезијама, па је предложено да се овај маркер може користити у диференцијацији неинвазивних од инвазивних промена цервикса(279).

Ekundina и сарадници показују већу експресију *p16* у инвазивном карциному у односу на неинвазивне промене у дојци(396). Сличне резултате су показали у својој студији *Rahmawati Pare* и сарадници(183). Резултати ове и других студија су у складу са нашим и показују да појачана експресија *p16* у малигном ткиву дојке корелира са негативним статусом *ER* и *PR*(183, 397-399).

Поред тога, ми указујемо да је појачана експресија *p16* праћена повишеним индексом пролиферације одређиваним нуклерном експресијом *Ki67*, о чему извештавају и други аутори(400-403). Овакви резултати индиректно показују да висока експресија *p16* претпоставља лошију прогнозу болести. Протеин *p16* је присутан у *G1* фази ћелијског циклуса и има веома дуг полуживот због чега се акумулира у ћелијама са порастом броја деоба. Ово делимично може објаснити већу *p16* експресију у високо пролиферативним ћелијама тумора него у ћелијама нормалног епитела дојке, а такође може бити разлог и за позитивну корелацију *p16* експресије и *Ki67* маркера пролиферације. *Gauthier* и сарадници су показали да жене са патохистолошком дијагнозом *ISC* које експримирају висок *p16* и висок *Ki67* развијају нови тумор, па у складу са овим *Ki67* класификује високу експресију *p16* у две групе: оне код којих се развије накнадни рак дојке и другу групу жена код којих се то не догоди. Тумори који се развијају након *ISC* са високом експресијом *p16* / високим *Ki67* често су изразито инвазивни карциноми дојке. Преостали *ISC* који показују високу *p16* имунопозитивност имали су низак *Ki67*, што указује на то да су ове ћелије задржале регулацију контролне тачке *p16/pRb*. Заиста, већина лезија које показују фенотип високе експресије *p16* / ниског *Ki67* нису биле повезане са рецидивом *ISC* или појавом *IBC*(404). У испитивању *Kerlikowske*, *p16* је био једини појединачни маркер који је корелирао са инвазивним рецидивом након *ISC*(405).

Наша анализа молекуларних типова *IBC* показала је да највећу експресију *p16* имају *HER2+* и *TNBC*. *Shin* и сарадници извештавају о повезаности високе експресије *p16* са Луминалним Б и *HER2+* туморима (406), док су друге студије представиле резултате сличне нашим, што се посебно односи на повезаност високе експресије *p16* у *TNBC*(407-409).

У различитим бенигним и малигним променама, примећено је да се експресија *p16* може појавити у једру и/или у цитоплазми истовремено, што упућује да различита локализација *p16* има другачију улогу у процесу пролиферације и туморогенезе(410).

Анализом резултата нашег истраживања, уочили смо тренд пораста епителне цитоплазматске експресије *p16* од *NE*, преко *AN* и *ISC* до *IBC*, где је експресија уједно била и највећа, за разлику од једарне експресије која је била највећа у *NE* и прогресивно се смањивала ка *IBC*. Сличне резултате показали су *Feriancova* и сарадници, где је једарна експресија била изражена у неинвазивним лезијама дојке, а цитоплазматска експресија је била само код инвазивног карцинома(411). Такође, у другим истраживањима је показано да је у туморима дојке експресија *p16* била ограничена на једру у фиброаденому, а једарно-цитоплазматска или искључиво цитоплазматска експресија се уочавала код карцинома(266, 281). Бројне студије су покушале да објасне значај различите субцелуларне локализације *p16* протеина. Регулација ћелијског циклуса, као најважнија функција *p16*, одвија се у једру. С друге стране цитоплазматско бојење у неким туморима је указивало на туморску прогресију и лошу прогнозу(412). Цитоплазматска експресија *p16* се може објаснити стварањем комплекса *p16* са секвестрираном *CDK4*, који не може проћи кроз нуклеарну мембрану и последично се акумулира у цитоплазми(283, 413, 414). Даље, његова локализација може да зависи од пост-транслацијских модификација или његове способности да формира комплекс са другим протеинима(415). *p16* у цитоплазми интерагује са различитим протеинима, на пр. са α - β - γ актином и α - β тубулином који имају улогу у миграцији ћелија и изградњи ћелијског цитоскелета(416). Још један протеин, повезан са аберантном акумулацијом *p16* у цитоплазми је анјонски измењивач 1 (енгл. *anion exchanger 1*, *AE1*). Интеракција трансмембранског протеина *AE1* и *p16* у карциномима желуца и дебелог црева, резултује секвестрацијом *p16* и доводи до акумулације оба протеина у цитоплазми. Такође, *Shen* и сарадници показују да смањена функција *AE1* индукује ослобађање и прелаз *p16* из цитоплазме у једру, што доводи до ћелијске смрти и инхибиције раста тумора(417). Због свега наведеног, локализација *p16* у цитоплазми може представљати алтернативни механизам за модулацију различитих сигналних путева, уместо једноставног начина за инактивацију функције контроле ћелијског циклуса(413).

Занимљив резултат нашег истраживања је да у *p16* позитивним *IBC*, постоји израженији интра и перитуморски моноклеарни инфилтрат, као и већа експресија *p16* у фибробластима строме. Група аутора је испитивала *p16* експресију у строми муцинозног карцинома грлића материце и дошла до закључка да прекомерна експресија *p16* у стромалним ћелијама доприноси расту, прогресији и агресивнијем понашању овог тумора(418). Публиковани резултати сугеришу да *p16* протеин подстиче инвазивност кроз интеракције са другим молекулима повезаним са миграцијом туморских ћелија(413, 419-422). Прекомерна експресија *p16* у туморским ћелијама и фибробластима строме доприноси напредовању тумора излучивањем проупалних цитокина (*IL-1*, *IL-6* и *IL-8*) и ензима попут протеаза (енгл. *matrix metalloproteinases* - *MMP*)(314, 423, 424). Дуготрајно присуство оваквих ћелија одржава хронично инфламаторно микроокружење које је суштински туморогено(425, 426). Даље, модулира друге важне особине карцинома локалним олакшавањем неоваскуларизације(353), епителијално-мезенхимске транзиције(302, 355), инвазије тумора (427, 428) и ћелијске пластичности(208). *p16* позитивни фибробласти строме продукују молекуле који могу поспешити развој тумора *in vivo* и настанак малигног фенотипа у моделима ћелијских култура. Ови ефекти су примећени код великог броја ћелијских типова, укључујући ћелијске линије тумора дојке(355, 357, 429-431), коже(432), простате(355, 433), панкреаса (434) и оро-фарингијалне мукозе(344). Један од најнепосреднијих, протуморогених учинака је поспешивање пролиферације епителних ћелија. У случају паренхима дојке, фибробласти строме подстичу пролиферацију премалигнух и малигнух епителних ћелија(355, 429, 431). Такође је показано да стромални фибробласти плућа човека могу промовисати раст тумора,

стимулишући ангиогенезу лучењем повећане концентрације проангиогених фактора, од којих је један васкуларни ендотелни фактор раста (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF*)(353). Све наведено указује да експресија *p16* у фибробластима строме и израженији моноклеарни инфилтрат утичу на раст и прогресију различитих неоплазми, укључујући и *IBC*.

5.2. *p53*

p53 се налази на кратком краку хромозома *17p*. Производ гена *TP53* је протеин који делује тако што се везује за *DNA* да би регулисао ћелијски циклус(435). Од открића *p53* 1979. године, спроведене су опсежне студије, које су утврдиле кључну улогу *p53* у супресији тумора(214, 225). Губитак функције дивљег типа *p53* кроз мутације гена *TP53* и других механизма као што је прекомерна експресија негативних регулатора *p53* (нпр. *MDM2*, *MDM4* и *PPM1D* – енгл. *Protein Phosphatase Magnesium-Dependent 1 Delta*) је познат предуслов за иницирање и/или напредовање многих карцинома код људи(214, 225). Као фактор транскрипције, *p53* извршава своју функцију супресије тумора углавном кроз везивање за *p53* елементе који везују *DNA* у својим циљним генима како би регулисао њихову експресију. Кроз транскрипциону регулацију ових гена, *p53* игра критичну улогу у многим важним биолошким процесима, укључујући апоптозу, заустављање ћелијског циклуса, сенесценцију, поправку *DNA*, ћелијски метаболизам и антиоксидантну одбрану, који доприносе функцији *p53* у супресији тумора(214).

Ген *TP53* је најчешће мутирани ген хуманих тумора(436). Занимљиво је да за разлику од многих других гена супресора тумора, као што су *BRC1*, *pRb* и *APC*, који се обично инактивирају брисањем или скраћивањем мутација код карцинома, већина мутација *TP53* у канцерима су мисенс мутације, што доводи до производње мутираног *p53* протеина пуне дужине. са само једном супституцијом аминокиселине(437). Мутирани протеин *p53* има тенденцију да има продужени полуживот и тада може бити откривен коришћењем специфичних антитела у ткиву и ћелијама(438, 439).

Имунохистохемијском анализом експресије *p53* смо показали да се експресија повећава од *NE*, преко *AH* и *ISC* до *IBC*. У истраживању *Ekundina* и сарадника показали су сличне резултате, при чему су показали повећање експресије *p53* од нормалног ткива, преко фиброаденома до инвазивног дукталног карцинома где је експресија уједно била и највећа(440). У другој студији имунореактивност *p53* у нормалним и бенигним ткивима генерално је представљена као слабо нуклеарно бојење, при чему се експресија повећавала како лезија напредује од премалигних до малигних промена(441). Генерално, у овој студији се експресија *p53* повећава од нормалног ткива до *AH* и *ISC*, а затим се благо смањује од *ISC* до *IBC*. Даље, открили су да је вероватније да ће одговарајуће нормално ткиво које је позитивно обојено бити даље позитивно у пролиферативнијим лезијама. Међутим, већа је вероватноћа да ће *p53* бити смањене експресије у *IBC*, него у *ISC*(441). Овакав налаз је у складу за туморсупресорском функцијом *p53* дивљег типа, који има улогу да спречи настанак инвазивног тумора посредовањем у регулаторним путевима ћелијског циклуса било преко заустављања ћелијског циклуса, апоптозе или ћелијске сенесценције(217). Међутим, наши резултати показују највећу експресију *p53* у *IBC*, што указује на абнормалности гена, које могу довести до настанка инвазивног карцинома, након акумулације многих мутација у истим ћелијама(442). Инвазивни карцином може настати након што ћелије надмаше регулаторне механизме ћелијског циклуса када се јаве мутације у самом гену за сузбијање тумора. Пријављено је да су мутације *p53* једна од најчешћих познатих генетских промена у различитим карциномима код људи. Више од 75% мутација не утиче на транслацију протеина *p53*, али мутирани протеин *p53* губи

функције дивљег типа(443). Мутант *p53* је стабилнији у поређењу са краткотрајним *p53* дивљег типа(444). Дуго присуство самог мутантног *p53* може имати онкогени ефекат на ћелије(445). Мутирани *p53* може да олакша инвазивност *IBC* олакшавањем настанка *EMT*. Мутант *p53* може да веже и секвестрира свог сродника *p63*(446). Ово компромитује функцију *p63*, која нормално инхибира *EMT*, миграцију и инвазију, промовишући пролиферацију ћелија(447). Мутација *p53* може изазвати *EMT* и метастазе помоћу неколико других механизма. Прво, дивљи тип *p53* формира троструки комплекс са *MDM2* (енгл. *Murine Double Minute-2*) и *SLUG* (енгл. *Zinc-Finger Transcription Factor*) како би промовисао деградацију овог *EMT* индуктора(448), док мутација *p53* појачава експресију *SLUG*-а супротстављајући се његовој деградацији што омогућава *EMT*. Друго, дивљи тип *p53* директно потискује експресију гена за рецептор хијалуронске киселине (*CD44*), док мутант *p53* надјачава овај ефекат(449). Треће, доминантно негативан *p53* појачава рециклирање интегрина који везује фибронектин (као што је $\alpha 5\beta 1$ - интегрин) и *EGFR* (енгл. *Epidermal Growth Factor Receptor*), чиме се промовише покретљивост и инвазија(450, 451). Претходни извештаји сугерисали су да позитивна експресија *p53* представља типичну карактеристику за *IBC* и да је обећавајући биомаркер за прогресију *ISC*(452-454). Такође, поједина истраживања сугеришу да *ISC* са високом експресијом *p53* могу бити директни прекурсорни суседног *IBC* и да *ISC* подгрупа са високом експресијом *p53* може представљати „агресиван“ тип *ISC*. Резултати ове студије још указују на то да неке генетске промене морају настати у раној прекурсорској ћелији и њих наслеђују ћелије ћерке које постају све абнормалније јер сазревају. Да би ћелије напредовале у *IBC*, *ISC* ћелије морају стећи додатне генетске или епигенетске промене које дају предност преживљавању за ове ћелије у односу на оне без измена. Овај модел прогресије карцинома дојке може објаснити зашто неки *ISC*, али не и други, касније развијају *IBC*. Највероватније, није сваки *ISC* унутар истог пацијента способан да напредује до *IBC* због индивидуалне хетерогености међу *ISC* лезијама. Само оне лезије са агресивнијим карактеристикама, укључујући, али не ограничавајући се на присуство мутантног *p53* погодне су за напредовање карцинома дојке(455). *Rivero* и сарадници су такође показали већу експресију *p53* код малигних и граничних филодних тумора у поређењу са бенигним, што помаже у дијагностици и разликовању ових промена(456).

Показали смо значајну повезаност између *p53* и *TNBC* у складу са претходним студијама које су указане на корелацији експресије *p53* и *TNBC* са пратећим агресивним понашањем тумора, млађим узрастом при постављању дијагнозе, високим градусом тумора, метастазама и лошијом прогнозом(457, 458). Овај налаз указује на губитак транскрипционе функционалности *p53* у одржавању геномског интегритета изазивањем апоптозе, заустављања ћелијског циклуса и сенесценције како би се зауставило напредовање рака дојке са прекомерном експресијом *p53*(459). Такође су у другим студијама показали значајну повезаност између прекомерне експресије *p53* и *TNBC*(460). *TNBC* који показују високу експресију *p53* су најчешће повезани са високим хистолошким градусом, израженијом некрозом и присутним интратуморским лимфоцитним инфилтратом(461).

У даљем истраживању испитивали смо повезаност експресије *p53* са вредностима других стандардних прогностичких параметара (хистолошког и нуклеарног градуса, митотског индекса, инвазије крвних и лимфних судова, перинеуралне инвазије, стромалне моноклеарне реакције, статуса метастатски измењених лимфних чворова аксиле, величином тумора, експресије *ER*, *PR*, *HER2* и *Ki67*). Анализом смо утврдили значајну повезаност између експресије *p53* и присутне некрозе у тумору. Овакав резултат је у складу са налазима ранијих студија које су показале да је мутација гена за *p53* у карциному дојке праћена бржим растом тумора и

присутством некрозе у туморском ткиву(462). Традиционално, некроза се сматра прогностички неповољним параметром у карциному дојке. Показано је да садржај некротичних ћелија појачава ангиогенезу и пролиферацију ендотелних ћелија, индукује неоваскуларизацију и повећава миграцију, инвазију и интеракције ћелија-ћелија(463). Узето заједно, чини се да некроза ћелија олакшава и инвазију и миграцију, чиме подстиче прогресију карцинома.

Такође, експресија *p53* је била значајно повезана са прекомерном *HER2* експресијом и са високом експресијом индекса пролиферације *Ki67*, са вишим нуклеарним градуом и са присутном лимфном инвазијом, али у негативној корелацији са *ER* и *PR*. Утврђено је да су гени *HER2* и *TP53* присутни на хромозому 17 (*17q21* и *17p13.1*, редом) и да постоји јака повезаност између прекомерне експресије *HER2* и мутација *TP53* код карцинома дојке(464). Бројне студије су показале повезаност прекомерне експресије *HER2* и експресије *p53*(465-467), али су у студији *Román-Rosales* и сарадници показали да прекомерну експресију *HER2* индукују мутанти *p53* преко *HER2* транскрипционе активације(468). Ацетиловани *H3* и *H4* хистони су повезани са *HER2* проксималним промотером у присуству мутаната *p53^{R248K}* и *p53^{R273C}*. Међутим, потребно је више студија да би се потпуно разјаснио механизам помоћу којег мутанти *p53* могу индуковати усходну регулацију *mRNA HER2* и прекомерну експресију протеина(468). Сличне резултате су показали и *Fedorova* и сарадници(469). Показали су да у *HER2* позитивним туморима, нивои *HER2 mRNA* су значајно виши у узорцима са мутантним *p53* у поређењу са узорцима са дивљим типом *p53*. С друге стране, код *HER2* негативних тумора, ниво *HER2 mRNA* је значајно нижи у узорцима са мутантним *p53* у поређењу са узорцима са дивљим типом *p53*. Сумирано ови подаци указују на повезаност између присуства мутантног *p53*, али не и дивљег типа, и експресије *HER2*(469). У моделу миша, показало се да мутирани *p53^{R172H}* интерагује са онкогеном *HER2* сигнализацијом у развоју рака дојке. Аутори су открили да мутирани *p53* појачава *HER2* сигнализацију, чиме се олакшава пролиферација ћелија рака дојке и повећава популација матичних ћелија рака дојке(470). Мутирани *p53* може повећати ниво *HER2* појачањем транскрипционе активности *HSF1* (енгл. *Heat Shock Factor 1*), чија је мета (између неколико других) пратилац *Hsp90* (енгл. *Heat Shock Protein 90*), који заузврат стабилизује *HER2* и сам мутирани *p53* на нивоу протеина(471). Дакле, статус *p53* (да ли је дивљи или мутирани облик) утиче на експресију *HER2* на супротне начине, промовишући пролиферацију или апоптозу туморских ћелија(472). Међутим нека истраживања су показала супротне налазе нашим, тј. експресија *p53* је била праћена негативним *HER2*(408, 473).

На изражену пролиферативну активност тумора који су у нашем истраживању показали експресију *p53* указује и њихова повезаност са индексом ћелијске пролиферације *Ki67*. Наиме, већа експресија *p53* је била у туморима који показују висок *Ki67* што је у складу са другим студијама(474-476). Позитивна корелација између ова два молекула указује на њихов синергистички ефекат. Прекомерно експримирани *p53* промовише раст туморских ћелија, што доводи до повећане инвазивности тумора и метастаза. *Ki67* је једарни маркер који показује експресију у свим фазама ћелијског циклуса, изузев у *G0*, са полуживотом од само 60 до 90 минута(477). Због тога се користи као пролиферативни индекс туморских ћелија, а на његов прогностички значај за процену преживљавања у последње време се све више указује(478-482). *p53* суштински утиче на експресију гена *Ki67*, међутим, његов регулаторни механизам транскрипције у последње време није јасан. *Wang* је са сарадницима испитивао утицај *p53* на експресију гена *Ki67*. Открили су да *p53* везујући мотиви посредују у трансрепресорној активности *Ki67* промотера. Међутим, мутацијом

у гену за *p53* ова улога се губи, што индиректно показује повезаност експресије *p53* протеина и индекса пролиферације *Ki67*(483).

