



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



Милош З. Милосављевић

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

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: Доц. др Иван Јовановић

Крагујевац, 2016. године

САДРЖАЈ

УВОД	3
ЦИЉ СТУДИЈЕ	36
МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	37
РЕЗУЛТАТИ	54
ДИСКУСИЈА	113
ЗАКЉУЧЦИ	131
СКРАЋЕНИЦЕ	132
ЛИТЕРАТУРА	134

УВОД

1.1. Карцином дојке

1.1.1. Епидемиологија

Године 2010. у свету је регистровано око 1,4 милиона нових случајева болести и преко 450.000 смртних исхода са дијагнозом карцинома дојке. Епидемијски талас ове болести погађа и развијене и земље у развоју. Та расподела, када је у питању број оболелих, је 2010. године била готово равномерна, док је број смртних исхода у земљама у развоју био за око 40% већи. Студије оптерећења женске популације малигним болестима, показале су да је карцином дојке најзначајнији узрок болести када су у питању малигни тумори код жена, како на глобалном нивоу тако и у нашој земљи. Целоживотни ризик, односно кумулативна вероватноћа оболевања од карцинома дојке, износи око 12,4%, односно једна од 8 жена може очекивати да ће током свог живота оболети од ове болести. Карцином дојке у великом броју земаља чини око 25% свих малигних болести женске популације, у најразвијенијим земљама чак 28%, док у структури морталитета учествује са око 14-15%. У Србији, 26% свих оболелих и 17,5% свих умрлих жена због малигних тумора имају дијагнозу карцинома дојке. Просечна стандардизована стопа инциденције карцинома дојке у централној Србији у периоду 1999-2009. године износила је 60,8/100.000, а морталитетна стопа 20,2/100.000. Сличне вредности инциденције и морталитета од карцинома дојке региструју се и у Војводини. У земљама Европске уније просечна годишња инциденција карцинома дојке се креће у распону од 57/100.000 (Грчка) до 145/100.000 (Белгија), а морталитетна стопа од 18,4/100.000 (Шпанија) до 31,1/100.000 (Ирска). Географска дистрибуција карцинома дојке на глобалном нивоу није равномерна. Подручја у којима се региструје највиша учесталост болести су западна Европа, северна Америка, Аустралија, Нови Зеланд и неке земље јужне Америке (Аргентина), што се приписује вишој преваленцији познатих фактора ризика за ову болест у поменутиим регионима. Европска популација је такође поларизована у погледу учесталости карцинома дојке. Највише стопе инциденције региструју се у западној и северној Европи, док су стопе у јужној и источној Европи значајно ниже. Недавно објављена систематска анализа оболевања и умирања од карцинома дојке која је укључивала податке регистара за рак из

187 земаља (укључујући и Србију), показала је да учесталост болести на глобалном нивоу континуирано расте већ 630 година и да тај пораст износи 3,1% годишње, док морталитет варира. Анализа кретања инциденције карцинома дојке у западноевропским земљама показала је трендове драматичног пораста, посебно код жена старијих од 50 година, што се делом приписује чешћем и ранијем откривању болести, односно ефектима организованог скрининга, али и ефектима демографске транзиције, који воде повећању броја жена у ризику од болести. Када је у питању морталитет од карцинома дојке, евидентан је тренд опадања у САД и развијеним земљама. У Европи, кретање морталитета од карцинома дојке последњих деценија има различите тенденције, односно, креће се од смањења за 30% у Енглеској до повећања од 25% у Естонији. Осим контрибуције у повећању инциденције, нарочито у старијим узрасним групама, евидентан је и учинак скрининга у снижавању морталитета од карцинома дојке.

1.1.2. Инвазивни и *in situ* карцином дојке

Највећи број малигну обольења дојке припада аденокарциномима који су заступљени у 95% свих карцинома дојке (1). Инвазивни дуктални карцином (*IDC*) дојке је најчешћа форма инвазивних карцинома дојке са учесталошћу од 55% у односу на све дијагностиковане карциноме дојке (2). Карциноми дојке настају од истог сегмента терминалног канала лобуларне јединице (енгл. *Terminal duct lobular unit, TDLU*). Типизација инвазивних карцинома дојке као и њихове хистолошке варијанте су добро познате и описане. Генерално, карциноми дојке су подељени на *in situ* и инвазивне карциноме. *In situ* карциноми дојке представљају неинвазивну, потенцијално малигну интрадукталну пролиферацију епителних ћелија ограничену на дуктусе и лобулусе. Инвазивна или инфилтративна форма карцинома дојке се односи на малигну, абнормалну, пролиферацију неопластичних ћелија и урастање у стромално ткиво карцинома дојке и околне структуре. Инвазивна и *in situ* форма карцинома дојке се даље на основу свог порекла класификују у дуктлане и лобуларне карциноме дојке.