Даље смо утврдили негативну корелацију између експресије *p53* и експресије *ER* и *PR* у складу са другима(73, 484). Постоје два облика *ER* и то *ERα* и *ERβ*. Утврђено је да *ERα* интерагује са *p53* на промоторима *p53* циљних гена, као што су *p21* и *PCNA*, и потискује транскрипциону активност *p53*(485). Друго, *ERα* је мета *p53*. У ћелијама *MCF-7*, ектопична експресија *p53* је повећала експресију *ERα*, док је у нокдаун мишевима код којих је смањена (утишана) експресија гена за *p53*, била смањена експресија *ERα*(486). Третман оштећења *DNA* доксорубицином или јонизујућим зрачењем повећао је нивое *p53*, а потом и *ERα* протеина и *mRNA* за *ERα*. Поред тога, ефекат оштећења *DNA* на експресију *ERα* може бити додатно побољшан прекомерном експресијом *p53*(487). До данас, многе студије клиничких случајева карцинома дојке дале су опречне резултате, али свеукупно, примећена је корелација између *ERα* и *p53*: то јест, *p53* је првенствено дивљег типа код *ER*-позитивног карцинома дојке и мутантног типа код *ER*-негативног карцинома дојке. Многе недоследности потичу од мале величине узорка и методе одређивања статуса *p53*. Иако постоје многи други фактори који доприносе настанку тумора, *ER*-позитивни карциноми чине већину случајева карцинома дојке, грлића материце и ендометријума. Није познато како *ER*-позитивни тумори са дивљим типом *p53* напредују да постану *ER*-негативни тумори са мутантним *p53*, иако се претпоставља да је мутант *p53* у стању да транскрипцијски потисне *ERα* транскрипцију(488). Регулаторна петља позитивне повратне спреге између *ERα* и *p53* може објаснити зашто тумори са мутираним *p53* имају тенденцију да буду *ER*-негативни, а *ER*-негативни карциноми дојке губе експресију *p53* дивљег типа и последично постају агресивни тумор. То су покушали да објасне *Shirley* и сарадници идентификовањем транскрипционих механизма који објашњавају уочену корелацију између функције *p53* и експресије *ER* код карцинома дојке код људи. У овом истраживању су показали да *p53* регулише експресију *ER*, обезбеђујући механизам за објашњење подударности експресије дивљег типа *p53* и *ER* и високе фреквенције негативности *ER* примећене код тумора са мутацијама *p53*. Штавише, њихови налази сугеришу да ране мутације и/или губитак функционалног *p53* током туморогенезе могу довести до *ER* негативних карцинома дојке, што утиче на прогресију тумора и одговор на антихормонску терапију(487). Међутим, још увек постоји значајан број *ER*-позитивних случајева карцинома дојке са мутираним *p53*, што се не може објаснити овом хипотезом(465, 489). У једној студији су испитали и утврдили позитивну корелацију између *ERβ* и *p53*. Поред тога што делује као коактиватор, *ERβ* може повећати активност *p53* промовисањем његове стабилности и нуклеарне транслокације. Даље, показали су да *ERβ* реагује са дивљим типом *p53* и умањује инхибиторни ефекат *ERα* на функцију *p53*. Ефекат *ERβ* на *p53-ERα* асоцијацију може се објаснити његовом директном асоцијацијом или са *p53* или *ERα* и сугерише да се конкуренција између *ER* подтипова за сарадњу са *p53* на нивоу транскрипције може јавити у ћелијама које експримирају оба рецептора. Дакле, однос *ERβ* наспрам *ERα* и њихов афинитет за везивање *p53* су кључни фактори у одређивању активности *p53* у ткивима која реагују на естроген. Ови резултати указују на улогу *ERβ* као корегулатора који чува активност супресора тумора *p53*. Да би се ово постигло, рецептор може другачије да делује на дивљи тип и мутантни *p53* због њиховог формирања различитих транскрипционих комплекса. Само мутантни *p53* ступа у интеракцију са *p63* и *p73* и због своје поремећене активности везивања *DNA*, често се везује за специфичне *DNA* секвенце преко других фактора транскрипције. Везивањем за антимеристатски *p63* и спречавањем његове нормалне транскрипционе активности, мутантни *p53* промовише ћелијску инвазију. Зато интеракција *ERβ* са мутантним *p53-p63* комплексима умањује

инхибиторни ефекат мутантног *p53* на *p63* омогућавајући активацију транскрипције *p63* која смањује инвазивност тумора(490). Овакво дејство *ERβ* може да оправда налазе појединих аутора где је *p53* био у позитивној корелацији са *ER*(465, 489).

Анализирали смо и експресију *p53* као маркера прогресије карцинома дојке и добили *ROC* криву која указује да повећање експресије *p53* може бити предиктивни маркер прогресије. На основу ове анализе издвојена је оптимална гранична вредност експресије *p53* од 4%, која раздваја пацијенте са позитивним и негативним *IBC*. Како би се испитала повезаност клиничкопатолошких карактеристика са вредностима експресије *p53*, сви *IBC* су на основу дефинисане граничне вредности сврстане у групу са негативном ($\leq 4\%$) и позитивном ($>4\%$) експресијом *p53*. Овом анализом потврдили смо претходне резултате везано за *Ki67*, *HER2*, присутну некрозу, молекуларни подтип. Оно што је ново у оваквој анализи је да се највећи проценат *p53* позитивних тумора налази у *T2* и *N1* статусу док је код *p53* негативних најчесталији био *T1* и *N0* статусу. Величина тумора је класичан параметар биологије тумора и директно је повезана са већом шансом за регионалну аксиларну захваћеност, већим бројем захваћених чворова и већом вероватноћом рецидива и смрти. Његова прогностичка вредност се може видети у случајевима са и без захватања аксиларних лимфних чворова, што је веома важно у одсуству регионалног ширења јер може помоћи у идентификацији пацијената са високим или ниским ризиком од рецидива(491). Статус аксиларног лимфног чвора и величина тумора су два најважнија фактора укључена у систем стадирања америчког заједничког комитета за рак (*AJCC*)(492). Истраживачи су анализирали могућу везу између величине тумора и клиничко-биолошких фактора који се обично користе у свакодневној клиничкој пракси код пацијената са *IBC* без захваћености аксиларних лимфних чворова, односно фокусирајући се искључиво на величину тумора. Након анализе 251 случаја, пронађена је статистички значајна повезаност између величине тумора и старости преко 70 година, високог хистолошког градуса, високе пролиферације ћелија (висока експресија *Ki67*) и експресије *p53*(493). Повезаност између већег промера тумора и *p53* описали су други, али не и *Temmin* и сарадници (494) и *Al Joudi* и сарадници(495). *Jindal* и сарадници су пронашли статистички значајну корелацију експресије *p53* са величином тумора и метастазама у лимфним чворовима(496).

Дакле, чини се да је агресивност карцинома дојке директно повезана са процентом *p53* позитивних туморских ћелија, а његова прекомерна експресија је директно повезана са лошим прогностичким параметрима. Случајеви позитивни на *p53* могу се тумачити као они који су изгубили механизам за контролу инхибиције пролиферације ћелија и добили активатор малигног потенцијала. Горе наведени налази и корелација са различитим студијама доказали су да је *p53* независан и лош прогностички фактор и да може бити потенцијална мета за будуће лечење карцинома дојке.

5.3. *p21*

Упркос улози у заустављању ћелијске пролиферације и способности да промовише диференцијацију и ћелијску сенесценцију, недавне студије сугеришу да под одређеним условима *p21* може да промовише ћелијску пролиферацију и онкогеност(185). Сходно томе, *p21* је често погрешно регулисан код карцинома код људи, али његова експресија, у зависности од ћелијског контекста и околности, сугерише да може деловати као супресор тумора или као онкоген(185). *p21* посредује у својим различитим биолошким активностима првенствено везивањем и инхибирањем активности комплекса киназе - циклин-зависних киназа (енгл. *Cyclin-Dependent Kinases* - *CDKs*) што доводи до заустављања раста у специфичним фазама ћелијског

циклуса(252). Поред тога, везивањем за пролиферишући ћелијски нуклеарни антиген (енгл. *Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA*), *p21* омета *PCNA*-зависну активност *DNA* полимеразе, чиме инхибира репликацију *DNA* и модулира различите процесе поправке *DNA* зависне од *PCNA*(497).

Једноставан став да *p21* делује као супресор тумора је компликован налазом да *p21* може да испољава онкогене активности. *p21* је прекомерно експримиран у различитим врстама карцинома код људи укључујући карцином простате, грлића материце, дојке и карцином сквамозних ћелија и у многим случајевима, регулација *p21* позитивно корелира са степеном тумора, инвазивношћу и агресивношћу и представља лош прогностички индикатор(498-501). *p21* такође може да промовише онкогенезу независно од своје анти-апоптотске активности промовисањем склапања комплекса циклина *D* са *CDK4* или *CDK6* без инхибиције њихове киназне активности(502). На пример, *p21* промовише олигодендроглиоме само када може да формира комплексе са циклином *D1*(503). *p21* посредовано нуклеарно задржавање циклина *D1* штити циклин *D1* од цитоплазматске деградације и промовише његову повезаност са *CDK4* и *CDK6* и њихову активацију(504). Секвестрација *p21* помоћу *CDK4* - циклина *D* и *CDK6* - циклина *D* такође може промовисати онкогенезу ослобађањем *CDK2* од инхибиторног *p21*. Ово је демонстрирано способношћу вируса леукемије *T* ћелија типа 1 (енгл. *Human T-Cell Leukemia Virus Type 1, HTLV-1*) да заобиђе заустављање *G1/S* кроз везивање *p21* за *CDK4* – циклин *D2* и последичну активацију *CDK2*(505).

Ова супротстављена запажања несумњиво су повећала значај *p21* у области биологије тумора. Штавише, до данас није постигнут консензус о односу између *p21* и клиничкопатолошких параметара, а карактеристике експресије *p21* и њен клинички/прогностички значај за карцином дојке код људи остају нејасни.

Израчунали смо просечну вредност експресије *p21* у различитим лезијама дојке и утврдили да је највећа експресија била у *IBC* и да се постепено смањивала од *ISC*, преко *AN* до *NE*. Идентичне резултате су добили и *Wei* и сарадници, тј. показали су да је протеин *p21* био високо експримиран у узорцима карцинома, у поређењу са нормалним ткивом дојке(506). У истој студији су показали да је експресија протеина *p21* значајно повезана са већим промером тумора, вишим градусом и метастазама у лимфним чворовима, што указује на лошу прогнозу болести. Да је ниво експресије *p21* значајно повишен код пацијената са карциномом дојке у поређењу са пацијентима са бенигним лезијама дојке показали су и други аутори(452, 507-510). *Zohny* и сарадници су показали да је експресија *p21* била повезана са хистолошким градусом 3 тумора и присутним метастазама у лимфним чворовима, што скупа указује да је висока експресија овог маркера повезана са унапредовалим карциномом дојке(507). *Barbareschi* је испитивао експресију *p21* у променама у дојци и дошао до резултата који показују постепен пораст експресије овог маркера од нормалног епитала, преко добро диферентованог, а затим и слабо диферентованог *ISC* до *IBC* где је уједно експресија била и највећа(508). Даље, висока експресија је била праћена високим хистолошким градусом, али није било повезности са другим испитиваним клиничкопатолошким карактеристикама тумора. Ако је улога *p21* само инхибиција комплекса циклин/*CDK* потребна за прелазак из *G1* у *S* и инхибиција репликације *DNA*, висока експресија *p21* могла би резултирати смањеном пролиферацијом ћелија. Међутим, у нашој студији, *p21* је значајно повећан у *IBC* у поређењу са *NIL*-ом. Ово можемо објаснити присуством мутираних нефункционалних облика *p21*. *Balbin* и сарадници истраживали су *p21* у 36 примарних карцинома дојке и открили су мутацију у овом молекулу услед замене аргинина триптофаном (*p21^{R94W}*)(511). Ова мутација је приписана тумор-специфичној промени, јер се не примећује у *DNA* екстрахованој из ћелија периферне крви истог пацијента. Функционална анализа протеина *p21^{R94W}* произведеног у различитим

експресионим системима открила је да ова мутација узрокује оштећење способности *p21* да инхибира циклин *A/CDK2*, циклин *B/CDK1*, циклин *D/CDK4* и циклин *D1/CDK6*. Ови подаци указују на то да протеин *p21^{R94W}* може учествовати у карциногенези дојке јер не може инхибирати низ комплекса циклин/*CDK*. Такође и променама других органа су примећене разлике у експресији *p21*. Тако, снажно позитивно нуклеарно бојење са *p21* уочено је у епителу пуне дебљине код сквамозелуларног карцинома, док је у кератоакантому ограничено на периферни и супрабазални слој. И ниво и интензитет бојења за *p21* били су већи у сквамозелуларном карциному у односу на кератоакантом(512).

Показали смо повезаност експресије *p21* са високим нуклеарним градусом и већим промером тумора и туморима у *T4* статусу болести, високим пролиферативним индексом *Ki67*, позитивним *HER2* статусом и негативним *ER* и *PR*. И други су добили сличне резултате и показали да је прекомерна експресија *p21* повезана са позитивним нодалним статусом, већим промером тумора и лошијом прогнозом код пацијената са карциномом дојке(513).

Анализом молекуларних подтипова карцинома дојке, утврдили смо да је експресија *p21* била највећа у *HER2* позитивном подтипу *IBC*. Ово додатно поткрепљује чињеница да је експресија *p21* била највећа код тумора са прекомерном експресијом *HER2*. Други су открили да прекомерна експресија *HER2* позитивно корелира са *p21* у туморима дојке и да постоји значајна корелација позитивности *p21* са лошијим преживљавањем без болести(514). Истраживања су показала да у ћелијама карцинома дојке, *HER2* може допринети премештању *p21* из једра у цитоплазму, резултирајући губитком његове тумор супресорске функције(515). Све је више доказа да је функција *p21* повезана са његовом локализацијом у ћелијама. Када је локализован у цитоплазми, *p21* функционише као онкоген, стога промовише ћелијску пролиферацију и прогресију кроз ћелијски циклус, док је нуклеарна локализација *p21* укључена у пролиферацију и ефекте који промовишу сенесценцију(515, 516).

Основни механизми помоћу којих *HER2* промовише туморогенезу, инвазивност и метастазирање туморских ћелија опсежно су проучавани. Фосфатидилинозитол-3-*OH* киназа/*Akt* пут је важна *HER2* низводна каскада у спречавању ћелија да прођу кроз апоптозу и допринесу ћелијској пролиферацији(517). На пример, након фосфорилације, активирани *Akt* (енгл. *Protein kinase B*, *PKB*) може фосфорилсати различите супstrate, као што су *Bad*(518), каспаза-9(519), *MDM2* (520) и *p21* (521, 522) што доводи до супресије апоптозе или промоције ћелијске пролиферације. Међу низводним супстратима *Akt*-а, *p21* је критични модулатор ћелијског циклуса и преживљавања ћелије. Показано је да ћелије карцинома дојке које прекомерно експримирају *HER2* могу изазвати хеморезистенцију повећаном експресијом *p21*(523).

Експресија *p21* у *ER* и *PR* негативним туморима уочена је у нашем истраживању, али и код других(510).

Анализом експресије *p21* показано је да повећање може бити маркер прогресије карцинома дојке уз издвајање вредности експресије од 7,5% као граничне вредности која раздваја пацијенте у односу на инвазивност ћелија (са и без *IBC*) уз сензитивност од 64,4% и специфичност 72,9% ($AUC=0,712$, $p<0,001$). Користећи добијену граничну вредност сви *IBC* су даље подељени у две групе: негативни чија је вредност експресије *p21* била $\leq 7,5\%$, и позитивни чија је експресија *p21* била $>7,5\%$. Хи-квадрат тестом је показана статистички значајна повезаност са молекуларним подтипом *IBC* (при чему је највећи проценат *p21* позитивних ћелија био у *HER2* позитивном подтипу *IBC*), као и експресијом *HER2* (највећи проценат *p21* позитивних ћелија био у групи тумора који су показивали прекомерну експресију *HER2*). Ово је у сагласности са дискутованим резултатима експресије *p21*. Остале клиничкопатолошке карактеристике нису показале

статистички значајну повезаност у односу на одређену граничну вредност експресије *p21* протеина у *IBC*.

5.4. *pRb*

pRb је критичан регулатор контроле ћелијског циклуса који је инактивиран код многих људских карцинома(237, 524, 525). Код карцинома дојке, функција *pRb* је вероватно компромитована преко више механизма. Директне анализе примарних тумора откриле су губитак експресије *pRb* у 20–35% случајева и губитак хетерозиготности или друге промене *pRb* локуса у 7–37% тумора(526-528). С обзиром на ову дистрибуцију директне инактивације, могуће је да би инактивација *pRb* могла представљати параметар који доприноси хетерогеном понашању карцинома дојке. Користећи приступе интерференције *RNA* (*RNAi*), откривено је да недостатак *pRb* промовише ћелијску пролиферацију у ћелијским линијама карцинома дојке и појачава туморогену пролиферацију у ксенотрансплантату миша(529). Подразумева се да је нормалан ћелијски циклус поремећен у овим ћелијским линијама, јер потичу од хуманих тумора, међутим, губитак *pRb* додатно је убрзао прогресију ћелијског циклуса. Ови налази утичу на два различита мишљења повезана са функцијом *pRb* у туморогенези. Прво, претпостављено је да је инактивација *pRb* пута предуслов за туморогенезу. Овај модел је заснован на генетским и функционалним подацима, који јасно показују да се лезије на путу циклуса *D1-p16-pRb* међусобно искључују у датој туморској ћелији. Практично све *ER* позитивне хормонски зависне ћелијске линије носе губитак *p16*, за који би се предвидело да ће инактивирати *pRb* преко дерегулисане активности *CDK*/циклуса. Међутим, недостатак *pRb* јасно је изазвао додатне ефекте поврх губитка *p16* (529), што указује да различити начини дерегулације *pRb* пута имају различите ефекте на понашање туморских ћелија. Због тога, чак и у успостављеним ћелијским линијама тумора, *pRb* протеин задржава контролу над пролиферацијом. Ови модели *pRb* дефицијенције сугеришу да механизам кроз који се мења *pRb* пут може имати важне импликације за карцином дојке. Други став предлаже да се *pRb* активира и у великој мери посредује антипролиферативним сигнаlima. Неколико студија које су процењивале директан утицај *pRb* дефицијенције у узорцима примарног карцинома дојке показале су да су они тумори који су *pRb* негативни генерално више пролиферативни и повезани са лошим исходима болести(530, 531). Дакле, недостатак *pRb* може утицати на понашање и агресивност тумора. *pRb* је добро дефинисан као транскрипциони репресор, тако да се већина студија фокусира на ову функцију у супресији тумора. Конкретно, показало се да је регулација транскрипције посредоване *E2F* вероватно примарни начин путем којег *pRb* потискује туморогенезу(242). Анализе микрониза (*Microarray*) су показале да *pRb/E2F* модул регулише приближно 150 циљних гена укључених у различите процесе повезане са супресијом тумора укључујући репликацију *DNA*, контролу *G2/M* контролне тачке ћелијског циклуса и поправку оштећења *DNA*(532, 533). Даље, показано је да недостатак *pRb* резултира дерегулацијом неколико производа циљног гена *pRb*, укључујући *PCNA*, циклин *E* и циклин *A*, од којих су сви критични за прогресију ћелијског циклуса. Разумљиво је да су повећани нивои експресије ових протеина одговорни за убрзане стопе пролиферације уочене у ћелијама карцинома дојке и туморима са недостатком *pRb*.

У нашем истраживању анализирали смо просечну експресију *pRb* у неинвазивним лезијама и у *IBC* и утврдили да је експресија најмања у *NE*, затим постепено расте преко *AH* и *ISC*, а највећа експресија је у *IBC*. Ово је очигледно у супротности са његовом улогом класичног протеина-супресорског тумора. *Pietilainen* и сарадници су испитивали експресију *pRb* и утврдили да је увек био експримиран у нормалном епителу дојке поред тумора као и у диспластичним и хиперпластичним

лезијама и у инвазивном карциному дојке. Они су даље показали да су хистолошка диференцијација карцинома дојке код људи, нуклеарна морфологија и експресија *pRb* повезани(526). Пошто су анеуплоидија *DNA*, брза пролиферација ћелија и лоша хистолошка диференцијација повезани са измењеном експресијом *pRb*, резултати сугеришу да, уз растућу генетску нестабилност, мутације у гену *pRb* постају све чешће, што доприноси вези између малигних хистолошких карактеристика и саме експресије *pRb*. У другој студији су добили експресију *pRb* у 72% случајева карцинома дојке, без одређивања његове експресије у неинвазивним лезијама дојке(534). У итом истраживању су уочили да је експресија *pRb* показала значајну везу са позитивним статусом лимфних чворова, али није била у корелацији са преживљавањем. Слично овоме, ћелије колоректалног карцинома задржавају експресију *pRb*. *Gore* и сарадници показују висок ниво *pRb* у поређењу са суседним нормалним ткивом, а губици или мутације гена *pRb* су ретки(535, 536). *Ali* и сарадници су први открили да тумори дебелог црева експримирају сасвим нормалне транскрипте гена ретинобластома(537). Сада је препознато да се функција *pRb* готово увек чува, а *pRb* локус се понекад чак и појачава код колоректалног карцинома(538, 539). Сличне налазе су имали и *Abdel-Aziz* и сарадници код којих је 79% испитиваних карцинома желуца експримирало *pRb* у једру туморских ћелија, као и 25% околне диспластичне слузнице, док нормална слузница није показивала експресију(540). И у другим истраживањима су добијени овакви резултати(541, 542).

Бројне студије су се бавиле проучавањем утицаја високе експресије *pRb* у карциногенези. Један од значајних налаза је да експресија *pRb* може да промовише ћелијско преживљавање кроз потискивање апоптозе изазване *E2F*(543). У ствари, *pRb* је први пут препознат као анти-апоптотик код *RBI*-нокаут мишева, код којих је *RBI* ген био избрисан, за које је утврђено да нису одрживи због екстензивне апоптозе у неуронским и хематопоетским ћелијама(544). Даље, утврђено је да су ћелије са недостатком *pRb* подложније апоптози него ћелије са потпуно функционалном експресијом *pRb*(545) и *pRb* инхибирају ћелијску смрт изазвану агенсима који оштећују *DNA*(546). Такође је објављено да *pRb* сарађује са *E2F* како би активирао про-апоптотичке гене као одговор на генотоксични стрес(547). Садашњи докази, стога, сугеришу да би статус *pRb* могао бити критичан у утицају на осетљивост туморских ћелија на апоптозу. У овом контексту, интересантно је да се показало да *pRb* интерагује и са другим протеинима укљученим у регулацију апоптозе, укључујући анти-апоптотички протеин атаноген 1 (енгл. *Bcl2 Associated Athanogene 1, BAG-1*) повезан са *Bcl-2* (енгл. *B-cell lymphoma 2*), који је високо експримиран у ћелијама колоректалног карцинома(548). *BAG-1* је откривен као нови регулатор апоптозе кроз његову способност да се веже за *Bcl-2*. Студије су од тада показале да је *BAG-1* мултифункционални протеин укључен у бројне кључне ћелијске процесе укључујући пролиферацију, диференцијацију, ћелијски циклус, транскрипцију и апоптозу(549). *BAG-1* је важан протеин за преживљавање у туморогенези. Показало се да је прекомерно експримиран код бројних карцинома и да инхибира апоптозу у различитим типовима ћелија(549). Штавише, недавно је сугерисано да је експресија *BAG-1* критична детерминанта у спречавању апоптозе изазване *c-Myc* (550) додатно наглашавајући потенцијалну важност коекспресије *pRb/BAG-1* у канцерогенези.