1.1.3. Инвазивни дуктални карцином (*IDC*)

Представља карцином дојке ког карактерише малигна дуктална пролиферација уз инвазију стромалног туморског ткива уз присуство или одсуство поља DCIS. Дијагноза се поставља на основу подтипа IDC а ређе на основу типа и градуса DCIS. IDC су

класификовани на велики број различитих хистолошких типова у складу са различитим критеријумима укључујући тип ћелија (као код апокриног карцинома), количину, тип и локализацију секреције (као код муцинозног карцинома), архитектонику ткива (као код папиларног, тубуларног и микропапиларног карцинома) и имунохистохемијски профил (као код неуроендокриних карцинома).

IDC је хетерогена група тумора класификована на основу хистолошких и цитолошких карактеристика јер показују мноштво морфолошких варијација. Неки од њих показују своје особености и понашање због чега се класификују као посебна подврста, док око 75% свих IDC не показују морфолошке особености и не класификују се у посебне подврете већ припадају категорији тип без посебних карактеристика (NOS - not otherwise specified). Други аутори чешће користе термин „без посебног типа“ (NST - no special type) чиме се означавају тумори који се не могу класификовати а јасно се раздвајају од група тумора које су међународно прихваћене (3).

Класични IDC NST

Ова подгрупа IDC је најчешћа и обухвата око 40 до 75% свих инвазивних карцинома дојке у публикованим серијама (4).

Обухвата широк спектар морфолошких варијација и биолошког понашања попут величине тумора, градуса, односа тумора и строме и типа ивица. Ови тумори показују хетероген тип раста укључујући дифизне листове, гнезда, каблове или у виду појединачних ћелија дукталне диференцијације.

Подручја некрозе и калцификација су присутна у више од 60% ових карцинома.

Стромално ткиво може бити различито заступљено од потпуног одсуства до богате обилне строме (5).

Тубуларни карцином

Представља ретку групу добродиферентованих тумора са добром прогнозом и заступљеношћу од 2% у односу на све IDC у публикованим серијама. Најчешће се јавља код старијих пацијенткиња и нису праћени метастазама у регионалним лимфним чворовима.

Крибриформни карцином

Овај карцином је ретка форма карцинома дојке повезана са добром прогнозом. Карактеристична је за старије пацијенте у старосној доби од 53 до 58 година и њена учесталост је око 0,8% - 3,5% свих карцинома дојке.

Муцинозни карцином

Муцинозни карцином такође представља ретку форму карцинома дојке повезану са добром прогнозом и карактеристичну за жене старије од 60 година и најчешће се јавља у постменопаузи. Јављају се у 2% случајева у односу на све дијагностиковане инвазивне карциноме дојке. Поред термина муцинозни карцином често се називају и желатинозни, колоидни, мукусни и мукоидни карцином.

Медуларни карцином

Медуларни карциноми су ретка, посебна подгрупа добро диферентованих карцинома дојке и анапластичне морфологије, кога карактерише боља прогноза и исход у односу на IDC. Најчешће се јавља код жена старијих од 50 година и карактеристични су за носиоце BRCA1 мутације (6). У највећем броју студија, учесталост овог типа карцинома износи до 5% али је у студијама показана и инциденце од 7% (7).

Инвазивни папиларни карцином

Овај карцином је веома радак хистолошки тип карцинома дојке са прогнозом бољом у односу на класичну форму IDC. Најчешће се јавља код жена у постменопаузи и знатно је чешћи код жена у популацији белаца. Инциденца им је од 1% до 2% у групи дијагностикованих инвазивних карцинома дојке (5).

Према WHO класификацији тумора дојке, малигни интрадуктални папиларне лезије укључују три ентитета попут: интрадуктални папиларни карцином, инкапсулирани папиларни карцином и солидну форму папиларног карцинома (3).