Анализирањем молекуларних подтипова *IBC* утврдили смо да је највећи проценат тумора који експримирају *pRb* била у групи *HER2* позитивних тумора, затим у луминалном Б, луминалном А подтипу, док је најмања била у *TNBC*. Међутим, ови налази нису статистички били значајни. Код карцинома дојке, у различитим молекуларним подтипovima болести доминирају различити механизми инактивације *pRb* пута. Карцином дојке луминалног типа генерално показују дерегулацију

компонената киназе *CDK4/6* као резултат аберантне експресије или амплификације цикллина *D1*. *HER2* позитивни карцином дојке обично гура пут кроз циклине *D* типа, а слично је и неколико случајева који показују губитак *pRb*. Насупрот томе, губитак *pRb* гена и *pRb* протеина документован је великом учесталосту код *TNBC*(551, 552).

Испитивањем *HER2* статуса утврдили смо да је највећа експресија *pRb* била у групи тумора са прекомерном експресијом *HER2*. *Kowalik* је у својој студији испитивао експресију *pRb* у односу на *HER2* статус и добио да је у групи *HER2* позитивних тумора експресија била цитоплазматска у 58% случајева, без једарне експресије, док је у групи *HER2* негативних тумора експресија била искључиво једарна(553). Ови резултати сугеришу да прекомерна експресија *HER2* може бити повезана са активним транспортом *pRb* протеина из једра у цитоплазму, што може бити индиректни механизам инактивације туморског супресорског протеина у *HER2* позитивним случајевима рака дојке. Међутим, ми нисмо приметили цитоплазматску експресију *pRb* у нашем истраживању.

Даље, наши резултати показује значајну повезаност експресије *pRb* и перинеуралне и васкуларне инвазије, као и значајно већу експресију тумора у *T4* стадијуму болести што указује на лошу прогнозу. Одређивањем граничне вредности од 7,5% поделили смо туморе на *pRb* негативне ($\leq 7,5\%$) и позитивне ($>7,5\%$). Након тога је утврђивана њихова повезаност са клиничко-патолошким карактеристикама. Васкуларна и перинеурална инвазија су биле присутне код већег броја *pRb* позитивних него код *pRb* негативних тумора. У односу на *T* статус највећа статистички значајна разлика је била у групи *T4* где је највећи број тумора показивао *pRb* позитивност. Остале клиничкопатолошке карактеристике нису биле статистички значајне.

5.5. SA- β -GAL одређена помоћу *GLB1*

Главно ограничење на пољу сенесценције је недостатак појединачних, универзалних или специфичних биомаркера за идентификацију сенесцентних ћелија у узорцима културе или ткива. Тренутно, идентификација сенесцентних ћелија се ослања на комбинацији више маркера који, када су присутни истовремено, могу разликовати стабилно заустављене сенесцентне ћелије и мирне или диференциране ћелије. Први и још увек најчешће коришћен биомаркер за откривање сенесцентних ћелија у култивисаним ћелијама и у узорцима свежег ткива је акумулација лизозомалног ензима названог „ β -галактозидаза повезана са сенесценцијом“ (*SA- β -GAL*). Овај маркер се може детектовати хистохемијским бојењем у већини сенесцентних ћелија и генерално се не налази у пресенесцентним, мирујућим или бесмртним и трансформисаним ћелијама(121, 554).

Да би смо одредили присуство сенесцентних ћелија, проценили смо експресију *SA- β -GAL* помоћу *GLB1* антитела и добили највећу експресију у *IBC*, која се постепено смањивала преко *ISC*, *AH* до *NE*, где је била и најмања. *Alexandraki* и сарадници су испитивали *SA- β -GAL* у нормалном ткиву, аденомима и карциномима хипофизе и дошли до закључка да је висока експресија овог маркера била у аденомима и карциномима, у односу на нормално ткиво хипофизе(555).

Занимљиво је да смо, проучавањем његове експресије у различитим молекуларним типовима *IBC*, приметили највећи проценат *GLB1* позитивних туморских ћелија у *HER2* позитивним *IBC*, затим у Луминалним А, па у Луминалним Б *IBC*, док је најмања експресија била у *TNBC*. Сличне резултате су показали *Cotarelo* и сарадници(556). Присуство туморских ћелија које су експримирали *GLB1* мора бити узроковано или механизмом који је својствен самим ћелијама тумора, или туморским микроокружењем. Примећујемо да су различити подтипови карцинома дојке типизирани различитим подскуповима генетских и епигенетских абнормалности(557).

С обзиром на улогу сенесценције као препреке трансформацији изазваној онкогеном, једно од објашњења наших налаза могло би бити да подтипови карцинома дојке варирају у својој способности да постану сенесцентни због основних разлика у мутацијама покретача и других генетских дефеката. Друга могућност би могла бити да се подтипови карцинома дојке разликују по својој способности да регрутују имуне ћелије које елиминишу сенесцентне ћелије. Способност ћелија да индукују сенесценцију на онкогене стимулусе углавном зависи од путева супресора тумора *p53-p21* и *pRb-p16*, а дефекти на једном или оба ова пута могу заобићи способност ћелија да прођу кроз сенесценцију и повећавају осетљивост на напредовање карцинома(217, 558). Иако су мутације гена за *p53* честе код карцинома дојке код људи и јављају се у приближно 37% од свих случајева постоје јасне разлике између различитих подтипова *IBC*. Базални *TNBC* имају мутације гена за *p53* у око 80% свих случајева(557). Већина мутација гена за *p53* у *TNBC* су нонсенс и мутације померања оквира читања генетичке информације што доводи или до потпуног губитка функције тумор супресора *p53* или до појаве онкогених карактеристика. Стога би губитак функције тумор супресора *p53* путем мутације у *TNBC* могао бити један од могућих објашњења зашто је карциномских сенесцентних ћелија које експримирају *GLB1* било толико мало у *TNBC* у нашој студији. У складу са овим, приметили смо високу експресију *p53* у нашим узорцима *TNBC*. Штавише, велики проценат *TNBC* је показао високу експресију *p16* повезану са високим процентом *Ki67* позитивних ћелија, што указује на оштећење пута *p16-pRb*. Занимљиво је да су сви *TNBC* узорци са високом експресијом *p53* такође показали високу експресију *p16* и ниску експресију *p21*. Стога је вероватно да је велики проценат *TNBC* имао недостатке и у *p53-p21* и *pRb-p16* путу, пружајући даљи могући разлог зашто је у *TNBC* узорцима откривено тако мало сенесцентних (*GLB1* позитивних) ћелија. Мутације гена за *p53* унутар луминалних А и Б карцинома дојке су претежно мисенс мутације и не узрокују увек неизбежно потпуно смањење функције тумор супресора *p53*. Такође се јављају на знатно нижој фреквенцији него код *TNBC*, са приближно 12% луминалних А и 29% луминалних Б тумора који имају мутације гена за *p53*(557). Стога је занимљиво напоменути да је у нашем истраживању било више луминалних А тумора који су експримирали *GLB1*, за разлику од луминалним Б тумора. Зато ће смањени број и тип мутација гена за *p53* унутар луминалних А тумора дојке вероватно допринети већем броју сенесцентних ћелија у овом подтипу *IBC*. Велики удео узорака *HER2* позитивних тумора дојке у овој студији показао је експресију *GLB1*. Истовремено смо приметили високу експресију *p53*, високу експресију *p16* и високу експресију *p21* у *HER2* позитивном подтипу *IBC*. Сва ова запажања сугеришу да *HER2* позитивни подтипови *IBC* могу постати сенесцентни чак и у присуству оштећеног пута *p53-p21* или *p16-pRb*. Могуће објашњење може бити да чак и ако *HER2* позитивне ћелије карцинома дојке садрже мутације *p53* или *p16*, оне и даље могу бити подложне индукцији сенесценције. Поред тога, забележено је да сенесцентне ћелије са својим *SASP*-ом, трансформисаним конститутивним *HER2* сигнализацијом, инхибира клиренс сенесцентних ћелија и врши промета статске ефекте(358). Према томе, висока експресија *GLB1* у ћелија карцинома у нашим *HER2* позитивним ћелијама *IBC* може сугерисати да онкогена *HER2* индукована сенесценција резултира секреторним фенотипом који може инхибирати регрутовање имуних ћелија и тиме смањити елиминацију сенесцентних ћелија, што доводи до њиховог накупљања унутар ових тумора. Такође је могуће да би овакав секреторни фенотип могао повећати способност ћелија које нису сенесцентне да се размножавају и метастазирају.

Сенесцентне ћелије су типизирание заустављањем ћелијског циклуса и зато сенесцентне ћелије које експримирају *GLB1* не би требало да се размножавају. Да бисмо демонстрирали да ћелије које показују експресију *GLB1* заустављају раст,

анализирали смо их са експресијом маркера пролиферације *Ki67*. Нисмо добили статистичку значајност између датих параметара, али смо уочили већи проценат *Ki67* позитивних ћелија у ћелијама које су показале експресију *GLB1*. Овакве резултате су имали и други(556).

Одређивањем граничне вредности поделили смо све туморе на оне са негативном ($\leq 27,5\%$) и позитивном ($> 27,5\%$) експресијом *GLB1*. Највећи проценат *GLB1* позитивних тумора је био је хистолошког и нуклеарног градуса 2 и 3.

Наша запажања указују на то да сенесцентне туморске ћелије постоје у узнапредовалим људским карциномима дојке и да удео сенесцентних туморских ћелија снажно варира у зависности од подтипа карцинома дојке. Даље, *GLB1* можда није увек специфичан маркер сенесценције сам по себи, већ сурогат маркер за повећани број или активност лизозома и може се раздвојити од сенесценције код неких карциномских ћелијских линија. Повећани *GLB1* протеин, нарочито у туморским ћелијским линијама, стога не може увек бити специфичан за сенесценцију(559).

Занимљиво је да наши резултати показују да је коришћење специфичних антитела (*GLB1*) усмерених против β -галактозидазе у показало експресију у фибробластима строме тумора. Дакле, експресија β -галактозидазе *in vivo* може бити стромални феномен, који одражава почетак сенесценције у стромалном одељку тумора. Разне студије су показале да сенесцентни фибробласти подстичу туморогенезу(560, 561). Активност сенесцентних стромалних фибробласта који подстичу туморогеност приписују се *SASP*-у(336). Иако је специфичан исход *SASP*-а зависан од контекста, нето ефекат његовог паракриног дејства у узнапредовалом карциному је да директно појача пролиферативни и метастатски потенцијал неопластичних ћелија или да им индиректно дозволи да се шире тако што стварају пермисивни миље, локално резултира ремоделирањем ткива(562). Међутим, процењено је да *SASP* чини само близу 50% активности сенесцентних фибробласта који промовишу тумор, док осталих 50% још увек остаје непознато(429, 563). Важно је да се за многе од истих стимуланса који су коришћени да генеришу сенесцентне фибробласте, као што је акутна изложеност водоник-пероксиду и оксидативни стрес, сада зна да су индуктори аутофагије и такође индуктори диференцијације миофибробласта(564-566). Дакле, осталих 50% активности сенесцентних фибробласта која промовише тумор може заправо одражавати њихов аутофагни/катаболички фенотип, митохондријалну дисфункцију и померање аеробне гликолизе, која резултира производњом митохондријалних горива (као што су Л-лактат, кетони, глутамин и слободне масне киселине). Ова митохондријска горива могу затим да „хране“ суседне туморске ћелије, омогућавајући им анаболички раст(567). У складу са овим, одређени подтипови сенесцентних фибробласта промовишу раст тумора, али не показују секреторни фенотип повезан са сенесценцијом (*SASP*)(305).

5.6. Пuteви сенесценције *p53-p21* и *p16-pRb*

p53 и *pRb* су важни посредници ћелијске сенесценције, иако су укључени у различите сигналне путеве. Ћелијски стрес може да активира *p53* кроз различите механизме. На пример, оштећење теломера или оштећења *DNA* могу изазвати одговор, који се манифестује активирањем *ATM* и *ATR* и активацијом њихових посредника *CHK2* и *CHK1*. Активирани *CHK2* или *CHK1* може фосфорилсати *p53*, а он индукује поправку оштећења *DNA* или покреће ћелијску сенесценцију(568). Активирани *p53* индукује транскрипцију *p21*, што блокира напредовање ћелијског циклуса, инхибирајући *CHK2*(569). *MDM2* је *E3* убиквитин лигаза која везује *p53* и омогућава његову деградацију, док блокада овог пута помоћу *p14^{ARF}* представља још један механизам активације *p53*(570). *pRb* је регулисан не само *p53-p21-CDK2* путем, већ и *p16* повезаним путевима, нарочито у епителним ћелијама. *p16*, инхибитор комплекса

циклин *D* - *CDK4/6*, није експримиран у нормалним ткивима одраслих, али је изразито експримиран у сенесцентним ћелијама(571). *p16* је један од најчешће мутираних гена у људском карциному, чија делеција резултира инактивацијом *pRb* и напредовањем ћелијског циклуса из *G1* у *S* фазу(572). Због тога, *p16* и *pRb* формирају пут супресорског тумора и њихове мутације се често дешавају на међусобно искључив начин(573). *p53* и *pRb* су такође функционално повезани. *p16* и *p14^{ARF}* гени смештени су на истом месту са два дељена екзона(165). Мутације *p16* обично инактивирају ова два гена, што доводи до истовремене инхибиције и *p53* и *pRb*. Друга функционална веза између *p53* и *pRb* доказана је истраживањем које показује да *E2F-1*, фактор транскрипције који је нормално инхибиран *pRb*-ом, може активирати *p53* промовишући транскрипцију *p14^{ARF}*(574).

Због ове чињенице о различитим интеракцијама два важна пута, испитали смо повезаност између различитих маркера (*p16*, *p21*, *p53*, *pRb* и *GLB1*) у свакој од група у односу на цитолошке промене (*IBC*, *ISC*, *AH* и *NE*). Анализом смо утврдили да је код *IBC*, значајна корелација утврђена између експресије *p16* и *p53*, између *p21* и *pRb*, *p21* и *GLB1*, као и између *pRb* и *GLB1*. Такође, значајна корелација постоји и између *p16* и *p53* у оквиру *ISC* групе. Код *AH* и *NE* није показана значајна корелације у експресији између испитиваних параметара. Ова нам указује на велику међузависност ова два пута и на њихову повезану улогу у туморогенези и прогресији промена у дојци. *p16⁺/p53⁺* промене у дојци вероватно представљају промене са нефункционалним *pRb* путем. Ћелија са нефункционалним *pRb* путем покреће регулаторно индуковану прекомерну експресију *p16* због негативне регулације повратних информација. То поткрепљују студије у којима су лезије *p16⁺/p53⁺* показале високу експресију *Ki67*, као и у нашем истраживању(401). Налаз, да је високо експримиран *p21* у корелацији са високом експресијом *pRb*, такође може да се објасни губитком функције *pRb* пута услед мутација у *pRb*. Са друге стране, нисмо показали значајну повезаност између *p53* и *p21*, што показује да се *p21* у нашем случају активира на независан начин од *p53*(185). С обзиром на то да се онкогени потенцијал *p21* ослобађа само у условима недостатка дивљег типа *p53*, кумулативни догађаји могу оставити ћелије незаштићене од прогресије карцинома, чиме се додатно поткрепљује онкогени потенцијал *p21*. Сходно томе, у окружењу са недостатком дивљег типа *p53*, важна антитуморска баријера може бити избрисана, отварајући пут за геномску нестабилност вођену поновном репликацијом. У контексту *p53* дивљег типа, *p21* и *p53* делују заједно као партнери за спасавање оштећења *DNA* и чувају стабилност генома, делујући тако као чувари генома. Међутим, када је његов партнер *p53* мутиран или недостаје, *p21* може усвојити другачију „нејасну“ функцију, промовишући бег од сенесценције и стварајући ћелије екстремне геномске нестабилности, које могу деловати као прекурсори карцинома. С обзиром на то да су мутације *p21* ретки догађаји у карциному, могуће је да током еволуције хуманог малигнитета у контексту мутираног *p53*, ћелије карцинома могу бити изложене ризику од стицања додатних штетних геномских промена услед продужене активности *p21*. Овај феномен би могао појачати нестабилност ћелија и промовисати хетерогеност тумора, што доводи до нових клонова ћелија карцинома које су превазишле сенесцентну баријеру, користиле поправку склону грешкама и имале фенотип отпоран на лекове(261). Значајна корелација је утврђена између *p16* и *p53* у оквиру *ISC* групе, што показује да је повећање експресије једног маркера праћено повећањем другог. Овакав налаз показује да би висока експресија ових маркера, која се појавила у развоју *ISC*, могла играти важну улогу у дерегулацији ћелијског циклуса, што утиче на процес карциногенезе у дојци.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Експериментални подаци приказани у овој студији указују на нов механизам којим је *OIS* укључен у туморогенезу, дајући рационално објашњење за потенцијалну примену маркера *OIS* (*p16*, *pRb*, *p53*, *p21*, *GLB1*) у процени прогнозе болести како код неинвазивних лезија, тако и код инвазивног карцинома дојке. Наиме, висока експресија ових маркера учествује у трансформацији и прогресији неинвазивних и инвазивних промена у дојци. Показали смо да онкогена нестабилност, која се одвија током *OIS*-а, обликује туморско ткиво, пре свега туморско микроокружење, утиче на динамичку интеракцију између сенесцентних ћелија и микроокружења, фаворизујући појаву субпопулације малигних ћелија које „беже“ из сенесценције, а које носе више штетних карактеристика. Изгледа да под одређеним околностима *OIS* трансформише туморске ћелије у правцу агресивнијих карактеристика.

Закључак је изведен на основу следећих резултата:

1. Експресијом маркера *GLB1* доказали смо присутност сенесценције у испитиваним узорцима.
2. Експресија маркера *OIS* (*p16*, *pRb*, *p53*, *p21*, *GLB1*) је већа у *IBC* у односу на *NIL*.
3. Експресија маркера *OIS* (*p16*, *pRb*, *p53*, *p21*, *GLB1*) је у позитивној корелацији са различитим променама у дојци (*IBC*, *ISC*, *AH*, *NE*)
4. Експресија маркера *OIS* (*p16*, *pRb*, *p53*, *p21*, *GLB1*) је већа у туморима са високим индексом пролиферације *Ki67*.
5. Експресија маркера *OIS* (*p16*, *pRb*, *p21*, *GLB1*) у односу на молекуларне подтипове *IBC* је највећа у *HER2* позитивним туморима, док је експресија *p53* била највећа у *TNBC*.
6. Експресија маркера *OIS* (*p16*, *pRb*, *p53*, *p21*, *GLB1*) је већа у туморима који су показивали прекомерну експресију *HER2*.
7. Експресија маркера *OIS* (*p16*, *p53*, *p21*) је у негативној корелацији са експресијом *ER* и *PR*.
8. Експресија маркера *OIS* (*p16* и *GLB1*) је присутна у фибробластима туморске строме.
9. Експресија маркера *OIS p16* је повезана са израженим стромалним мононуклерним инфилтратом, позитивним фибробластима строме и присутном некрозом.
10. Експресија маркера *OIS p53* је повезана са *T2* и *N1* статусом болести, присутном лимфном инвазијом и некрозом.
11. Експресија маркера *OIS p21* је повезана са нуклеарним градусом 3 и *T4* статусом тумора.
12. Експресија маркера *OIS pRb* је повезана са васкуларном инвазијом и *T4* статусом тумора.
13. Значајна корелација је утврђена између експресије *p16* и *p53*, *p21* и *pRb*, *p21* и *GLB1*, као и између *pRb* и *GLB1* у *IBC*.