Микропапиларни карцином

Микропапиларни карциноми дојке су као посебна подгрупа IDC и са другачијим биолошким понашањем препознати релативно скоро. Учесталост микропапиларног

инвазивног карцинома дојке је око 2% у групи инвазивних карцинома дојке иако је микропапиларна диференцијација присутна у готово 3% до 6% конвенционалних IDC.

Карактеристични су за исту животну доб као и класични IDC NST (5) уз знатно лошији клинички исход и преживљавање. поред тога ови тумори су праћени високом стопом локалних рецидива док се позитивни аксиларни лимфни чворови налазе у готово 70% случајева (8).

Апокрини карцином

Апокрини карциноми су ретка варијанта карцинома дојке и јављају се у 1% до 4% свих карцинома дојке. Карактерише их апокринна диференцијација не мање од 90% туморских ћелија. Апокрини карциноми припадају групи тумора високог грдауса са изузетно лошом прогнозом. Међутим, укупно преживљавање код ових тумора се значајно не разликује у односу на друге подтипове карцинома дојке високог градуса (9).

Неуроендокрини тумори

Неуроендокрини карциноми дојке су заступљени у око 2% свих карцинома дојке. Показују морфолошке и имунохистохемијске карактеристике сличне неуроендокриним туморима (*NET*) гастроинтестиналног тракта и плућа и више од 50% туморских ћелија показује имунохистохемијску позитивност на маркере неуроендокрне диференцијације. Конвенционални инвазивни карциноми и неке посебне варијанте показују фокалну неуроендокрину диференцијацију. Најчешће се јављају у постменопаузалних жена (10).

Метпластични карцином

Метпластични карцином дојке је агресивна форма инвазивног карцинома дојке у којој доминира метапластична компонента (сквамозна, вретансто ћелијска, и мезенхимална). Јављају се у мање од 1% свих инвазивних карцинома дојке, код жена у постменопаузи, просечне старости од 55 година и ретко метастазирају у аксиларне лимфне чворове. Групиши се у неколико епителних и мешовитих епително-мезенхималних субтипова у зависности од типа и количине метапластичног ткива унутар тумора.

Карциноми богати липидима

Веома ретка форма посебних карцинома дојке са ициденцом мањом од 1% до 1,6% у којима већина неопластичних ћелија (90%) има обилну цитоплазму богату неутралним липидима. Јавља се у старосној доби од 33 до 81 године. Данас, не постоје јасне назнаке да ова група тумора представља биолошки агресивну форму карцинома (10).

Секреторни или јувенилни карцином

Секреторни тумори су веома ретки тумори, ниског градуса и јављају се у 0,15% свих карцинома дојке. Јављају се у свимзрастима почев од дечијег доба, адолесцената до жена у старијем животном добу. Код старијих себа ови тумори имају агресиван ток и понашање за разлику од тумора који се јављају код деце и адолесцената и имају добру прогнозу (10).

Онкоцитични карцином

Представља веома ретку варијанту карцинома дојке са неколико објављених случајева у доступној литератури јер је у неким случајевима погрешно дијагностикован као апокрини карцином. Средња вредност животне доби у којој се јавља износи 66 године. Онкоцитичне ћелије сачињавају више од 70% туморског ткива што је услов за дијагнозу онкоцитичног карцинома (10).

Аденоидноцистични карцином

Веома ретка варијанта карцинома дојке, ниског градуса повезана за добро прогнозом. Јавља се у 0,1% свих карцинома дојке у животној доби од 25 до 80 година али се чешће срећу код жена у постменопаузи (7). Могу да метастазирају у аксиларне лимфне чворове. Удаљене метастазе су забележене у 10% свих случајева и најчешће настају у плућима (11).

Карцином ацинарних ћелија

Веома ретка форма карцинома дојке која се јавља код жена старости од 35 до 80 година (средња вредност 56 година).

1.1.4. Клиничко-патолошки прогностички параметри

Хистолошки градус

Хистолошки градус карцинома дојке означава хистолошку диференцијацију тј степен сличности са нормалним ткивом. Сразмеран је степену ткивне и ћелијске атипичности.

Код хистолошког градуса I, тумор граде тубуларне формације, без израженог ћелијског и једарног полиморфизма, са једном митозом на једном пољу великог микроскопског увеличања. Хистолошки градус II подразумева интермедијарни архитектурни налаз и интермедијски полиморфизам, са највише две митозе. Хистолошки градус III чине туморске плаже, острва и низови малигних ћелија, са израженом ћелијском и једарном атипичношћу, а број митоза је већи од 3.

Највећи напредак у хистолошком градирању је направио *Nottingham–Bloom–Richardson* систем (12,13) као модификација *Scarff-Bloom-Richards-ovog* modela, (14, 15) обједињујући хистолошки, нуклеарни и митотски градус. Ова класификација је присутна и данас у Консензусу патолога Америке и препорукама *WHO* (16).

Нуклеарни градус

Уочивши да изглед једра у малигној ћелији не прати увек степен диференцијације, уведен је опис једара као критеријум за хистолошку диференцијацију. Временом се показало да изглед једра даје бољу клиничку корелацију и има већу прогностичку вредност, због чега се дефинишу параметри за нуклеарно градирање:

Нуклеарни градус I	- Једра су униформна, правилног облика, једарце неприметно, митозе ретке
Нуклеарни градус II	- Интермедијарна микроскопска слика једара
Нуклеарни градус III	- Једра су неправилног облика и величине, једарце наглашено, хроматин кондензован, митозе бројне.

Митостски индекс

Сразмеран је пролиферативној активности тумора тј. брзини туморског раста (17). Поред прогностичког, има велики и дијагностички значај у микроскопској анализи филодних и глатко-мишићних тумора дојке.

Vaak (18) јасно хистоморфолошки дефинише ћелију у митози кроз одсуство једарне мембране, екстензију нуклеарног материјала ка периферији све до формирања деобног вретена и поделе нуклеарног материјала на два дела.

Други корак праве *Elston* и *Ellis* (12) повећавајући број анализираних микроскопских поља на 10.

Митотски индекс	Број митоза	Број поља увеличања
I	>5	10
II	5-9	10
III	<10	10

Класично одређивање митотског индекса бројањем митоза потиснуто је савременим методама прецизног одређивања пролиферативне активности, тј фракције раста тумора (којој припадају све ћелије тумора које се не налазе у *Go* и *G1* фази ћелијског циклуса) и имунухистохемијском применом имунохистохемијских антитела у одређивању пролиферативног индекса карцинома дојке (*Ki-67*, *MIB1*).

Инвазија лимфних и крвних судова и перинеурална инвазија

Инвазија лимфних и крвних судова представљају важне прогностичке параметре, указујући индиректно на степен туморске агресивности. Перинеурална инвазија нема мањи значај од лимфне инвазије; у омотачу нерава, перинеуријуму, налазе се лимфни судови које инвадирају малигне ћелије.

Стромална-моноклеарна реакција

Стромална моноклеарна реакција представља одраз антитуморског имунског одговора и означава интензитет запаљенске моноклеарне леукоцитне инфилтрације у строми тумора и око њега.

Стадијум туморске болести

Стадијум туморске болести означава фазу развоја тумора и његовог ширења. Постоје 2 главна система за одређивање стадијума туморске болести; један је представљен од стране *UICC* (кроз *TNM* класификацију) и други од *AJCC* (19). Оба се заснивају на одређивању категорија које ће указати на степен локалне, регионалне и системске екстензије болести у тренутку примарног третмана, а то су: макроскопске особине тумора (величина, локализација), захваћеност регионалних лимфних нодуса и процена постојања метастатске болести. Одређени стадијум туморске болести представља строги индикатор прогнозе (20).

Нодални статус

Нодални статус, као индикатор присуства метастаза у регионалним лимфним чворовима, независан је прогностички параметар и представља *N* категорију у *TNM* класификацији. Основни критеријум за процену статуса је 6 или више нодуса пронађених у оперативном материјалу.

Имунохистохемијски прогностички и предиктивни фактори

Рецептор за естроген је вероватно најјачи индивидуални предиктивни фактор пронађен код карцинома дојке. Око 60% оболелих жена млађих од 50, а чак 80% старијих од 50 година, поседује *ER+* тумор, што има значајну терапијску импликацију (21). Веома је важан у процесу карциногенезе, због чега инхибиција *ER*, циљном ендокрином терапијом, коришћењем слабих естрогених агониста (селективни модулатори *ER*) или индиректном блокадом конверзије андрогена у естроген (инхибитори ароматазе), представља главни облик адјувантне и терапије метастаског карцинома дојке (22,23). *ER+* и/или *PR+* карциноми дојке имају знатно нижи морталитетни ризик у односу на *ER-* и/или *PR-*, и зависни су од других клиничко патолошких карактеристика (24).