7. ЛІТЕРАТУРА

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7-34.
2. Joel Noutakdie Tochie AGMN, Peter Ndeboc Fonkwo, Stella Patcha, Esther Tallah. Breast Cancer: Global Health Perspectives with an Insight on Low-and Middle-Income Countries Mini Review. *Acta Scientific Women's Health.* 2019;1(4):42-5.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
4. Zubair M, Wang S, Ali N. Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. *Front Pharmacol.* 2020;11:632079.
5. Yap YS, Lu YS, Tamura K, Lee JE, Ko EY, Park YH, et al. Insights Into Breast Cancer in the East vs the West: A Review. *JAMA Oncol.* 2019;5(10):1489-96.
6. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2019;11:151-64.
7. Wojtyla C, Bertuccio P, Wojtyla A, La Vecchia C. European trends in breast cancer mortality, 1980-2017 and predictions to 2025. *Eur J Cancer.* 2021;152:4-17.
8. Society AC. Breast Cancer, Key Statistic for Breast Cancer. American Cancer. Atlanta, Georgia.2018 [Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/risk-and-prevention.html>].
9. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1):7-33.
10. DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):52-62.
11. Abu-Helalah M, Azab B, Mubaidin R, Ali D, Jafar H, Alshraideh H, et al. BRCA1 and BRCA2 genes mutations among high risk breast cancer patients in Jordan. *Sci Rep.* 2020;10(1):17573.
12. Catana A, Apostu AP, Antemie RG. Multi gene panel testing for hereditary breast cancer - is it ready to be used? *Med Pharm Rep.* 2019;92(3):220-5.
13. Buys SS, Sandbach JF, Gammon A, Patel G, Kidd J, Brown KL, et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer.* 2017;123(10):1721-30.
14. Kurian AW, Ward KC, Howlader N, Deapen D, Hamilton AS, Mariotto A, et al. Genetic Testing and Results in a Population-Based Cohort of Breast Cancer Patients and Ovarian Cancer Patients. *J Clin Oncol.* 2019;37(15):1305-15.
15. Santen RJ, Heitjan DF, Gompel A, Lumsden MA, Pinkerton JV, Davis SR, et al. Underlying Breast Cancer Risk and Menopausal Hormone Therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(6).
16. Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence. *Lancet.* 2019;394(10204):1159-68.
17. Dianatinasab M, Fararouei M, Mohammadianpanah M, Zare-Bandamiri M, Rezaianzadeh A. Hair Coloring, Stress, and Smoking Increase the Risk of Breast Cancer: A Case-Control Study. *Clin Breast Cancer.* 2017;17(8):650-9.
18. Ahmad HM, Ghuffar S, Khurshid K, editors. Classification of Breast Cancer Histology Images Using Transfer Learning. 2019 16th International Bhurban Conference on Applied Sciences and Technology (IBCAST); 2019 8-12 Jan. 2019.
19. Cserni G. Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica.* 2020;112(1):25-41.

20. Renan Gomes do Nascimento KMO. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology*. 2020;30:e20200024.
21. Thomas M, Kelly ED, Abraham J, Kruse M. Invasive lobular breast cancer: A review of pathogenesis, diagnosis, management, and future directions of early stage disease. *Semin Oncol*. 2019;46(2):121-32.
22. Arnone P, Zurrida S, Viale G, Dellapasqua S, Montagna E, Arnaboldi P, et al. The TNM classification of breast cancer: need for change. *Updates Surg*. 2010;62(2):75-81.
23. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
24. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206-23.
25. Howlader N, Cronin KA, Kurian AW, Andridge R. Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018;27(6):619-26.
26. Zhao F, Copley B, Niu Q, Liu F, Johnson JA, Sutton T, et al. Racial disparities in survival outcomes among breast cancer patients by molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat*. 2021;185(3):841-9.
27. Reid S, Haddad D, Tezak A, Weidner A, Wang X, Mautz B, et al. Impact of molecular subtype and race on HR+, HER2- breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat*. 2021;189(3):845-52.
28. Mohammed AA. The clinical behavior of different molecular subtypes of breast cancer. *Cancer Treat Res Commun*. 2021;29:100469.
29. Sánchez-Muñoz A, Vicioso L, Santonja A, Álvarez M, Plata-Fernández Y, Miramón J, et al. Male breast cancer: correlation between immunohistochemical subtyping and PAM50 intrinsic subtypes, and the subsequent clinical outcomes. *Mod Pathol*. 2018;31(2):299-306.
30. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. 2015;24 Suppl 2:S26-35.
31. Hashmi AA, Aijaz S, Khan SM, Mahboob R, Irfan M, Zafar NI, et al. Prognostic parameters of luminal A and luminal B intrinsic breast cancer subtypes of Pakistani patients. *World J Surg Oncol*. 2018;16(1):1.
32. Yu NY, Iftimi A, Yau C, Tobin NP, van 't Veer L, Hoadley KA, et al. Assessment of Long-term Distant Recurrence-Free Survival Associated With Tamoxifen Therapy in Postmenopausal Patients With Luminal A or Luminal B Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2019;5(9):1304-9.
33. Johnston S, Puhalla S, Wheatley D, Ring A, Barry P, Holcombe C, et al. Randomized Phase II Study Evaluating Palbociclib in Addition to Letrozole as Neoadjuvant Therapy in Estrogen Receptor-Positive Early Breast Cancer: PALLET Trial. *J Clin Oncol*. 2019;37(3):178-89.
34. Cottu P, D'Hondt V, Dureau S, Lerebours F, Desmoulins I, Heudel PE, et al. Letrozole and palbociclib versus chemotherapy as neoadjuvant therapy of high-risk luminal breast cancer. *Ann Oncol*. 2018;29(12):2334-40.
35. Hurvitz SA, Martin M, Press MF, Chan D, Fernandez-Abad M, Petru E, et al. Potent Cell-Cycle Inhibition and Upregulation of Immune Response with Abemaciclib and Anastrozole in neoMONARCH, Phase II Neoadjuvant Study in HR(+)/HER2(-) Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2020;26(3):566-80.
36. Prat A, Saura C, Pascual T, Hernando C, Muñoz M, Paré L, et al. Ribociclib plus letrozole versus chemotherapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive,

- HER2-negative, luminal B breast cancer (CORALLEEN): an open-label, multicentre, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(1):33-43.
37. Bredin P, Walshe JM, Denduluri N. Systemic therapy for metastatic HER2-positive breast cancer. *Semin Oncol.* 2020;47(5):259-69.
 38. Rimawi MF, Schiff R, Osborne CK. Targeting HER2 for the treatment of breast cancer. *Annu Rev Med.* 2015;66:111-28.
 39. Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(1):55-62.
 40. Daemen A, Manning G. HER2 is not a cancer subtype but rather a pan-cancer event and is highly enriched in AR-driven breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2018;20(1):8.
 41. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene.* 2007;26(45):6469-87.
 42. Horvath E. Molecular subtypes of breast cancer - What breast imaging radiologists need to know. *Rev Chil Radiol* 2021;27(1):17-26.
 43. Sacha Satram-Hoang PB, Alisha Stein, Patricia Cortazar, Faiyaz Momin, Carolina Reyes. Treatment Patterns and Mortality Risk among Elderly Patients with Metastatic Triple Negative Breast Cancer in the United States: An Observational Cohort Study Using SEER-Medicare Data. *Journal of Cancer Therapy.* 2019;10(2):117-33.
 44. Marra A, Viale G, Curigliano G. Recent advances in triple negative breast cancer: the immunotherapy era. *BMC Med.* 2019;17(1):90.
 45. Luo SP, Wu QS, Chen H, Wang XX, Chen QX, Zhang J, et al. Validation of the Prognostic Significance of the Prognostic Stage Group According to the Eighth Edition of American Cancer Joint Committee on Cancer Staging System in Triple-Negative Breast Cancer: An Analysis From Surveillance, Epidemiology, and End Results 18 Database. *J Surg Res.* 2020;247:211-9.
 46. Pareja F, Geyer FC, Marchiò C, Burke KA, Weigelt B, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *NPJ Breast Cancer.* 2016;2:16036.
 47. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol.* 2019;30(8):1194-220.
 48. Mougalian SS, Soulos PR, Killelea BK, Lannin DR, Abu-Khalaf MM, DiGiovanna MP, et al. Use of neoadjuvant chemotherapy for patients with stage I to III breast cancer in the United States. *Cancer.* 2015;121(15):2544-52.
 49. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet.* 2014;384(9938):164-72.
 50. Masuda N, Lee SJ, Ohtani S, Im YH, Lee ES, Yokota I, et al. Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. *N Engl J Med.* 2017;376(22):2147-59.
 51. Schmid P, Rugo HS, Adams S, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(1):44-59.
 52. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology.* 2020;77(2):181-5.
 53. Sarveezad A, Babahajian A, Shamseddin J, Bahardoust M. 5-Year Survival Rates and Prognostic Factors in Patients with Synchronous and Metachronous Breast Cancer from 2010 to 2015. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19(12):3489-93.

54. Karakas Y, Dizdar O, Aksoy S, Hayran M, Altundag K. The Effect of Total Size of Lesions in Multifocal/Multicentric Breast Cancer on Survival. *Clin Breast Cancer*. 2018;18(4):320-7.
55. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(4):290-303.
56. Tonello F, Bergmann A, de Souza Abrahão K, de Aguiar SS, Bello MA, Thuler LCS. Impact of Number of Positive Lymph Nodes and Lymph Node Ratio on Survival of Women with Node-Positive Breast Cancer. *Eur J Breast Health*. 2019;15(2):76-84.
57. Reed J, Rosman M, Verbanac KM, Mannie A, Cheng Z, Tafra L. Prognostic implications of isolated tumor cells and micrometastases in sentinel nodes of patients with invasive breast cancer: 10-year analysis of patients enrolled in the prospective East Carolina University/Anne Arundel Medical Center Sentinel Node Multicenter Study. *J Am Coll Surg*. 2009;208(3):333-40.
58. Ayre K, Parker C. Lymphedema after treatment of breast cancer: a comprehensive review. *Journal of Unexplored Medical Data*. 2019;4:5.
59. Sevensma KE, Lewis CR. Axillary Sentinel Lymph Node Biopsy. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
60. Liang Y, Zhang H, Song X, Yang Q. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Semin Cancer Biol*. 2020;60:14-27.
61. Wu Q, Li J, Zhu S, Wu J, Chen C, Liu Q, et al. Breast cancer subtypes predict the preferential site of distant metastases: a SEER based study. *Oncotarget*. 2017;8(17):27990-6.
62. Xiao W, Zheng S, Liu P, Zou Y, Xie X, Yu P, et al. Risk factors and survival outcomes in patients with breast cancer and lung metastasis: a population-based study. *Cancer Med*. 2018;7(3):922-30.
63. Jin L, Han B, Siegel E, Cui Y, Giuliano A, Cui X. Breast cancer lung metastasis: Molecular biology and therapeutic implications. *Cancer Biol Ther*. 2018;19(10):858-68.
64. Darlix A, Louvel G, Fraisse J, Jacot W, Brain E, Debled M, et al. Impact of breast cancer molecular subtypes on the incidence, kinetics and prognosis of central nervous system metastases in a large multicentre real-life cohort. *Br J Cancer*. 2019;121(12):991-1000.
65. Gobbini E, Ezzalfani M, Dieras V, Bachelot T, Brain E, Debled M, et al. Time trends of overall survival among metastatic breast cancer patients in the real-life ESME cohort. *Eur J Cancer*. 2018;96:17-24.
66. Horn SR, Stoltzfus KC, Lehrer EJ, Dawson LA, Tchelebi L, Gusani NJ, et al. Epidemiology of liver metastases. *Cancer Epidemiol*. 2020;67:101760.
67. Brook N, Brook E, Dharmarajan A, Dass CR, Chan A. Breast cancer bone metastases: pathogenesis and therapeutic targets. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018;96:63-78.
68. Tulotta C, Ottewell P. The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis. *Endocr Relat Cancer*. 2018;25(7):R421-r34.
69. Donegan WL. Prognostic factors. Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer*. 1992;70(6 Suppl):1755-64.
70. Li Y, Yang D, Yin X, Zhang X, Huang J, Wu Y, et al. Clinicopathological Characteristics and Breast Cancer-Specific Survival of Patients With Single Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *JAMA Netw Open*. 2020;3(1):e1918160.
71. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*. 2004;9(6):606-16.
72. Shah A, Haider G, Abro N, Bhutto S, Baqai TI, Akhtar S, et al. Correlation Between Age and Hormone Receptor Status in Women With Breast Cancer. *Cureus*. 2022;14(1):e21652.

73. Li Y, Zhang X, Qiu J, Pang T, Huang L, Zeng Q. Comparisons of p53, KI67 and BRCA1 expressions in patients with different molecular subtypes of breast cancer and their relationships with pathology and prognosis. *J buon.* 2019;24(6):2361-8.
74. Mutai R, Barkan T, Moore A, Sarfaty M, Shochat T, Yerushalmi R, et al. Prognostic impact of HER2-low expression in hormone receptor positive early breast cancer. *The Breast.* 2021;60:62-9.
75. Escórcio-Dourado CS, Alves-Ribeiro FA, Lima-Dourado JC, Dos Santos AR, de Oliveira Pereira R, Tavares CB, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 gene polymorphism and breast cancer risk in women from the Northeastern region of Brazil. *Clinics (Sao Paulo).* 2020;75:e2360.
76. Nami B, Maadi H, Wang Z. Mechanisms Underlying the Action and Synergism of Trastuzumab and Pertuzumab in Targeting HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2018;10(10).
77. Zhao J, Mohan N, Nussinov R, Ma B, Wu WJ. Trastuzumab Blocks the Receiver Function of HER2 Leading to the Population Shifts of HER2-Containing Homodimers and Heterodimers. *Antibodies (Basel).* 2021;10(1).
78. Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology.* 2001;61 Suppl 2:1-13.
79. Chen K, Quan J, Yang J, Chen Z. The potential markers of endocrine resistance among HR+ /HER2+ breast cancer patients. *Clin Transl Oncol.* 2020;22(4):576-84.
80. Tong ZJ, Shi NY, Zhang ZJ, Yuan XD, Hong XM. Expression and prognostic value of HER-2/neu in primary breast cancer with sentinel lymph node metastasis. *Biosci Rep.* 2017;37(4).
81. Saurabh J RA, Deepti A, Parveen R, Kulwant S, Swaran K. Correlation of Expression of Estrogen Receptor, Progesterone Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 with Histopathological Grade in Cases of Carcinoma Breast. *International Journal of Contemporary Medical Research.* 2019;6(9):I6-II1.
82. Shrestha G, Satyal B, Sherpa P. Correlation of histological grade with Estrogen, Progesterone and HER2/neu reactivity in breast cancer. *Journal of Pathology of Nepal.* 2019;9(2):1518-22.
83. Badawy OM, Loay I. FISH Analysis of TOP2A and HER-2 Aberrations in Female Breast Carcinoma on Archived Material: Egyptian NCI Experience. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2019;27(3):216-22.
84. Schonk DM, Kuijpers HJ, van Drunen E, van Dalen CH, Geurts van Kessel AH, Verheijen R, et al. Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum Genet.* 1989;83(3):297-9.
85. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-22.
86. Klöppel G, La Rosa S. Ki67 labeling index: assessment and prognostic role in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Virchows Arch.* 2018;472(3):341-9.
87. Remnant L, Kochanova NY, Reid C, Cisneros-Soberanis F, Earnshaw WC. The intrinsically disorderly story of Ki-67. *Open Biol.* 2021;11(8):210120.
88. Miller I, Min M, Yang C, Tian C, Gookin S, Carter D, et al. Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell Rep.* 2018;24(5):1105-12.e5.
89. Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, Rasmi RR. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clinica chimica acta.* 2019;491:39-45.
90. Mrouj K, Andrés-Sánchez N, Dubra G, Singh P, Sobacki M, Chahar D, et al. Ki-67 regulates global gene expression and promotes sequential stages of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(10).

91. Davey MG, Hynes SO, Kerin MJ, Miller N, Lowery AJ. Ki-67 as a Prognostic Biomarker in Invasive Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(17).
92. Byun SS, Lee M, Hong SK, Lee H. Elevated Ki-67 (MIB-1) expression as an independent predictor for unfavorable pathologic outcomes and biochemical recurrence after radical prostatectomy in patients with localized prostate cancer: A propensity score matched study. *PLoS One*. 2019;14(11):e0224671.
93. Li C, Zheng M, Zheng X, Fang X, Dong J, Wang C, et al. Predictive Ki-67 Proliferation Index of Cervical Squamous Cell Carcinoma Based on IVIM-DWI Combined with Texture Features. *Contrast Media Mol Imaging*. 2021;2021:8873065.
94. Wang D, Ye W, Shi Q. Prognostic Value of Ki-67 Expression in Advanced Lung Squamous Cell Carcinoma Patients Treated with Chemotherapy. *Cancer Manag Res*. 2021;13:6429-36.
95. Naheed S, Holden C, Tanno L, Jaynes E, Cave J, Ottensmeier CH, et al. The utility of Ki-67 as a prognostic biomarker in pulmonary neuroendocrine tumours: protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2019;9(8):e031531.
96. Zhou Y, Hu W, Chen P, Abe M, Shi L, Tan SY, et al. Ki67 is a biological marker of malignant risk of gastrointestinal stromal tumors: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(34):e7911.
97. Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, Gnant M, Dubsy P, Loibl S, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol*. 2017;28(8):1700-12.
98. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr., Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1504-13.
99. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast*. 2008;17(4):323-34.
100. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 2010;11(2):174-83.
101. Jang MH, Kim HJ, Chung YR, Lee Y, Park SY. A comparison of Ki-67 counting methods in luminal Breast Cancer: The Average Method vs. the Hot Spot Method. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172031.
102. Enrico DH, Hannotis AR, Bravo I. Evaluation of the best cut-off point for Ki-67 and progesterone receptor as a prognostic factor in hormone receptor-positive (HR+) breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(15_suppl):e12549-e.
103. Lombardi A, Lazzeroni R, Bersigotti L, Vitale V, Amanti C. The Proper Ki-67 Cut-Off in Hormone Responsive Breast Cancer: A Monoinstitutional Analysis with Long-Term Follow-Up. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2021;13:213-7.
104. Escala Cornejo R, Olivares-Hernández A, Muñoz M, Figuero Pérez L, Vallejo J, González J, et al. Identifying the Best Ki-67 Cut-Off for Determining Luminal Breast Cancer Subtypes Using Immunohistochemical Analysis and PAM50 Genomic Classification. *EMJ Oncology*. 2022.
105. van Dooijeweert C, van Diest PJ, Ellis IO. Grading of invasive breast carcinoma: the way forward. *Virchows Arch*. 2022;480(1):33-43.
106. 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.

107. 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.
108. Pradhan A, Paudyal P, Sinha AK, Agrawal CS. Grading, staging and Nottingham prognostic index scoring of breast carcinoma. *Journal of Pathology of Nepal*. 2017;7(1):1078-83.
109. 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.
110. Gorgoulis VG, Pefani DE, Pateras IS, Trougakos IP. Integrating the DNA damage and protein stress responses during cancer development and treatment. *J Pathol*. 2018;246(1):12-40.
111. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev*. 2019;99(2):1047-78.
112. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. 2019;179(4):813-27.
113. Mohamad Kamal NS, Safuan S, Shamsuddin S, Foroozandeh P. Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods. *Eur J Cell Biol*. 2020;99(6):151108.
114. Hinze C, Boucrot E. Endocytosis in proliferating, quiescent and terminally differentiated cells. *J Cell Sci*. 2018;131(23).
115. von Zglinicki T, Wan T, Miwa S. Senescence in Post-Mitotic Cells: A Driver of Aging? *Antioxid Redox Signal*. 2021;34(4):308-23.
116. Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, Däbritz JHM, Zhao Z, Yu Y, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*. 2018;553(7686):96-100.
117. Saleh T, Tyutyunyk-Massey L, Gewirtz DA. Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy. *Cancer Res*. 2019;79(6):1044-6.
118. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585-621.
119. Hayflick L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res*. 1965;37:614-36.
120. Xu Z, Teixeira MT. The many types of heterogeneity in replicative senescence. *Yeast*. 2019;36(11):637-48.
121. González-Gualda E, Baker AG, Fruk L, Muñoz-Espín D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *Febs j*. 2021;288(1):56-80.
122. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):436-53.
123. Jannone G, Rozzi M, Najimi M, Decottignies A, Sokal EM. An Optimized Protocol for Histochemical Detection of Senescence-associated Beta-galactosidase Activity in Cryopreserved Liver Tissue. *J Histochem Cytochem*. 2020;68(4):269-78.
124. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev*. 2009;23(7):798-803.
125. Salmonowicz H, Passos JF. Detecting senescence: a new method for an old pigment. *Aging Cell*. 2017;16(3):432-4.
126. Georgakopoulou EA, Tsimaratou K, Evangelou K, Fernandez Marcos PJ, Zoumpourlis V, Trougakos IP, et al. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging (Albany NY)*. 2013;5(1):37-50.

127. Zhang X, Liu X, Du Z, Wei L, Fang H, Dong Q, et al. The loss of heterochromatin is associated with multiscale three-dimensional genome reorganization and aberrant transcription during cellular senescence. *Genome Res.* 2021;31(7):1121-35.
128. Di Micco R, Sulli G, Dobрева M, Lontos M, Botrugno OA, Gargiulo G, et al. Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nat Cell Biol.* 2011;13(3):292-302.
129. Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun.* 2017;8:14532.
130. Zhao LD, Bie LY, Hu L, Zhu ZH, Meng XH, Cong LL, et al. IGF-1 induces cellular senescence in rat articular chondrocytes via Akt pathway activation. *Exp Ther Med.* 2020;20(5):49.
131. Adnot S, Breau M, Houssaini A. PAI-1: A New Target for Controlling Lung-Cell Senescence and Fibrosis? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2020;62(3):271-2.
132. Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(1):51-7.
133. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(7):482-96.
134. Idda ML, McClusky WG, Lodde V, Munk R, Abdelmohsen K, Rossi M, et al. Survey of senescent cell markers with age in human tissues. *Aging (Albany NY).* 2020;12(5):4052-66.
135. Karin O, Alon U. Senescent cell accumulation mechanisms inferred from parabiosis. *Geroscience.* 2021;43(1):329-41.
136. Tuttle CSL, Luesken SWM, Waaijer MEC, Maier AB. Senescence in tissue samples of humans with age-related diseases: A systematic review. *Ageing Res Rev.* 2021;68:101334.
137. Ovadya Y, Landsberger T, Leins H, Vadai E, Gal H, Biran A, et al. Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. *Nat Commun.* 2018;9(1):5435.
138. Azarm K, Bhardwaj A, Kim E, Smith S. Persistent telomere cohesion protects aged cells from premature senescence. *Nat Commun.* 2020;11(1):3321.
139. Zhu Y, Liu X, Ding X, Wang F, Geng X. Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. *Biogerontology.* 2019;20(1):1-16.
140. Kale A, Sharma A, Stolzing A, Desprez PY, Campisi J. Role of immune cells in the removal of deleterious senescent cells. *Immun Ageing.* 2020;17:16.
141. Tripathi U, Misra A, Tchkonja T, Kirkland JL. Impact of Senescent Cell Subtypes on Tissue Dysfunction and Repair: Importance and Research Questions. *Mech Ageing Dev.* 2021;198:111548.
142. Vernot JP. Senescence-Associated Pro-inflammatory Cytokines and Tumor Cell Plasticity. *Front Mol Biosci.* 2020;7:63.
143. Lopes-Paciencia S, Saint-Germain E, Rowell MC, Ruiz AF, Kalegari P, Ferbeyre G. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine.* 2019;117:15-22.
144. Qiu Z, Jia J, Zou H, Ao Y, Liu B, Wang Z. Targeting senescent cell clearance: An approach to delay aging and age-associated disorders. *Translational Medicine of Aging.* 2021;5:1-9.
145. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest.* 2018;128(4):1238-46.
146. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol.* 2018;217(1):65-77.

147. Chicas A, Wang X, Zhang C, McCurrach M, Zhao Z, Mert O, et al. Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell*. 2010;17(4):376-87.
148. He Y, Wang Y, Liu B, Helmling C, Sušac L, Cheng R, et al. Structures of telomerase at several steps of telomere repeat synthesis. *Nature*. 2021;593(7859):454-9.
149. Maestroni L, Matmati S, Coulon S. Solving the Telomere Replication Problem. *Genes (Basel)*. 2017;8(2).
150. Victorelli S, Passos JF. Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine*. 2017;21:14-20.
151. Chiu CP, Harley CB. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997;214(2):99-106.
152. Blackburn EH. Telomere states and cell fates. *Nature*. 2000;408(6808):53-6.
153. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nat Rev Genet*. 2019;20(5):299-309.
154. Nault JC, Ningarhari M, Rebouissou S, Zucman-Rossi J. The role of telomeres and telomerase in cirrhosis and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(9):544-58.
155. Gallicchio L, Gadalla SM, Murphy JD, Simonds NI. The Effect of Cancer Treatments on Telomere Length: A Systematic Review of the Literature. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(10):1048-58.
156. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 1998;279(5349):349-52.
157. Roger L, Tomas F, Gire V. Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23).
158. Lee S, Lee JS. Cellular senescence: a promising strategy for cancer therapy. *BMB Rep*. 2019;52(1):35-41.
159. Song DY, Kim JA, Jeong D, Yun J, Kim SM, Lim K, et al. Telomere length and its correlation with gene mutations in chronic lymphocytic leukemia in a Korean population. *PLoS One*. 2019;14(7):e0220177.
160. Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell*. 2004;14(4):501-13.
161. Beck J, Turnquist C, Horikawa I, Harris C. Targeting cellular senescence in cancer and aging: roles of p53 and its isoforms. *Carcinogenesis*. 2020;41(8):1017-29.
162. Liu J, Wang L, Wang Z, Liu JP. Roles of Telomere Biology in Cell Senescence, Replicative and Chronological Ageing. *Cells*. 2019;8(1).
163. Wagner V, Gil J. Senescence as a therapeutically relevant response to CDK4/6 inhibitors. *Oncogene*. 2020;39(29):5165-76.
164. Cilluffo D, Barra V, Di Leonardo A. P14(ARF): The Absence that Makes the Difference. *Genes (Basel)*. 2020;11(7).
165. Inoue K, Fry EA. Aberrant Expression of p14(ARF) in Human Cancers: A New Biomarker? *Tumor Microenviron*. 2018;1(2):37-44.
166. Serra S, Chetty R. p16. *J Clin Pathol*. 2018;71(10):853-8.
167. Seo J, Seong D, Lee SR, Oh DB, Song J. Post-Translational Regulation of ARF: Perspective in Cancer. *Biomolecules*. 2020;10(8).
168. Velimezi G, Lontos M, Vougas K, Roumeliotis T, Bartkova J, Sideridou M, et al. Functional interplay between the DNA-damage-response kinase ATM and ARF tumour suppressor protein in human cancer. *Nat Cell Biol*. 2013;15(8):967-77.
169. Passos JF, Simillion C, Hallinan J, Wipat A, von Zglinicki T. Cellular senescence: unravelling complexity. *Age (Dordr)*. 2009;31(4):353-63.

170. Erusalimsky JD. Oxidative stress, telomeres and cellular senescence: What non-drug interventions might break the link? *Free Radic Biol Med.* 2020;150:87-95.
171. Barbouti A, Vasileiou PVS, Evangelou K, Vlasis KG, Papoudou-Bai A, Gorgoulis VG, et al. Implications of Oxidative Stress and Cellular Senescence in Age-Related Thymus Involution. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:7986071.
172. Chao J, Guo Y, Chao L. Protective Role of Endogenous Kallistatin in Vascular Injury and Senescence by Inhibiting Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:4138560.
173. Yu J, Shi J, Zhang Y, Zhang Y, Huang Y, Chen Z, et al. The replicative senescent mesenchymal stem / stromal cells defect in DNA damage response and anti-oxidative capacity. *Int J Med Sci.* 2018;15(8):771-81.
174. Papaconstantinou J. The Role of Signaling Pathways of Inflammation and Oxidative Stress in Development of Senescence and Aging Phenotypes in Cardiovascular Disease. *Cells.* 2019;8(11).
175. Ahmed W, Lingner J. Impact of oxidative stress on telomere biology. *Differentiation.* 2018;99:21-7.
176. Rezatabar S, Karimian A, Rameshknia V, Parsian H, Majidinia M, Kopi TA, et al. RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression. *J Cell Physiol.* 2019.
177. Zhu H, Blake S, Kusuma FK, Pearson RB, Kang J, Chan KT. Oncogene-induced senescence: From biology to therapy. *Mech Ageing Dev.* 2020;187:111229.
178. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 1997;88(5):593-602.
179. Murugan AK, Grieco M, Tsuchida N. RAS mutations in human cancers: Roles in precision medicine. *Semin Cancer Biol.* 2019;59:23-35.
180. Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, et al. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature.* 2005;436(7051):660-5.
181. Courtois-Cox S, Jones SL, Cichowski K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene.* 2008;27(20):2801-9.
182. Inoue K, Fry EA. Aberrant expression of p16(INK4a) in human cancers - a new biomarker? *Cancer Rep Rev.* 2018;2(2).
183. Pare R, Shin JS, Lee CS. Increased expression of senescence markers p14(ARF) and p16(INK4a) in breast cancer is associated with an increased risk of disease recurrence and poor survival outcome. *Histopathology.* 2016;69(3):479-91.
184. Silva J, Silva JM, Domínguez G, García JM, Cantos B, Rodríguez R, et al. Concomitant expression of p16INK4a and p14ARF in primary breast cancer and analysis of inactivation mechanisms. *J Pathol.* 2003;199(3):289-97.
185. Shamloo B, Usluer S. p21 in Cancer Research. *Cancers (Basel).* 2019;11(8).
186. Kulaberoglu Y, Gundoğdu R, Hergovich A, editors. *The Role of p53/p21/p16 in DNA-Damage Signaling and DNA Repair* 2016.
187. Sasaki M, Nakanuma Y. Cellular senescence in biliary pathology. Special emphasis on expression of a polycomb group protein EZH2 and a senescent marker p16INK4a in bile ductular tumors and lesions. *Histol Histopathol.* 2015;30(3):267-75.
188. Efeyan A, Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle.* 2007;6(9):1006-10.
189. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science.* 2008;319(5868):1352-5.

190. Evan GI, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: hot or what? *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19(1):25-31.
191. Kobashigawa S, M. SAKAGUCHI Y, Masunaga Si, Mori E. Stress-induced Cellular Senescence Contributes to Chronic Inflammation and Cancer Progression. *Thermal Medicine.* 2019;35:41-58.
192. Liu X, Wan M. A tale of the good and bad: Cell senescence in bone homeostasis and disease. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2019;346:97-128.
193. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(10):749-58.
194. Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Muñoz DP, Raza SR, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol.* 2009;11(8):973-9.
195. Rodier F, Muñoz DP, Teachenor R, Chu V, Le O, Bhaumik D, et al. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 1):68-81.
196. Christophorou MA, Martin-Zanca D, Soucek L, Lawlor ER, Brown-Swigart L, Verschuren EW, et al. Temporal dissection of p53 function in vitro and in vivo. *Nat Genet.* 2005;37(7):718-26.
197. Roy S, Roy S, Rana A, Akhter Y, Hande MP, Banerjee B. The role of p38 MAPK pathway in p53 compromised state and telomere mediated DNA damage response. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2018;836(Pt A):89-97.
198. Ham HJ, Park JW, Bae YS. Defect of SIRT1-FoxO3a axis is associated with the production of reactive oxygen species during protein kinase CK2 downregulation-mediated cellular senescence and nematode aging. *BMB Rep.* 2019;52(4):265-70.
199. Anerillas C, Abdelmohsen K, Gorospe M. Regulation of senescence traits by MAPKs. *Geroscience.* 2020;42(2):397-408.
200. Mooi WJ, Peepers DS. Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(10):1037-46.
201. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilias A, Janich P, Morton JP, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* 2013;15(8):978-90.
202. Kang TW, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature.* 2011;479(7374):547-51.
203. Iannello A, Thompson TW, Ardolino M, Lowe SW, Raulet DH. p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *J Exp Med.* 2013;210(10):2057-69.
204. Lesina M, Wörmann SM, Morton J, Diakopoulos KN, Korneeva O, Wimmer M, et al. RelA regulates CXCL1/CXCR2-dependent oncogene-induced senescence in murine Kras-driven pancreatic carcinogenesis. *J Clin Invest.* 2016;126(8):2919-32.
205. Tonnessen-Murray CA, Lozano G, Jackson JG. The Regulation of Cellular Functions by the p53 Protein: Cellular Senescence. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(2).
206. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-217.
207. Rao SG, Jackson JG. SASP: Tumor Suppressor or Promoter? Yes! *Trends Cancer.* 2016;2(11):676-87.
208. Ritschka B, Storer M, Mas A, Heinzmann F, Ortells MC, Morton JP, et al. The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev.* 2017;31(2):172-83.

209. Malaquin N, Vercamer C, Bouali F, Martien S, Deruy E, Wernert N, et al. Senescent fibroblasts enhance early skin carcinogenic events via a paracrine MMP-PAR-1 axis. *PLoS One*. 2013;8(5):e63607.
210. Laberge RM, Sun Y, Orjalo AV, Patil CK, Freund A, Zhou L, et al. MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol*. 2015;17(8):1049-61.
211. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;66(1):1-9.
212. Eggert T, Wolter K, Ji J, Ma C, Yevsa T, Klotz S, et al. Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell*. 2016;30(4):533-47.
213. Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(4):199-210.
214. Levine AJ. The many faces of p53: something for everyone. *J Mol Cell Biol*. 2019;11(7):524-30.
215. Janic A, Valente LJ, Wakefield MJ, Di Stefano L, Milla L, Wilcox S, et al. DNA repair processes are critical mediators of p53-dependent tumor suppression. *Nat Med*. 2018;24(7):947-53.
216. Espadinha M, Barcherini V, Lopes EA, Santos MMM. An Update on MDMX and Dual MDM2/X Inhibitors. *Curr Top Med Chem*. 2018;18(8):647-60.
217. Mijit M, Caracciolo V, Melillo A, Amicarelli F, Giordano A. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules*. 2020;10(3).
218. Chaudhary R, Muys BR, Grammatikakis I, De S, Abdelmohsen K, Li XL, et al. A Circular RNA from the MDM2 Locus Controls Cell Cycle Progression by Suppressing p53 Levels. *Mol Cell Biol*. 2020;40(9).
219. Wu CE, Koay TS, Esfandiari A, Ho YH, Lovat P, Lunec J. ATM Dependent DUSP6 Modulation of p53 Involved in Synergistic Targeting of MAPK and p53 Pathways with Trametinib and MDM2 Inhibitors in Cutaneous Melanoma. *Cancers (Basel)*. 2018;11(1).
220. Cui L, Zhou F, Chen C, Wang CC. Overexpression of CCDC69 activates p14(ARF)/MDM2/p53 pathway and confers cisplatin sensitivity. *J Ovarian Res*. 2019;12(1):4.
221. Engeland K. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):114-32.
222. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*. 1995;55(22):5187-90.
223. He P, Li Z, Xu F, Ru G, Huang Y, Lin E, et al. AMPK Activity Contributes to G2 Arrest and DNA Damage Decrease via p53/p21 Pathways in Oxidatively Damaged Mouse Zygotes. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:539485.
224. Deng T, Yan G, Song X, Xie L, Zhou Y, Li J, et al. Deubiquitylation and stabilization of p21 by USP11 is critical for cell-cycle progression and DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(18):4678-83.
225. Donehower LA, Soussi T, Korkut A, Liu Y, Schultz A, Cardenas M, et al. Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas. *Cell Rep*. 2019;28(11):3010.
226. Baugh EH, Ke H, Levine AJ, Bonneau RA, Chan CS. Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? *Cell Death Differ*. 2018;25(1):154-60.
227. Liu J, Zhang C, Hu W, Feng Z. Tumor suppressor p53 and metabolism. *J Mol Cell Biol*. 2019;11(4):284-92.
228. Schmidt V, Nagar R, Martinez LA. Control of Nucleotide Metabolism Enables Mutant p53's Oncogenic Gain-of-Function Activity. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12).

229. Blandino G, Valenti F, Sacconi A, Di Agostino S. Wild type- and mutant p53 proteins in mitochondrial dysfunction: emerging insights in cancer disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;98:105-17.
230. D'Orazi G, Cirone M. Mutant p53 and Cellular Stress Pathways: A Criminal Alliance That Promotes Cancer Progression. *Cancers (Basel).* 2019;11(5).
231. Kamp WM, Wang PY, Hwang PM. TP53 mutation, mitochondria and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2016;38:16-22.
232. Lacroix M, Riscal R, Arena G, Linares LK, Le Cam L. Metabolic functions of the tumor suppressor p53: Implications in normal physiology, metabolic disorders, and cancer. *Mol Metab.* 2020;33:2-22.
233. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature.* 1986;323(6089):643-6.
234. Schonfeld SJ, Kleinerman RA, Abramson DH, Seddon JM, Tucker MA, Morton LM. Long-term risk of subsequent cancer incidence among hereditary and nonhereditary retinoblastoma survivors. *Br J Cancer.* 2021;124(7):1312-9.
235. Burkhart DL, Morel KL, Sheahan AV, Richards ZA, Ellis L. The Role of RB in Prostate Cancer Progression. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1210:301-18.
236. Chen J, Guanizo A, Luong Q, Jayasekara WSN, Jayasinghe D, Inampudi C, et al. Lineage-restricted neoplasia driven by Myc defaults to small cell lung cancer when combined with loss of p53 and Rb in the airway epithelium. *Oncogene.* 2022;41(1):138-45.
237. Knudsen ES, Zacksenhaus E. The vulnerability of RB loss in breast cancer: Targeting a void in cell cycle control. *Oncotarget.* 2018;9(57):30940-1.
238. Chen WS, Alshalalfa M, Zhao SG, Liu Y, Mahal BA, Quigley DA, et al. Novel RB1-Loss Transcriptomic Signature Is Associated with Poor Clinical Outcomes across Cancer Types. *Clin Cancer Res.* 2019;25(14):4290-9.
239. Demirci D, Dayanc B, Mazi FA, Senturk S. The Jekyll and Hyde of Cellular Senescence in Cancer. *Cells.* 2021;10(2).
240. Verdugo-Sivianes EM, Carnero A. Role of the Holoenzyme PP1-SPN in the Dephosphorylation of the RB Family of Tumor Suppressors During Cell Cycle. *Cancers (Basel).* 2021;13(9).
241. Masciullo V, Valdivieso P, Amadio G, Santoro A, Angelico G, Sgambato A, et al. Role of Retinoblastoma Protein Family (Rb/p105 and Rb2/p130) Expression in the Histopathological Classification of Borderline Ovarian Tumors. *Front Med (Lausanne).* 2020;7:596226.
242. Wu T, Wu L. The Role and Clinical Implications of the Retinoblastoma (RB)-E2F Pathway in Gastric Cancer. *Front Oncol.* 2021;11:655630.
243. Chen CC, Chen J, Wang WL, Xie L, Shao CQ, Zhang YX. Inhibition of the P53/P21 Pathway Attenuates the Effects of Senescent Nucleus Pulposus Cell-Derived Exosomes on the Senescence of Nucleus Pulposus Cells. *Orthop Surg.* 2021;13(2):583-91.
244. Pack LR, Daigh LH, Meyer T. Putting the brakes on the cell cycle: mechanisms of cellular growth arrest. *Curr Opin Cell Biol.* 2019;60:106-13.
245. Zohny SF, Al-Malki AL, Zamzami MA, Choudhry H. p21(Waf1/Cip1): its paradoxical effect in the regulation of breast cancer. *Breast Cancer.* 2019;26(2):131-7.
246. Alexander K, Yang HS, Hinds PW. pRb inactivation in senescent cells leads to an E2F-dependent apoptosis requiring p73. *Mol Cancer Res.* 2003;1(10):716-28.
247. Kapić A, Helmbold H, Reimer R, Klotzsche O, Deppert W, Bohn W. Cooperation between p53 and p130(Rb2) in induction of cellular senescence. *Cell Death Differ.* 2006;13(2):324-34.

248. Schade AE, Fischer M, DeCaprio JA. RB, p130 and p107 differentially repress G1/S and G2/M genes after p53 activation. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(21):11197-208.
249. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* 1993;75(4):805-16.
250. Whittaker SR, Mallinger A, Workman P, Clarke PA. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2017;173:83-105.
251. Wiedemeyer WR. Resistance Mechanisms to Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. In: Yarden Y, Elkabets M, editors. *Resistance to Anti-Cancer Therapeutics Targeting Receptor Tyrosine Kinases and Downstream Pathways.* Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 181-210.
252. Al Bitar S, Gali-Muhtasib H. The Role of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitor p21(cip1/waf1) in Targeting Cancer: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutics. *Cancers (Basel).* 2019;11(10).
253. Amani J, Gorjizadeh N, Younesi S, Najafi M, Ashrafi AM, Irian S, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs) and the DNA damage response: The link between signaling pathways and cancer. *DNA Repair (Amst).* 2021;102:103103.
254. Hernandez-Segura A, de Jong TV, Melov S, Guryev V, Campisi J, Demaria M. Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol.* 2017;27(17):2652-60.e4.
255. Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, et al. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell.* 2013;155(5):1119-30.
256. Song S, Lam EW, Tchkonja T, Kirkland JL, Sun Y. Senescent Cells: Emerging Targets for Human Aging and Age-Related Diseases. *Trends Biochem Sci.* 2020;45(7):578-92.
257. Jascur T, Brickner H, Salles-Passador I, Barbier V, El Khissiin A, Smith B, et al. Regulation of p21(WAF1/CIP1) stability by WISp39, a Hsp90 binding TPR protein. *Mol Cell.* 2005;17(2):237-49.
258. Wang L, Han H, Dong L, Wang Z, Qin Y. Function of p21 and its therapeutic effects in esophageal cancer. *Oncol Lett.* 2021;21(2):136.
259. Kreis NN, Louwen F, Yuan J. The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in Cell Differentiation, Migration and Cancer Therapy. *Cancers (Basel).* 2019;11(9).
260. Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst).* 2016;42:63-71.
261. Georgakilas AG, Martin OA, Bonner WM. p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends Mol Med.* 2017;23(4):310-9.
262. Gonzalez S, Serrano M. A new mechanism of inactivation of the INK4/ARF locus. *Cell Cycle.* 2006;5(13):1382-4.
263. Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, von Deimling A, Louis DN. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res.* 1996;56(1):150-3.
264. Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res.* 1997;237(1):7-13.
265. Chim CS, Wong AS, Kwong YL. Epigenetic inactivation of INK4/CDK/RB cell cycle pathway in acute leukemias. *Ann Hematol.* 2003;82(12):738-42.
266. Di Vinci A, Perdelli L, Banelli B, Salvi S, Casciano I, Gelvi I, et al. p16(INK4a) promoter methylation and protein expression in breast fibroadenoma and carcinoma. *Int J Cancer.* 2005;114(3):414-21.
267. Li J, Poi MJ, Tsai MD. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. *Biochemistry.* 2011;50(25):5566-82.