Употреба антиестрогена, чије су мете *ER*, *in vitro* и *in vivo*, открила је широк спектар ефеката на нормално и туморско ткиво дојке: пролиферацију ћелија, преживљавање, диференцијацију и ангиогенезу. Међутим, за већину ових ефеката се мисли да су посредовани везивањем за *ER*, што доводи до активације рецептора као транскрипционог фактора који затим регулише експресију разних специфичних таргет гена. То су гени који

кодирају протеине укључене у *DNA* синтезу, контролу ћелијског циклуса (*Ciklin D1, c-myc*), преживљавање ћелије (*Bcl-2/BclXL*), гени који кодирају полипептидне фактора раста и њихове рецепторе (*EGF, IGF-1*, и њихове рецепторе), друге рецепторе (*PR*), протеазе (катепсин D, колагеназе, ангиогенетске факторе раста (*VEGF*) и многе друге протеине (25,26).

Биолошки и клинички ефекти прогестерона су посредовани преко **прогестерона**. Експресија *PR* је маркер добре прогнозе, корелирајући са добром диференцијацијом тумора. Утицај прогестерона на развој и прогресију карцинома дојке, и поред великих истраживачких напора, ипак остаје контроверзан. Нејасноће постоје због чињенице да је физиологија хумане дојке компликована и нема еквивалентног животињског модела, и друго, трансформисане ћелије су другачије регулисане него нормалне, при чему изоформе прогестерона и ПР имају различит утицај на ове ћелије.

Око 50% тумора је *ER+* и *PR+*, док је мање од 5% *ER-* и *PR+*. Више клиничких студија је потврдило да је ниво експресије *PR*, у корелацији са бољим одговором на тамоксифен и дужим генералним преживљавањем (27). Користећи имунохистохемијски дуални метод са *PR β* и *PR α* антителима, нађено је повећање нивоа *PR* у пролиферативним болестима без атипиче, повезано са одржавањем компарабилних нивоа *PR β* и *PR α* . Значајна преодминантност једне изоформе је примећена тек код дукталних инвазивних карцинома. У половини испитаних случајева, *PR α* је доминирао у односу на *PR β* (28).

Ови подаци су важни, јер су *PR* изоформе функционално различите и различито инхибирају *ER*-посредовану транскрипцију при чему *PR α* има јаче *ER*- транс репресорске особине него *PR β* (29). То значи да *PR α /PR β* статус тумора може утицати на исход ендокрине терапије која циља *ER*. Тамоксифен-третирани пацијенти са вишим *PR α /PR β* односима су имали значајно лошије преживљавање без болести него они са нижим односом, и он је био ефекат великог *PR α* , а не ниског *PR β* нивоа (30).

Her-2 је официјално име *HUGO Gene Nomenclature* комитета, за *v-erb-b2* (еритробластозис леукемија вирусни онкоген). У литератури се користи више назива за овај ген *NEU, NGL, TKR1, HER-2, c-erb B2, HER-2/neu*, при чему се најчешће употребљава термин *Her-2* (31).

Веома је важан за ћелијску диференцијацију, адхезију и мотилитет (32).

Прогностички значај овер експресије *Her-2* је први пут објављен 1987. године и ова рана истраживања су показала да је *Her-2* ген амплификован у 15-30% карцинома дојке (33, 34)

Новије студије *Ellis-a* (35) и *Schmidt-a* (36) ограничавају се на вредности од 18 и 20%. Прекомерна експресија је повезана са клиничким током и има предиктивни значај за различите системске терапије (37, 38). *Her-2+* карцином дојке је агресивна форма болести, коју карактерише већи ризик од релапса након иницијалне терапије (39-41). Данас, одређивање *Her-2* статуса представља стандардну процедуру у дијагностици карцинома дојке, како при постављању дијагнозе тако и при релапсу (41,42). Адјувантна терапија трастузумаб-ом (*Herceptin*®) за око 50% редукује ризик од релапса, и данас представља стандард за све пацијенткиње са раним и узнапредовалим, *Her2+* карциномом дојке (43, 44).