268. Chao DL, Sanchez CA, Galipeau PC, Blount PL, Paulson TG, Cowan DS, et al. Cell proliferation, cell cycle abnormalities, and cancer outcome in patients with Barrett's esophagus: a long-term prospective study. *Clin Cancer Res*. 2008;14(21):6988-95.
269. Paulson TG, Galipeau PC, Xu L, Kissel HD, Li X, Blount PL, et al. p16 mutation spectrum in the premalignant condition Barrett's esophagus. *PLoS One*. 2008;3(11):e3809.
270. Guida M, Sanguedolce F, Bufo P, Di Spiezio Sardo A, Bifulco G, Nappi C, et al. Aberrant DNA hypermethylation of hMLH-1 and CDKN2A/p16 genes in benign, premalignant and malignant endometrial lesions. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2009;30(3):267-70.
271. Carnero A, Leonart ME. Epigenetic mechanisms in senescence, immortalisation and cancer. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2011;86(2):443-55.
272. Wang Y, Zhang Z, Lubet R, You M. Tobacco smoke-induced lung tumorigenesis in mutant A/J mice with alterations in K-ras, p53, or Ink4a/Arf. *Oncogene*. 2005;24(18):3042-9.
273. Hiroyasu M, Ozeki M, Kohda H, Echizenya M, Tanaka T, Hiai H, et al. Specific allelic loss of p16 (INK4A) tumor suppressor gene after weeks of iron-mediated oxidative damage during rat renal carcinogenesis. *Am J Pathol*. 2002;160(2):419-24.
274. Bury M, Le Calvé B, Ferbeyre G, Blank V, Lessard F. New Insights into CDK Regulators: Novel Opportunities for Cancer Therapy. *Trends Cell Biol*. 2021;31(5):331-44.
275. Kong D, Chen J, Sun X, Lin Y, Du Y, Huang D, et al. GRIM-19 over-expression represses the proliferation and invasion of orthotopically implanted hepatocarcinoma tumors associated with downregulation of Stat3 signaling. *Biosci Trends*. 2019;13(4):342-50.
276. Fujita J, Sakurai T. The Oncoprotein Gankyrin/PSMD10 as a Target of Cancer Therapy. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1164:63-71.
277. Li J, Melvin WS, Tsai MD, Muscarella P. The nuclear protein p34SEI-1 regulates the kinase activity of cyclin-dependent kinase 4 in a concentration-dependent manner. *Biochemistry*. 2004;43(14):4394-9.
278. Monnerat C, Chompret A, Kannengiesser C, Avril MF, Janin N, Spatz A, et al. BRCA1, BRCA2, TP53, and CDKN2A germline mutations in patients with breast cancer and cutaneous melanoma. *Fam Cancer*. 2007;6(4):453-61.
279. Mendaza S, Fernández-Irigoyen J, Santamaría E, Zudaire T, Guarch R, Guerrero-Setas D, et al. Absence of Nuclear p16 Is a Diagnostic and Independent Prognostic Biomarker in Squamous Cell Carcinoma of the Cervix. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6).
280. Lazăr CS, Șovrea AS, Georgiu C, Crișan D, Mirescu Ș C, Cosgarea M. Different patterns of p16INK4a immunohistochemical expression and their biological implications in laryngeal squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2020;61(3):697-706.
281. Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, Kelp B, Löning T. Overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype. *Breast Cancer Res Treat*. 2001;67(1):61-70.
282. Dai CY, Furth EE, Mick R, Koh J, Takayama T, Niitsu Y, et al. p16(INK4a) expression begins early in human colon neoplasia and correlates inversely with markers of cell proliferation. *Gastroenterology*. 2000;119(4):929-42.
283. Zhao P, Mao X, Talbot IC. Aberrant cytological localization of p16 and CDK4 in colorectal epithelia in the normal adenoma carcinoma sequence. *World J Gastroenterol*. 2006;12(39):6391-6.
284. Arifin MT, Hama S, Kajiwara Y, Sugiyama K, Saito T, Matsuura S, et al. Cytoplasmic, but not nuclear, p16 expression may signal poor prognosis in high-grade astrocytomas. *J Neurooncol*. 2006;77(3):273-7.
285. O'Neill CJ, McBride HA, Connolly LE, McCluggage WG. Uterine leiomyosarcomas are characterized by high p16, p53 and MIB1 expression in comparison with usual leiomyomas, leiomyoma variants and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential. *Histopathology*. 2007;50(7):851-8.

286. Haller F, Agaimy A, Cameron S, Beyer M, Gunawan B, Happel N, et al. Expression of p16INK4A in gastrointestinal stromal tumours (GISTs): two different forms exist that independently correlate with poor prognosis. *Histopathology*. 2010;56(3):305-18.
287. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005;436(7051):642.
288. Zhang Z, Rosen DG, Yao JL, Huang J, Liu J. Expression of p14ARF, p15INK4b, p16INK4a, and DCR2 increases during prostate cancer progression. *Mod Pathol*. 2006;19(10):1339-43.
289. Burd CE, Sorrentino JA, Clark KS, Darr DB, Krishnamurthy J, Deal AM, et al. Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16(INK4a)-luciferase model. *Cell*. 2013;152(1-2):340-51.
290. Sun Y, Coppé JP, Lam EW. Cellular Senescence: The Sought or the Unwanted? *Trends Mol Med*. 2018;24(10):871-85.
291. Liang Y, Liang N, Ma Y, Tang S, Ye S, Xiao F. Role of Clusterin/NF- κ B in the secretion of senescence-associated secretory phenotype in Cr(VI)-induced premature senescent L-02 hepatocytes. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021;219:112343.
292. Severino V, Alessio N, Farina A, Sandomenico A, Cipollaro M, Peluso G, et al. Insulin-like growth factor binding proteins 4 and 7 released by senescent cells promote premature senescence in mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis*. 2013;4(11):e911.
293. Vassilieva I, Kosheverova V, Vitte M, Kamentseva R, Shatrova A, Tsupkina N, et al. Paracrine senescence of human endometrial mesenchymal stem cells: a role for the insulin-like growth factor binding protein 3. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(2):1987-2004.
294. Gruevska A, Moragrega AB, Galindo MJ, Esplugues JV, Blas-Garcia A, Apostolova N. p53 and p53-related mediators PAI-1 and IGFBP-3 are downregulated in peripheral blood mononuclear cells of HIV-patients exposed to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antiviral Res*. 2020;178:104784.
295. Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol*. 2006;8(8):877-84.
296. Zhou B, Wan Y, Chen R, Zhang C, Li X, Meng F, et al. The emerging role of cellular senescence in renal diseases. *J Cell Mol Med*. 2020;24(3):2087-97.
297. Faget DV, Ren Q, Stewart SA. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(8):439-53.
298. Basisty N, Kale A, Patel S, Campisi J, Schilling B. The power of proteomics to monitor senescence-associated secretory phenotypes and beyond: toward clinical applications. *Expert Rev Proteomics*. 2020;17(4):297-308.
299. Fitsiou E, Pulido T, Campisi J, Alimirah F, Demaria M. Cellular Senescence and the Senescence-Associated Secretory Phenotype as Drivers of Skin Photoaging. *J Invest Dermatol*. 2021;141(4s):1119-26.
300. Nelson G, Kucheryavenko O, Wordsworth J, von Zglinicki T. The senescent bystander effect is caused by ROS-activated NF- κ B signalling. *Mech Ageing Dev*. 2018;170:30-6.
301. Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*. 2008;133(6):1006-18.
302. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 2008;133(6):1019-31.

303. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beauséjour CM, Parrinello S, et al. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One*. 2010;5(2):e9188.
304. Pazolli E, Alspach E, Milczarek A, Prior J, Piwnica-Worms D, Stewart SA. Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression. *Cancer Res*. 2012;72(9):2251-61.
305. Coppé JP, Rodier F, Patil CK, Freund A, Desprez PY, Campisi J. Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J Biol Chem*. 2011;286(42):36396-403.
306. Mongi-Bragato B, Grondona E, Sosa LDV, Zlocowski N, Venier AC, Torres AI, et al. Pivotal role of NF- κ B in cellular senescence of experimental pituitary tumours. *J Endocrinol*. 2020;245(2):179-91.
307. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, Liu S, Sarnoski EA, Freund A, et al. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab*. 2016;23(2):303-14.
308. Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, Martin-Ruiz C, et al. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell*. 2012;11(2):345-9.
309. Stow JL, Murray RZ. Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(3):227-39.
310. Effenberger T, von der Heyde J, Bartsch K, Garbers C, Schulze-Osthoff K, Chalaris A, et al. Senescence-associated release of transmembrane proteins involves proteolytic processing by ADAM17 and microvesicle shedding. *Faseb j*. 2014;28(11):4847-56.
311. Morancho B, Martínez-Barriocanal Á, Villanueva J, Arribas J. Role of ADAM17 in the non-cell autonomous effects of oncogene-induced senescence. *Breast Cancer Res*. 2015;17(1):106.
312. Takasugi M, Okada R, Takahashi A, Virya Chen D, Watanabe S, Hara E. Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nat Commun*. 2017;8:15729.
313. Malaquin N, Martinez A, Rodier F. Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol*. 2016;82:39-49.
314. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:99-118.
315. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*. 2014;31(6):722-33.
316. von Kobbe C. Cellular senescence: a view throughout organismal life. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(19):3553-67.
317. Feng T, Meng J, Kou S, Jiang Z, Huang X, Lu Z, et al. CCN1-Induced Cellular Senescence Promotes Heart Regeneration. *Circulation*. 2019;139(21):2495-8.
318. Kim KH, Won JH, Cheng N, Lau LF. The matricellular protein CCN1 in tissue injury repair. *J Cell Commun Signal*. 2018;12(1):273-9.
319. Antelo-Iglesias L, Picallos-Rabina P, Estévez-Souto V, Da Silva-Álvarez S, Collado M. The role of cellular senescence in tissue repair and regeneration. *Mech Ageing Dev*. 2021;198:111528.
320. Taguchi J, Yamada Y. Unveiling the Role of Senescence-Induced Cellular Plasticity. *Cell Stem Cell*. 2017;20(3):293-4.

321. Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, et al. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*. 2013;155(5):1104-18.
322. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008;134(4):657-67.
323. Lujambio A, Akkari L, Simon J, Grace D, Tschaharganeh DF, Bolden JE, et al. Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell*. 2013;153(2):449-60.
324. Yang J, Liu M, Hong D, Zeng M, Zhang X. The Paradoxical Role of Cellular Senescence in Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:722205.
325. Park SS, Choi YW, Kim JH, Kim HS, Park TJ. Senescent tumor cells: an overlooked adversary in the battle against cancer. *Exp Mol Med*. 2021;53(12):1834-41.
326. Lujambio A. To clear, or not to clear (senescent cells)? That is the question. *Bioessays*. 2016;38 Suppl 1:S56-64.
327. Bakhoun SF, Ngo B, Laughney AM, Cavallo JA, Murphy CJ, Ly P, et al. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature*. 2018;553(7689):467-72.
328. Gonzalez-Meljem JM, Apps JR, Fraser HC, Martinez-Barbera JP. Paracrine roles of cellular senescence in promoting tumorigenesis. *Br J Cancer*. 2018;118(10):1283-8.
329. Chen F, Long Q, Fu D, Zhu D, Ji Y, Han L, et al. Targeting SPINK1 in the damaged tumour microenvironment alleviates therapeutic resistance. *Nat Commun*. 2018;9(1):4315.
330. Demaria M, O'Leary MN, Chang J, Shao L, Liu S, Alimirah F, et al. Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov*. 2017;7(2):165-76.
331. Xu Q, Long Q, Zhu D, Fu D, Zhang B, Han L, et al. Targeting amphiregulin (AREG) derived from senescent stromal cells diminishes cancer resistance and averts programmed cell death 1 ligand (PD-L1)-mediated immunosuppression. *Aging Cell*. 2019;18(6):e13027.
332. Wiley CD, Flynn JM, Morrissey C, Lebofsky R, Shuga J, Dong X, et al. Analysis of individual cells identifies cell-to-cell variability following induction of cellular senescence. *Aging Cell*. 2017;16(5):1043-50.
333. Prata L, Ovsyannikova IG, Tchkonina T, Kirkland JL. Senescent cell clearance by the immune system: Emerging therapeutic opportunities. *Semin Immunol*. 2018;40:101275.
334. Alimirah F, Pulido T, Valdovinos A, Alptekin S, Chang E, Jones E, et al. Cellular Senescence Promotes Skin Carcinogenesis through p38MAPK and p44/42MAPK Signaling. *Cancer Res*. 2020;80(17):3606-19.
335. Omer A, Barrera MC, Moran JL, Lian XJ, Di Marco S, Beausejour C, et al. G3BP1 controls the senescence-associated secretome and its impact on cancer progression. *Nat Commun*. 2020;11(1):4979.
336. Mavrogonatos E, Pratsinis H, Kletsas D. The role of senescence in cancer development. *Semin Cancer Biol*. 2020;62:182-91.
337. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 2005;436(7051):720-4.
338. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonina T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 2011;479(7372):232-6.
339. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, et al. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*. 2016;530(7589):184-9.
340. Lau L, David G. Pro- and anti-tumorigenic functions of the senescence-associated secretory phenotype. *Expert Opin Ther Targets*. 2019;23(12):1041-51.

341. Guo Y, Ayers JL, Carter KT, Wang T, Maden SK, Edmond D, et al. Senescence-associated tissue microenvironment promotes colon cancer formation through the secretory factor GDF15. *Aging Cell*. 2019;18(6):e13013.
342. Lawrenson K, Grun B, Benjamin E, Jacobs IJ, Dafou D, Gayther SA. Senescent fibroblasts promote neoplastic transformation of partially transformed ovarian epithelial cells in a three-dimensional model of early stage ovarian cancer. *Neoplasia*. 2010;12(4):317-25.
343. Bavik C, Coleman I, Dean JP, Knudsen B, Plymate S, Nelson PS. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res*. 2006;66(2):794-802.
344. Coppe JP, Boisen M, Sun CH, Wong BJ, Kang MK, Park NH, et al. A role for fibroblasts in mediating the effects of tobacco-induced epithelial cell growth and invasion. *Mol Cancer Res*. 2008;6(7):1085-98.
345. Lederle W, Depner S, Schnur S, Obermueller E, Catone N, Just A, et al. IL-6 promotes malignant growth of skin SCCs by regulating a network of autocrine and paracrine cytokines. *Int J Cancer*. 2011;128(12):2803-14.
346. Hartman ZC, Poage GM, den Hollander P, Tsimelzon A, Hill J, Panupinthu N, et al. Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Res*. 2013;73(11):3470-80.
347. Di GH, Liu Y, Lu Y, Liu J, Wu C, Duan HF. IL-6 secreted from senescent mesenchymal stem cells promotes proliferation and migration of breast cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(11):e113572.
348. Rojas A, Liu G, Coleman I, Nelson PS, Zhang M, Dash R, et al. IL-6 promotes prostate tumorigenesis and progression through autocrine cross-activation of IGF-IR. *Oncogene*. 2011;30(20):2345-55.
349. Song L, Rawal B, Nemeth JA, Haura EB. JAK1 activates STAT3 activity in non-small-cell lung cancer cells and IL-6 neutralizing antibodies can suppress JAK1-STAT3 signaling. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(3):481-94.
350. Bernard S, Myers M, Fang WB, Zinda B, Smart C, Lambert D, et al. CXCL1 Derived from Mammary Fibroblasts Promotes Progression of Mammary Lesions to Invasive Carcinoma through CXCR2 Dependent Mechanisms. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2018;23(4):249-67.
351. de Vega RG, Sanchez MLF, Eiro N, Vizoso FJ, Sperling M, Karst U, et al. Multimodal laser ablation/desorption imaging analysis of Zn and MMP-11 in breast tissues. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(3):913-22.
352. Oubaha M, Miloudi K, Dejda A, Guber V, Mawambo G, Germain MA, et al. Senescence-associated secretory phenotype contributes to pathological angiogenesis in retinopathy. *Sci Transl Med*. 2016;8(362):362ra144.
353. Coppé JP, Kauser K, Campisi J, Beauséjour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem*. 2006;281(40):29568-74.
354. Yang F, Tuxhorn JA, Ressler SJ, McAlhany SJ, Dang TD, Rowley DR. Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis. *Cancer Res*. 2005;65(19):8887-95.
355. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*. 2008;6(12):2853-68.
356. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):161-74.

357. Tsai KK, Chuang EY, Little JB, Yuan ZM. Cellular mechanisms for low-dose ionizing radiation-induced perturbation of the breast tissue microenvironment. *Cancer Res.* 2005;65(15):6734-44.
358. Angelini PD, Zacarias Fluck MF, Pedersen K, Parra-Palau JL, Guiu M, Bernadó Morales C, et al. Constitutive HER2 signaling promotes breast cancer metastasis through cellular senescence. *Cancer Res.* 2013;73(1):450-8.
359. Fitsiou E, Soto-Gamez A, Demaria M. Biological functions of therapy-induced senescence in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2022;81:5-13.
360. Zheng X, Chou PM, Mirkin BL, Rebbaa A. Senescence-initiated reversal of drug resistance: specific role of cathepsin L. *Cancer Res.* 2004;64(5):1773-80.
361. te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2002;62(6):1876-83.
362. Roberson RS, Kussick SJ, Vallieres E, Chen SY, Wu DY. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res.* 2005;65(7):2795-803.
363. Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, et al. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell.* 2002;109(3):335-46.
364. Christov KT, Shilkaitis AL, Kim ES, Steele VE, Lubet RA. Chemopreventive agents induce a senescence-like phenotype in rat mammary tumours. *Eur J Cancer.* 2003;39(2):230-9.
365. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994;266(5193):2011-5.
366. Ellingsen EB, Mangsbo SM, Hovig E, Gaudernack G. Telomerase as a Target for Therapeutic Cancer Vaccines and Considerations for Optimizing Their Clinical Potential. *Front Immunol.* 2021;12:682492.
367. Mizukoshi E, Kaneko S. Telomerase-Targeted Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8).
368. Shay JW, Wright WE. Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2002;2(4):257-65.
369. Seimiya H, Muramatsu Y, Ohishi T, Tsuruo T. Tankyrase 1 as a target for telomere-directed molecular cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2005;7(1):25-37.
370. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1243-60.
371. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1736-47.
372. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 1998;11(2):155-68.
373. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 2013;31(31):3997-4013.
374. Focke CM, Bürger H, van Diest PJ, Finsterbusch K, Gläser D, Korsching E, et al. Interlaboratory variability of Ki67 staining in breast cancer. *Eur J Cancer.* 2017;84:219-27.

375. Gnant M, Thomssen C, Harbeck N. St. Gallen/Vienna 2015: A Brief Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care (Basel)*. 2015;10(2):124-30.
376. Yoon N, Yoon G, Park CK, Kim HS. Stromal p16 expression is significantly increased in malignant ovarian neoplasms. *Oncotarget*. 2016;7(40):64665-73.
377. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L, et al. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2014;20(10):2773-82.
378. Ginsburg O, Yip CH, Brooks A, Cabanes A, Caleffi M, Dunstan Yataco JA, et al. Breast cancer early detection: A phased approach to implementation. *Cancer*. 2020;126 Suppl 10(Suppl 10):2379-93.
379. Giménez-Bastida JA, Ávila-Gálvez M, Espín JC, González-Sarriás A. Conjugated Physiological Resveratrol Metabolites Induce Senescence in Breast Cancer Cells: Role of p53/p21 and p16/Rb Pathways, and ABC Transporters. *Mol Nutr Food Res*. 2019;63(22):e1900629.
380. Kashyap D, Kaur H. Cell-free miRNAs as non-invasive biomarkers in breast cancer: Significance in early diagnosis and metastasis prediction. *Life Sci*. 2020;246:117417.
381. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis*. 2018;5(2):77-106.
382. Aggarwal V, Kashyap D, Sak K, Tuli HS, Jain A, Chaudhary A, et al. Molecular Mechanisms of Action of Tocotrienols in Cancer: Recent Trends and Advancements. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
383. Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL, Musgrove EA. Cell cycle control in breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 2006;97(2):261-74.
384. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 2007;130(2):223-33.
385. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*. 2004;114(9):1299-307.
386. Sargen MR, Merrill SL, Chu EY, Nathanson KL. CDKN2A mutations with p14 loss predisposing to multiple nerve sheath tumours, melanoma, dysplastic naevi and internal malignancies: a case series and review of the literature. *Br J Dermatol*. 2016;175(4):785-9.
387. Joselow A, Lynn D, Terzian T, Box NF. Senescence-Like Phenotypes in Human Nevi. *Methods Mol Biol*. 2017;1534:175-84.
388. Simonetti S, Serrano C, Hernández-Losa J, Bagué S, Orellana R, Valverde C, et al. Schwannomas, benign tumors with a senescent phenotype. *Histol Histopathol*. 2014;29(6):721-30.
389. Perrone F, Tabano S, Colombo F, Dagrada G, Birindelli S, Gronchi A, et al. p15INK4b, p14ARF, and p16INK4a inactivation in sporadic and neurofibromatosis type 1-related malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin Cancer Res*. 2003;9(11):4132-8.
390. Damsky W, Micevic G, Meeth K, Muthusamy V, Curley DP, Santhanakrishnan M, et al. mTORC1 activation blocks BrafV600E-induced growth arrest but is insufficient for melanoma formation. *Cancer Cell*. 2015;27(1):41-56.
391. Hilliard NJ, Krahl D, Sellheyer K. p16 expression differentiates between desmoplastic Spitz nevus and desmoplastic melanoma. *J Cutan Pathol*. 2009;36(7):753-9.
392. Bai P, Xiao X, Zou J, Cui L, Bui Nguyen TM, Liu J, et al. Expression of p14(ARF), p15(INK4b), p16(INK4a) and skp2 increases during esophageal squamous cell cancer progression. *Exp Ther Med*. 2012;3(6):1026-32.
393. Brasanac D, Stojkovic-Filipovic J, Bosic M, Tomanovic N, Manojlovic-Gacic E. Expression of G1/S-cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol*. 2016;43(3):200-10.

394. Azazmeh N, Assouline B, Winter E, Rupp S, Nevo Y, Maly A, et al. Chronic expression of p16(INK4a) in the epidermis induces Wnt-mediated hyperplasia and promotes tumor initiation. *Nat Commun.* 2020;11(1):2711.
395. Lynch BC, Lathrop SL, Ye D, Ma TY, Cerilli LA. Expression of the p16(INK4a) gene product in premalignant and malignant epithelial lesions of the gallbladder. *Ann Diagn Pathol.* 2008;12(3):161-4.
396. Ekundina V AO, Awe P, Adeniyi T, Emmanuel-Omah A, Eigbefoh D, Aremu A. Expression of CEA, CA125 and P16INK4A in the Normal Breast, Fibroadenoma and Invasive Adenocarcinomas of the Breast. *Alq J Med App Sci.* 2022;5(1):78-88.
397. Kim GJ, Kim DH, Min KW, Kim SH. Prognostic impact of high p16/cyclin D1 index in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019;12(6):2224-32.
398. Goyal A, Sahu RK, Kumar M, Sharma S, Qayyum S, Kaur N, et al. p16 promoter methylation, expression, and its association with estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 subtype of breast carcinoma. *J Cancer Res Ther.* 2019;15(5):1147-54.
399. Harbhajanka A, Lamzabi I, Bitterman P, Reddy VB, Ghai R, Gattuso P. Correlation of p16 Expression on Cancer and Stromal Cells With Clinicopathologic and Immunohistochemical Features of Lobular Breast Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2019;27(9):658-62.
400. Sugianto J, Sarode V, Peng Y. Ki-67 expression is increased in p16-expressing triple-negative breast carcinoma and correlates with p16 only in p53-negative tumors. *Hum Pathol.* 2014;45(4):802-9.
401. Subhawong AP, Subhawong T, Nassar H, Kouprina N, Begum S, Vang R, et al. Most basal-like breast carcinomas demonstrate the same Rb-/p16+ immunophenotype as the HPV-related poorly differentiated squamous cell carcinomas which they resemble morphologically. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(2):163-75.
402. Shi Q, Xu L, Yang R, Meng Y, Qiu L. Ki-67 and P16 proteins in cervical cancer and precancerous lesions of young women and the diagnostic value for cervical cancer and precancerous lesions. *Oncol Lett.* 2019;18(2):1351-5.
403. Wang X, Zhao Y, Zou X, Wang L. Relationship of P16 and Ki67 in recurrence of HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol.* 2020;13(12):3174-80.
404. Gauthier ML, Berman HK, Miller C, Kozakeiwicz K, Chew K, Moore D, et al. Abrogated response to cellular stress identifies DCIS associated with subsequent tumor events and defines basal-like breast tumors. *Cancer Cell.* 2007;12(5):479-91.
405. Kerlikowske K, Molinaro AM, Gauthier ML, Berman HK, Waldman F, Bennington J, et al. Biomarker expression and risk of subsequent tumors after initial ductal carcinoma in situ diagnosis. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(9):627-37.
406. Shin E, Jung WH, Koo JS. Expression of p16 and pRB in invasive breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(7):8209-17.
407. DAI X-Z. Expressions of FOSB and P16 and their correlation in different molecular subtypes of breast invasive ductal cancer. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science).* 2020;12:1103-7.
408. Ortiz AB, Garcia D, Vicente Y, Palka M, Bellas C, Martin P. Prognostic significance of cyclin D1 protein expression and gene amplification in invasive breast carcinoma. *PLoS One.* 2017;12(11):e0188068.
409. Shan M, Zhang X, Liu X, Qin Y, Liu T, Liu Y, et al. P16 and p53 play distinct roles in different subtypes of breast cancer. *PLoS One.* 2013;8(10):e76408.

410. Kobierzycki C, Grzegorzolka J, Glatzel-Plucinska N, Piotrowska A, Wojnar A, Smolarz B, et al. Expression of p16 and SATB1 in Invasive Ductal Breast Cancer - A Preliminary Study. *In Vivo*. 2018;32(4):731-6.
411. Feriancová M, Walter I, Singer CF, Gazdarica J, Pohlodek K. Expression of COX-2, p16, and Ki67 in the range from normal breast tissue to breast cancer. *Neoplasma*. 2021;68(2):342-51.
412. Evangelou K, Bramis J, Peros I, Zacharatos P, Dasiou-Plakida D, Kalogeropoulos N, et al. Electron microscopy evidence that cytoplasmic localization of the p16(INK4A) "nuclear" cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) in tumor cells is specific and not an artifact. A study in non-small cell lung carcinomas. *Biotech Histochem*. 2004;79(1):5-10.
413. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Leonart ME, Castellvi J, et al. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 2011;30(18):2087-97.
414. Gump J, Stokoe D, McCormick F. Phosphorylation of p16INK4A correlates with Cdk4 association. *J Biol Chem*. 2003;278(9):6619-22.
415. Nilsson K, Landberg G. Subcellular localization, modification and protein complex formation of the cdk-inhibitor p16 in Rb-functional and Rb-inactivated tumor cells. *Int J Cancer*. 2006;118(5):1120-5.
416. Souza-Rodríguez E, Estanyol JM, Friedrich-Heineken E, Olmedo E, Vera J, Canela N, et al. Proteomic analysis of p16ink4a-binding proteins. *Proteomics*. 2007;7(22):4102-11.
417. Shen WW, Wu J, Cai L, Liu BY, Gao Y, Chen GQ, et al. Expression of anion exchanger 1 sequesters p16 in the cytoplasm in gastric and colonic adenocarcinoma. *Neoplasia*. 2007;9(10):812-9.
418. Chung T, Do SI, Na K, Kim G, Jeong YI, Kim YW, et al. Stromal p16 Overexpression in Gastric-type Mucinous Carcinoma of the Uterine Cervix. *Anticancer Res*. 2018;38(6):3551-8.
419. Jung A, Schrauder M, Oswald U, Knoll C, Sellberg P, Palmqvist R, et al. The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. *Am J Pathol*. 2001;159(5):1613-7.
420. Natarajan E, Saeb M, Crum CP, Woo SB, McKee PH, Rheinwald JG. Co-expression of p16(INK4A) and laminin 5 gamma2 by microinvasive and superficial squamous cell carcinomas in vivo and by migrating wound and senescent keratinocytes in culture. *Am J Pathol*. 2003;163(2):477-91.
421. Svensson S, Nilsson K, Ringberg A, Landberg G. Invade or proliferate? Two contrasting events in malignant behavior governed by p16(INK4a) and an intact Rb pathway illustrated by a model system of basal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63(8):1737-42.
422. Palmqvist R, Rutegård JN, Bozoky B, Landberg G, Stenling R. Human colorectal cancers with an intact p16/cyclin D1/pRb pathway have up-regulated p16 expression and decreased proliferation in small invasive tumor clusters. *Am J Pathol*. 2000;157(6):1947-53.
423. Moritani S, Ichihara S, Hasegawa M, Iwakoshi A, Murakami S, Sato T, et al. Stromal p16 expression differentiates endometrial polyp from endometrial hyperplasia. *Virchows Arch*. 2012;461(2):141-8.
424. Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(2):273-83.
425. Baker DJ, Alimirah F, van Deursen JM, Campisi J, Hildesheim J. Oncogenic senescence: a multi-functional perspective. *Oncotarget*. 2017;8(16):27661-72.
426. Lecot P, Alimirah F, Desprez PY, Campisi J, Wiley C. Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development. *Br J Cancer*. 2016;114(11):1180-4.

427. Kim YH, Choi YW, Lee J, Soh EY, Kim JH, Park TJ. Senescent tumor cells lead the collective invasion in thyroid cancer. *Nat Commun.* 2017;8:15208.
428. He Q, Au B, Kulkarni M, Shen Y, Lim KJ, Maimaiti J, et al. Chromosomal instability-induced senescence potentiates cell non-autonomous tumorigenic effects. *Oncogenesis.* 2018;7(8):62.
429. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(21):12072-7.
430. Liu D, Hornsby PJ. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res.* 2007;67(7):3117-26.
431. Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A, Campisi J. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 3):485-96.
432. Sun P, Yoshizuka N, New L, Moser BA, Li Y, Liao R, et al. PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell.* 2007;128(2):295-308.
433. Choi J, Shendrik I, Peacocke M, Peehl D, Buttyan R, Ikeguchi EF, et al. Expression of senescence-associated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 2000;56(1):160-6.
434. Ohuchida K, Mizumoto K, Murakami M, Qian LW, Sato N, Nagai E, et al. Radiation to stromal fibroblasts increases invasiveness of pancreatic cancer cells through tumor-stromal interactions. *Cancer Res.* 2004;64(9):3215-22.
435. Boutelle AM, Attardi LD. p53 and Tumor Suppression: It Takes a Network. *Trends Cell Biol.* 2021;31(4):298-310.
436. Levine AJ. Reviewing the future of the P53 field. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):1-2.
437. Mantovani F, Collavin L, Del Sal G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ.* 2019;26(2):199-212.
438. Hwang HJ, Nam SK, Park H, Park Y, Koh J, Na HY, et al. Prediction of TP53 mutations by p53 immunohistochemistry and their prognostic significance in gastric cancer. *J Pathol Transl Med.* 2020;54(5):378-86.
439. Köbel M, Ronnett BM, Singh N, Soslow RA, Gilks CB, McCluggage WG. Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: Toward Increased Reproducibility. *Int J Gynecol Pathol.* 2019;38 Suppl 1(Iss 1 Suppl 1):S123-s31.
440. Ekundina OV EC, Apulu OP, Ayodele OO. Cell Proliferation, Contact Inhibition, and Apoptosis Profiling in a Benign and Malignant Breast Lesion. *Int J Oncol Res.* 2022;5:034.
441. Pare R, Soon PS, Shah A, Lee CS. Differential expression of senescence tumour markers and its implications on survival outcomes of breast cancer patients. *PLoS One.* 2019;14(4):e0214604.
442. Zhang C, Liu J, Xu D, Zhang T, Hu W, Feng Z. Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy. *J Mol Cell Biol.* 2020;12(9):674-87.
443. Bykov VJN, Eriksson SE, Bianchi J, Wiman KG. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(2):89-102.
444. Barbosa K, Li S, Adams PD, Deshpande AJ. The role of TP53 in acute myeloid leukemia: Challenges and opportunities. *Genes Chromosomes Cancer.* 2019;58(12):875-88.
445. Cordani M, Butera G, Pacchiana R, Masetto F, Mullappilly N, Riganti C, et al. Mutant p53-Associated Molecular Mechanisms of ROS Regulation in Cancer Cells. *Biomolecules.* 2020;10(3).
446. Roszkowska KA, Gizinski S, Sady M, Gajewski Z, Olszewski MB. Gain-of-Function Mutations in p53 in Cancer Invasiveness and Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4).
447. Galoczova M, Coates P, Vojtesek B. STAT3, stem cells, cancer stem cells and p63. *Cell Mol Biol Lett.* 2018;23:12.

448. Kim Y, Park JB, Fukuda J, Watanabe M, Chun YS. The Effect of Neddylation Blockade on Slug-Dependent Cancer Cell Migration Is Regulated by p53 Mutation Status. *Cancers (Basel)*. 2021;13(3).
449. Dhar D, Antonucci L, Nakagawa H, Kim JY, Glitzner E, Caruso S, et al. Liver Cancer Initiation Requires p53 Inhibition by CD44-Enhanced Growth Factor Signaling. *Cancer Cell*. 2018;33(6):1061-77.e6.
450. Muller PA, Caswell PT, Doyle B, Iwanicki MP, Tan EH, Karim S, et al. Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. *Cell*. 2009;139(7):1327-41.
451. Lakoduk AM, Lee CF, Chen PH. Gain-of-'endocytic' function in mutant p53 cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2021;131:105905.
452. Jassim MMA, Rasool KH, Mahmood MM. p53, p21, and cyclin d1 protein expression patterns in patients with breast cancer. *Vet World*. 2021;14(10):2833-8.
453. Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2002;4(2):70-6.
454. Lari SA, Kuerer HM. Biological Markers in DCIS and Risk of Breast Recurrence: A Systematic Review. *J Cancer*. 2011;2:232-61.
455. Pape-Zambito D, Jiang Z, Wu H, Devarajan K, Slater CM, Cai KQ, et al. Identifying a highly-aggressive DCIS subgroup by studying intra-individual DCIS heterogeneity among invasive breast cancer patients. *PLoS One*. 2014;9(6):e100488.
456. Rivero LF, Graudenz MS, Aschton-Prolla P, Delgado AM, Kliemann LM. Accuracy of p53 and ki-67 in the graduation of phyllodes tumor, a model for practical application. *Surgical and Experimental Pathology*. 2020;3(1):7.
457. Wade M, Wang YV, Wahl GM. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends Cell Biol*. 2010;20(5):299-309.
458. Wang XZ, Liu Q, Sun JJ, Zuo WS, Hu DW, Ma SG, et al. Correlation between p53 and epidermal growth factor receptor expression in breast cancer classification. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):4282-90.
459. Miedl H, Leibold J, Ehart L, Schreiber M. Association of the MDM2 SNP285 and SNP309 Genetic Variants with the Risk, Age at Onset and Prognosis of Breast Cancer in Central European Women: A Hospital-Based Case-Control Study. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
460. Opoku F, Bedu-Addo K, Titiloye NA, Atta Manu E, Ameh-Mensah C, Duduyemi BM. Expression profile of tumour suppressor protein p53 and its regulator MDM2 in a cohort of breast cancer patients in a Tertiary Hospital in Ghana. *PLoS One*. 2021;16(10):e0258543.
461. Lee M, Park IA, Heo SH, Kim YA, Gong G, Lee HJ. Association between p53 Expression and Amount of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer. *J Pathol Transl Med*. 2019;53(3):180-7.
462. Kato T, Kameoka S, Kimura T, Tanaka S, Nishikawa T, Kobayashi M. p53, mitosis, apoptosis and necrosis as prognostic indicators of long-term survival in breast cancer. *Anticancer Res*. 2002;22(2b):1105-12.
463. Karsch-Bluman A, Feiglin A, Arbib E, Stern T, Shoval H, Schwob O, et al. Tissue necrosis and its role in cancer progression. *Oncogene*. 2019;38(11):1920-35.
464. Melhem-Bertrandt A, Bojadzieva J, Ready KJ, Obeid E, Liu DD, Gutierrez-Barrera AM, et al. Early onset HER2-positive breast cancer is associated with germline TP53 mutations. *Cancer*. 2012;118(4):908-13.
465. Rana MK, Rana APS, Khera U. Expression of p53 and p16 in Carcinoma Breast Tissue: Depicts Prognostic Significance or Coincidence. *Cureus*. 2021;13(11):e19395.
466. Wilson JR, Bateman AC, Hanson H, An Q, Evans G, Rahman N, et al. A novel HER2-positive breast cancer phenotype arising from germline TP53 mutations. *J Med Genet*. 2010;47(11):771-4.

467. Bull SB, Ozcelik H, Pinnaduwege D, Blackstein ME, Sutherland DA, Pritchard KI, et al. The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22(1):86-96.
468. Román-Rosales AA, García-Villa E, Herrera LA, Gariglio P, Díaz-Chávez J. Mutant p53 gain of function induces HER2 over-expression in cancer cells. *BMC Cancer*. 2018;18(1):709.
469. Fedorova O, Daks A, Shuvalov O, Kizenko A, Petukhov A, Gnennaya Y, et al. Attenuation of p53 mutant as an approach for treatment Her2-positive cancer. *Cell Death Discov*. 2020;6:100.
470. Yallowitz AR, Li D, Lobko A, Mott D, Nemaierova A, Marchenko N. Mutant p53 Amplifies Epidermal Growth Factor Receptor Family Signaling to Promote Mammary Tumorigenesis. *Mol Cancer Res*. 2015;13(4):743-54.
471. Li D, Yallowitz A, Ozog L, Marchenko N. A gain-of-function mutant p53-HSF1 feed forward circuit governs adaptation of cancer cells to proteotoxic stress. *Cell Death Dis*. 2014;5(4):e1194.
472. Casalini P, Botta L, Menard S. Role of p53 in HER2-induced proliferation or apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;276(15):12449-53.
473. Payandeh M, Shahriari-Ahmadi A, Sadeghi M, Sadeghi E. Correlations between HER2 Expression and Other Prognostic Factors in Breast Cancer: Inverse Relations with the Ki-67 Index and P53 Status. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(3):1015-8.
474. Zhang G, Shi Z, Liu L, Yuan H, Pan Z, Li W, et al. The prognostic relevance of p53 and Ki-67 to chemotherapy sensitivity and prognosis in triple-negative breast cancer. *Transl Cancer Res*. 2021;10(2):1082-7.
475. Firouzabadi D, Rezvani A, Dehghanian A, Mahmoudi L. Association of ki67 and tumor marker p53 in locally advanced breast cancer patients and evaluation of response to neoadjuvant chemotherapy: a survey in South Iran. *Cancer Manag Res*. 2019;11:6489-97.
476. Mohd Ali NA, Nasaruddin AF, Mohamed SS, Wan Rahman WF. Ki67 and P53 Expression in Relation to Clinicopathological Features in Phyllodes Tumour of the Breast. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2020;21(9):2653-9.
477. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984;133(4):1710-5.
478. Zhu X, Chen L, Huang B, Wang Y, Ji L, Wu J, et al. The prognostic and predictive potential of Ki-67 in triple-negative breast cancer. *Sci Rep*. 2020;10(1):225.
479. Wu Q, Ma G, Deng Y, Luo W, Zhao Y, Li W, et al. Prognostic Value of Ki-67 in Patients With Resected Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2019;9:1068.
480. Luo ZW, Zhu MG, Zhang ZQ, Ye FJ, Huang WH, Luo XZ. Increased expression of Ki-67 is a poor prognostic marker for colorectal cancer patients: a meta analysis. *BMC Cancer*. 2019;19(1):123.
481. Kang YJ, Lee HB, Kim YG, Han J, Kim Y, Yoo TK, et al. Ki-67 Expression is a Significant Prognostic Factor Only When Progesterone Receptor Expression is Low in Estrogen Receptor-Positive and HER2-Negative Early Breast Cancer. *J Oncol*. 2019;2019:7386734.
482. Sehouli J, Braicu EI, Richter R, Denkert C, Jank P, Jurmeister PS, et al. Prognostic significance of Ki-67 levels and hormone receptor expression in low-grade serous ovarian carcinoma: an investigation of the Tumor Bank Ovarian Cancer Network. *Hum Pathol*. 2019;85:299-308.

483. Wang MJ, Pei DS, Qian GW, Yin XX, Cheng Q, Li LT, et al. p53 regulates Ki-67 promoter activity through p53- and Sp1-dependent manner in HeLa cells. *Tumour Biol.* 2011;32(5):905-12.
484. Mehta P NS, Narang S. Role of p53 and Ki-67 in prognostication of carcinoma breast. *Indian Journal of Pathology and Oncology* 2019;6(2):261-5.
485. Liu W, Konduri SD, Bansal S, Nayak BK, Rajasekaran SA, Karuppayil SM, et al. Estrogen receptor-alpha binds p53 tumor suppressor protein directly and represses its function. *J Biol Chem.* 2006;281(15):9837-40.
486. Angeloni SV, Martin MB, Garcia-Morales P, Castro-Galache MD, Ferragut JA, Saceda M. Regulation of estrogen receptor-alpha expression by the tumor suppressor gene p53 in MCF-7 cells. *J Endocrinol.* 2004;180(3):497-504.
487. Shirley SH, Rundhaug JE, Tian J, Cullinan-Ammann N, Lambertz I, Conti CJ, et al. Transcriptional regulation of estrogen receptor-alpha by p53 in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2009;69(8):3405-14.
488. Berger C, Qian Y, Chen X. The p53-estrogen receptor loop in cancer. *Curr Mol Med.* 2013;13(8):1229-40.
489. Karray-Chouayekh S, Baccouche S, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M, et al. Prognostic significance of p16INK4a/p53 in Tunisian patients with breast carcinoma. *Acta Histochem.* 2011;113(5):508-13.
490. Bado I, Pham E, Soibam B, Nikolos F, Gustafsson J, Thomas C. ER β alters the chemosensitivity of luminal breast cancer cells by regulating p53 function. *Oncotarget.* 2018;9(32):22509-22.
491. 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.
492. Giuliano AE, Edge SB, Hortobagyi GN. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2018;25(7):1783-5.
493. González-Sistal A, Sánchez AB, Del Rio MC, Arias JI, Herranz M, Ruibal A. Association between tumor size and immunohistochemical expression of Ki-67, p53 and BCL2 in a node-negative breast cancer population selected from a breast cancer screening program. *Anticancer Res.* 2014;34(1):269-73.
494. Temmim L, Baker H, Sinowatz F. Immunohistochemical detection of p53 protein expression in breast cancer in young Kuwaiti women. *Anticancer Res.* 2001;21(1b):743-8.
495. Al-Joudi FS, Iskandar ZA, Rusli J. The expression of p53 in invasive ductal carcinoma of the breast: a study in the North-East States of Malaysia. *Med J Malaysia.* 2008;63(2):96-9.
496. Jindal B TR, Mohan A, Ansari V, Sharma VK. Role of p53 as a prognostic marker in breast carcinoma and its correlation with tumor size, tumor grade and lymph node metastasis. *Indian J Pathol Oncol.* 2020;7(3):378-83.
497. Mansilla SF, de la Vega MB, Calzetta NL, Siri SO, Gottifredi V. CDK-Independent and PCNA-Dependent Functions of p21 in DNA Replication. *Genes (Basel).* 2020;11(6).
498. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Ala-Opas M, Kosma VM. Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer. *Prostate.* 1999;39(1):8-15.
499. Cheung TH, Lo KW, Yu MM, Yim SF, Poon CS, Chung TK, et al. Aberrant expression of p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1) in cervical carcinoma. *Cancer Lett.* 2001;172(1):93-8.
500. Winters ZE, Hunt NC, Bradburn MJ, Royds JA, Turley H, Harris AL, et al. Subcellular localisation of cyclin B, Cdc2 and p21(WAF1/CIP1) in breast cancer. association with prognosis. *Eur J Cancer.* 2001;37(18):2405-12.

501. Sarbia M, Stahl M, zur Hausen A, Zimmermann K, Wang L, Fink U, et al. Expression of p21WAF1 predicts outcome of esophageal cancer patients treated by surgery alone or by combined therapy modalities. *Clin Cancer Res.* 1998;4(11):2615-23.
502. LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, et al. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 1997;11(7):847-62.
503. Liu Y, Yeh N, Zhu XH, Leversha M, Cordon-Cardo C, Ghossein R, et al. Somatic cell type specific gene transfer reveals a tumor-promoting function for p21(Waf1/Cip1). *Embo j.* 2007;26(22):4683-93.
504. Alt JR, Gladden AB, Diehl JA. p21(Cip1) Promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J Biol Chem.* 2002;277(10):8517-23.
505. Kehn K, Deng L, de la Fuente C, Strouss K, Wu K, Maddukuri A, et al. The role of cyclin D2 and p21/waf1 in human T-cell leukemia virus type 1 infected cells. *Retrovirology.* 2004;1:6.
506. Wei CY, Tan QX, Zhu X, Qin QH, Zhu FB, Mo QG, et al. Expression of CDKN1A/p21 and TGFBR2 in breast cancer and their prognostic significance. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(11):14619-29.
507. Zohny SF, Baothman OA, El-Shinawi M, Al-Malki AL, Zamzami MA, Choudhry H. The KIP/CIP family members p21^{Waf1/Cip1} and p57^{Kip2} as diagnostic markers for breast cancer. *Cancer Biomark.* 2017;18(4):413-23.
508. Barbareschi M, Caffo O, Doglioni C, Fina P, Marchetti A, Buttitta F, et al. p21WAF1 immunohistochemical expression in breast carcinoma: correlations with clinicopathological data, oestrogen receptor status, MIB1 expression, p53 gene and protein alterations and relapse-free survival. *Br J Cancer.* 1996;74(2):208-15.
509. Bánkfalvi A, Tory K, Kemper M, Breukelmann D, Cubick C, Poremba C, et al. Clinical relevance of immunohistochemical expression of p53-targeted gene products mdm-2, p21 and bcl-2 in breast carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2000;196(7):489-501.
510. Mansouri S, Esmaili R, Kaviani A, Rezaei M, Abdoli N, Mokhtari-Hesari P, et al. The Interaction Between the Expression of Proliferative Biomarkers and Clinical Characteristics in Breast Cancer. *Multidisciplinary Cancer Investigation.* 2018;2(2):20-8.
511. Balbín M, Hannon GJ, Pendás AM, Ferrando AA, Vizoso F, Fueyo A, et al. Functional analysis of a p21WAF1,CIP1,SDI1 mutant (Arg94 --> Trp) identified in a human breast carcinoma. Evidence that the mutation impairs the ability of p21 to inhibit cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem.* 1996;271(26):15782-6.
512. Bedir R, Güçer H, Şehitoğlu İ, Yurdakul C, Bağcı P, Üstüner P. The Role of p16, p21, p27, p53 and Ki-67 Expression in the Differential Diagnosis of Cutaneous Squamous Cell Carcinomas and Keratoacanthomas: An Immunohistochemical Study. *Balkan Med J.* 2016;33(2):121-7.
513. Caffo O, Doglioni C, Veronese S, Bonzanini M, Marchetti A, Buttitta F, et al. Prognostic value of p21(WAF1) and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up. *Clin Cancer Res.* 1996;2(9):1591-9.
514. Xia W, Chen JS, Zhou X, Sun PR, Lee DF, Liao Y, et al. Phosphorylation/cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 is associated with HER2/neu overexpression and provides a novel combination predictor for poor prognosis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004;10(11):3815-24.
515. Diaz Flaqué MC, Vicario R, Proietti CJ, Izzo F, Schillaci R, Elizalde PV. Progesterone drives breast cancer growth by inducing p21(CIP1) expression through the assembly of a transcriptional complex among Stat3, progesterone receptor and ErbB-2. *Steroids.* 2013;78(6):559-67.

516. Cheng X, Xia W, Yang JY, Hsu JL, Chou CK, Sun HL, et al. Activation of p21(CIP1/WAF1) in mammary epithelium accelerates mammary tumorigenesis and promotes lung metastasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;403(1):103-7.
517. Zhou BP, Hu MC, Miller SA, Yu Z, Xia W, Lin SY, et al. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem.* 2000;275(11):8027-31.
518. Girimanhanaika SS, Dukanya D, Swamynayaka A, Govindachar DM, Madegowda M, Periyasamy G, et al. Investigation of NPB Analogs That Target Phosphorylation of BAD-Ser99 in Human Mammary Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(20).
519. Li D, Ni S, Miao KS, Zhuang C. PI3K/Akt and caspase pathways mediate oxidative stress-induced chondrocyte apoptosis. *Cell Stress Chaperones.* 2019;24(1):195-202.
520. Chibaya L, Karim B, Zhang H, Jones SN. Mdm2 phosphorylation by Akt regulates the p53 response to oxidative stress to promote cell proliferation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(4).
521. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol.* 2001;3(3):245-52.
522. Chen M, Zhang H, Zhang G, Zhong A, Ma Q, Kai J, et al. Targeting TPX2 suppresses proliferation and promotes apoptosis via repression of the PI3k/AKT/P21 signaling pathway and activation of p53 pathway in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;507(1-4):74-82.
523. Yu D, Jing T, Liu B, Yao J, Tan M, McDonnell TJ, et al. Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Mol Cell.* 1998;2(5):581-91.
524. Li F, Kitajima S, Kohno S, Yoshida A, Tange S, Sasaki S, et al. Retinoblastoma Inactivation Induces a Protumoral Microenvironment via Enhanced CCL2 Secretion. *Cancer Res.* 2019;79(15):3903-15.
525. McNair C, Xu K, Mandigo AC, Benelli M, Leiby B, Rodrigues D, et al. Differential impact of RB status on E2F1 reprogramming in human cancer. *J Clin Invest.* 2018;128(1):341-58.
526. Pietiläinen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma VM, Syrjänen K. Expression of retinoblastoma gene protein (Rb) in breast cancer as related to established prognostic factors and survival. *Eur J Cancer.* 1995;31a(3):329-33.
527. Chano T, Kontani K, Teramoto K, Okabe H, Ikegawa S. Truncating mutations of RB1CC1 in human breast cancer. *Nat Genet.* 2002;31(3):285-8.
528. Borg A, Zhang QX, Alm P, Olsson H, Sellberg G. The retinoblastoma gene in breast cancer: allele loss is not correlated with loss of gene protein expression. *Cancer Res.* 1992;52(10):2991-4.
529. Bosco EE, Wang Y, Xu H, Zilfou JT, Knudsen KE, Aronow BJ, et al. The retinoblastoma tumor suppressor modifies the therapeutic response of breast cancer. *J Clin Invest.* 2007;117(1):218-28.
530. Jares P, Rey MJ, Fernández PL, Campo E, Nadal A, Muñoz M, et al. Cyclin D1 and retinoblastoma gene expression in human breast carcinoma: correlation with tumour proliferation and oestrogen receptor status. *J Pathol.* 1997;182(2):160-6.
531. Nielsen NH, Lodén M, Cajander J, Emdin SO, Landberg G. G1-S transition defects occur in most breast cancers and predict outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 1999;56(2):105-12.
532. Ishida S, Huang E, Zuzan H, Spang R, Leone G, West M, et al. Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol.* 2001;21(14):4684-99.

533. Markey MP, Angus SP, Strobeck MW, Williams SL, Gunawardena RW, Aronow BJ, et al. Unbiased analysis of RB-mediated transcriptional repression identifies novel targets and distinctions from E2F action. *Cancer Res.* 2002;62(22):6587-97.
534. Sawan A, Randall B, Angus B, Wright C, Henry JA, Ostrowski J, et al. Retinoblastoma and p53 gene expression related to relapse and survival in human breast cancer: an immunohistochemical study. *J Pathol.* 1992;168(1):23-8.
535. Gope ML, Chun M, Gope R. Comparative study of the expression of Rb and p53 genes in human colorectal cancers, colon carcinoma cell lines and synchronized human fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* 1991;107(1):55-63.
536. Gope R, Gope ML. Abundance and state of phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in human colon cancer. *Mol Cell Biochem.* 1992;110(2):123-33.
537. Ali AA, Marcus JN, Harvey JP, Roll R, Hodgson CP, Wildrick DM, et al. RB1 protein in normal and malignant human colorectal tissue and colon cancer cell lines. *Faseb j.* 1993;7(10):931-7.
538. Morris EJ, Ji JY, Yang F, Di Stefano L, Herr A, Moon NS, et al. E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature.* 2008;455(7212):552-6.
539. Viatour P, Sage J. Newly identified aspects of tumor suppression by RB. *Dis Model Mech.* 2011;4(5):581-5.
540. Abdel-Aziz A, Ahmed RA, Ibrahiem AT. Expression of pRb, Ki67 and HER 2/neu in gastric carcinomas: Relation to different histopathological grades and stages. *Ann Diagn Pathol.* 2017;30:1-7.
541. Chou NH, Chen HC, Chou NS, Hsu PI, Tseng HH. Expression of altered retinoblastoma protein inversely correlates with tumor invasion in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2006;12(44):7188-91.
542. Arici DS, Tuncer E, Ozer H, Simek G, Koyuncu A. Expression of retinoblastoma and cyclin D1 in gastric carcinoma. *Neoplasma.* 2009;56(1):63-7.
543. Polager S, Ginsberg D. p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(10):738-48.
544. Lee EY, Chang CY, Hu N, Wang YC, Lai CC, Herrup K, et al. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature.* 1992;359(6393):288-94.
545. Almasan A, Yin Y, Kelly RE, Lee EY, Bradley A, Li W, et al. Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(12):5436-40.
546. Pennaneach V, Salles-Passador I, Munshi A, Brickner H, Regazzoni K, Dick F, et al. The large subunit of replication factor C promotes cell survival after DNA damage in an LxCxE motif- and Rb-dependent manner. *Mol Cell.* 2001;7(4):715-27.
547. Ianari A, Natale T, Calo E, Ferretti E, Alesse E, Screpanti I, et al. Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Cancer Cell.* 2009;15(3):184-94.
548. Arhel NJ, Packham G, Townsend PA, Collard TJ, AM HZ, Sharp A, et al. The retinoblastoma protein interacts with Bag-1 in human colonic adenoma and carcinoma derived cell lines. *Int J Cancer.* 2003;106(3):364-71.
549. Townsend PA, Stephanou A, Packham G, Latchman DS. BAG-1: a multi-functional pro-survival molecule. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(2):251-9.
550. Zhang XY, Pfeiffer HK, Mellert HS, Stanek TJ, Sussman RT, Kumari A, et al. Inhibition of the single downstream target BAG1 activates the latent apoptotic potential of MYC. *Mol Cell Biol.* 2011;31(24):5037-45.

551. Witkiewicz AK, Knudsen ES. Retinoblastoma tumor suppressor pathway in breast cancer: prognosis, precision medicine, and therapeutic interventions. *Breast Cancer Res.* 2014;16(3):207.
552. Gavressea T, Kalogeras KT, Koliou GA, Zagouri F, Lazaridis G, Gogas H, et al. The Prognostic Value of the Immunohistochemical Expression of Phosphorylated RB and p16 Proteins in Association with Cyclin D1 and the p53 Pathway in a Large Cohort of Patients with Breast Cancer Treated with Taxane-based Adjuvant Chemotherapy. *Anticancer Res.* 2017;37(6):2947-57.
553. Kowalik A, Kopczyński J, Wypiórkiewicz E, Gózdź S, Mezyk R, Siedlecki JA. Active transport of RB protein from the nucleus to the cytoplasm as one of the development mechanisms of HER2-positive breast cancer. *Pol J Pathol.* 2013;64(1):9-14.
554. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(2):75-95.
555. Alexandraki KI, Munayem Khan M, Chahal HS, Dalantaeva NS, Trivellin G, Berney DM, et al. Oncogene-induced senescence in pituitary adenomas and carcinomas. *Hormones (Athens).* 2012;11(3):297-307.
556. Cotarelo CL, Schad A, Kirkpatrick CJ, Sleeman JP, Springer E, Schmidt M, et al. Detection of cellular senescence within human invasive breast carcinomas distinguishes different breast tumor subtypes. *Oncotarget.* 2016;7(46):74846-59.
557. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490(7418):61-70.
558. Kudlova N, De Sanctis JB, Hajduch M. Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs. *Int J Mol Sci.* 2022;23(8).
559. Wagner J, Damaschke N, Yang B, Truong M, Guenther C, McCormick J, et al. Overexpression of the novel senescence marker β -galactosidase (GLB1) in prostate cancer predicts reduced PSA recurrence. *PLoS One.* 2015;10(4):e0124366.
560. Yang M, Jiang Z, Yao G, Wang Z, Sun J, Qin H, et al. GALC Triggers Tumorigenicity of Colorectal Cancer via Senescent Fibroblasts. *Front Oncol.* 2020;10:380.
561. Al-Khalaf HH, Ghebeh H, Inass R, Aboussekhra A. Senescent Breast Luminal Cells Promote Carcinogenesis through Interleukin-8-Dependent Activation of Stromal Fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 2019;39(2).
562. Mavrogonatou E, Pratsinis H, Papadopoulou A, Karamanos NK, Kletsas D. Extracellular matrix alterations in senescent cells and their significance in tissue homeostasis. *Matrix Biol.* 2019;75-76:27-42.
563. Krtolica A, Campisi J. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34(11):1401-14.
564. Yun HR, Jo YH, Kim J, Shin Y, Kim SS, Choi TG. Roles of Autophagy in Oxidative Stress. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9).
565. Wu Z, Wang H, Fang S, Xu C. Roles of endoplasmic reticulum stress and autophagy on H₂O₂-induced oxidative stress injury in HepG2 cells. *Mol Med Rep.* 2018;18(5):4163-74.
566. Huang X, He C, Hua X, Kan A, Mao Y, Sun S, et al. Oxidative stress induces monocyte-to-myofibroblast transdifferentiation through p38 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Transl Med.* 2020;10(2):e41.
567. Capparelli C, Guido C, Whitaker-Menezes D, Bonuccelli G, Balliet R, Pestell TG, et al. Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis via glycolysis and ketone production. *Cell Cycle.* 2012;11(12):2285-302.
568. van Jaarsveld MTM, Deng D, Wiemer EAC, Zi Z. Tissue-Specific Chk1 Activation Determines Apoptosis by Regulating the Balance of p53 and p21. *iScience.* 2019;12:27-40.

569. Zhou J, Zhang C, Sui X, Cao S, Tang F, Sun S, et al. Histone deacetylase inhibitor chidamide induces growth inhibition and apoptosis in NK/T lymphoma cells through ATM-Chk2-p53-p21 signalling pathway. *Invest New Drugs*. 2018;36(4):571-80.
570. Wang H, Xu G, Huang Z, Li W, Cai H, Zhang Y, et al. Correction: NLRP6 targeting suppresses gastric tumorigenesis via P14(ARF)-Mdm2-P53-dependent cellular senescence. *Oncotarget*. 2018;9(84):35512.
571. Hudgins AD, Tazearslan C, Tare A, Zhu Y, Huffman D, Suh Y. Age- and Tissue-Specific Expression of Senescence Biomarkers in Mice. *Front Genet*. 2018;9:59.
572. Pezzuto A, D'Ascanio M, Ricci A, Pagliuca A, Carico E. Expression and role of p16 and GLUT1 in malignant diseases and lung cancer: A review. *Thorac Cancer*. 2020;11(11):3060-70.
573. Aagaard L, Lukas J, Bartkova J, Kjerulff AA, Strauss M, Bartek J. Aberrations of p16Ink4 and retinoblastoma tumour-suppressor genes occur in distinct sub-sets of human cancer cell lines. *Int J Cancer*. 1995;61(1):115-20.
574. Zeng S, Shen WH, Liu L. Senescence and Cancer. *Cancer Transl Med*. 2018;4(3):70-4.

БИОГРАФИЈА

Далибор Јовановић је рођен 30.11.1984. године у Крагујевцу. Основну школу “Доситеј Обрадовић” и Медицинску школу са домом ученика „Сестре Нинковић“ је завршио у Крагујевцу. Интегрисане академске студије медицине је уписао 2003., на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, а завршио 2009. године са просечном оценом 9.21. Током студирања био је Стипендиста Фонда за младе таленте Министарства Омладине и Спорта – стипендија за хиљаду најбољих студената у Србији. Докторске академске студије – смер Онкологија, уписао је 2010. године, на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Након положених свих програмом предвиђених испита, укључујући и усмени докторски испит, пријавио је своју докторску дисертацију која је прихваћена 08.09.2017. год.

Др Далибор Јовановић је запослен на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу од 2011. године, сада у звању истраживач сарадник за ужу научну област Патолошка анатомија. Такође је ангажован као коистраживач на јуниор пројекту Факултета медицинских наука у Крагујевцу, под називом: „Утицај сигналног пута *IL-33/ST2* на неоангиогенезу у карциному дојке”(ЈП 04-13), као и коистраживач на макро пројекту Факултета медицинских наука у Крагујевцу, под називом „Испитивање цитотоксичног дејства биоактивних супстанци и имуномодулација тумора“(МП 02-14).

Стручни испит пред комисијом Министарства здравља Републике Србије, положио је 28.09.2010. године. 2012. године, на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, уписао специјалистичке студије из области Патологија, а 2017. завршио са оценом одличан и стручним називом специјалиста патологије

Кандидат је као аутор или коаутор до сада публикувао 12 научних радова и то 2 рада категорије М22, 5 радова категорије М23, 2 рада категорије М51, 1 рад категорије М52 и 2 рада категорије М53.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Далибор Јовановић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

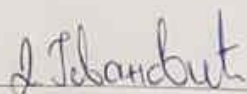
"УЛОГА ЂЕЛИЈСКЕ СЕНЕСЦЕНЦИЈЕ ИНДУКОВАНЕ ОНКОГЕНИМА У МАЛИГНОЈ ТРАНСФОРМАЦИЈИ И ПРОГРЕСИЈИ ТУМОРА ДОЛКЕ"

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског или другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 20.6.2022. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Далибор Јовановић

дозвољавам

не дозвољавам

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

**"УЛОГА ЋЕЛИЈСКЕ СЕНЕСЦЕНЦИЈЕ ИНДУКОВАНЕ ОНКОГЕНИМА
У МАЛИГНОЈ ТРАНСФОРМАЦИЈИ И ПРОГРЕСИЈИ ТУМОРА ДОЛКЕ"**

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

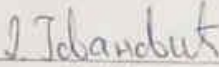
не дозвољавам¹

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

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

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

У Крагујевцу _____, 20.6.2022. године.


потпис аутора

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