p53 је антионкоген или тумор супресорски ген, који кодира синтезу протеина са есенцијалном улогом у негативној регулацији преласка ћелијског циклуса из *G1* у *S* фазу. Мутације *p53* гена стимулишу раст ћелија и учествују у прогресији тумора због губитка супресорне активности *p53 wild* типа и због кооперације са активираним онкогенима. *Wild* тип *p53* се везује за *DNK* и тако инхибира пролиферацију ћелија, док мутирани протеин мења своју конфигурацију а његов афинитет везивања за *DNK* је знатно смањен. *p53* протеин има врло кратак полуживот и због тога се нормално не нагомилава у ћелијама и не може се дијагностиковати *IHC* техникама. Насупрот овоме, мутације *p53* резултују у одговарајућем измењеном и нефункционалном нуклеарном протеину који је стабилан, са знатно продуженим полуживотом. Овај се протеин нагомилава у туморским ћелијама и може се доказати *IHC* методама. Иницијалне студије, користећи *IHC*, покушале су да расветле улогу мутираног *p53* гена у прогнози карцинома дојке преко детекције акумулираног *p53* протеина. У мета анализи више од 9000 оболелих, прогностички и предиктивни значај се слабо испољио (45). Међутим, користећи метод секвенционирања *DNK* и мета анализом 6000 пацијената из више од 25 студија, добијен је велики прогностички значај *p53* мутација (46). Ове и касније студије потврђују да *p53* мутације преносе краће укупно преживљавање и краћи период без болести, а њихов ефекат је завистан од других ризичних фактора. Нека истраживања показују да је *p53* мутација најнеповољнији прогностички индикатор релапса и укупног преживљавања. Да ли је прогностички значај свих типова мутација исти, још увек је предмет бројних дебата. *Borresen* (47) сматра, да пацијенти са мутацијама у цинк-везујућим доменима *L2* и *L3*, имају лошију прогнозу од пацијената са другим типовима мутација. Касније, више аутора

потврђује став, да пацијенти са мутацијама које оштућују *DNK* или цинк-везивање, испољавају агресивнији фенотип са краћим преживљавањем. Прогноза болести је лошија и када су мутације присутне у конзервираним регионима 2 и 5, у односу на неконзервиране регионе (48). Новији радови, углавном су усмерени ка детерминисању улоге различитих мутација у прогнози карцинома дојке и предикцији одговара специфичних типова ађувантних терапија. Нађено ја да ађувантне системске терапије, посебно тамохифен, имају мали значај за пацијенте са *p53* мутираним туморима (48). Такође примена неoadјувантних протокола са дохорубицин-ом, 5- флуороурацил-ом и митомуцин-ом, код локално одмаклих карцинома дојке, са специфичним мутацијама прекидања цинк-везујућих домена, корелира са примарном резистенцијом на ове лекове (49,50). Нешто бољи одговор се добија применом *FEC* протокола (*флуороурацил, епирубицин, cyclophosphamide*), али не и применом *пацлитакел-а* (51) Све ове студије указују на клинички значај *p53* анализе примарних тумора, што може помоћи у предвиђању одговора на специфични вид терапије.

1.5. Некроза

Пре неколико деценија, откривање нових образаца ћелијске смрти довело је до појаве концепта апоптозе. Апоптоза је сматрана процесом који је уређен јасним морфолошким и биохемијским догађајима док је некроза посматрана као неуређен (или случајан) облик ћелијске смрти. Морфолошки, некроза је сасвим другачији од апоптозе. Током апоптозе ћелија се скупља, једра кондензују да би се ћелија на крају распала и формирала апоптотична тела. За разлику од апоптозе ћелије прво бубре, плазма мембрана колабира и ћелије брзо лизирају. Биохемијске одлике апоптозе, као што је активација специфичних протеаза (каспазе) и фрагментација *DNK* обично се не срећу код некрозе. Међутим, побољшање метода диференцијације апоптозе и некрозе открила да има много примера када се могу наћи неке биохемијске и морфолошке карактеристике оба начина ћелијске смрти у истој ћелији. Ово указује да постоји широк спектар програма самоубилачке смрти у ћелијама док су некроза и апоптоза крајности тог спектра (52). Поред тога, током последње деценије некротично ћелијска смрт привлачи много више пажње и сада је многи истраживачи посматрају као један од видова програмиране ћелијске смрти заједно са апоптозо и аутофагијом (52-55). Најчешћи тестови за мерење некрозе ин витро су процена

пермеабилности ћелијске плазма мембрани специјалним бојењењем (трипан плаво) и пропушрање цитосолних ензима (лактат дехидрогеназа, креатин киназе). Процена некрозе је могућа и мерењем митохондријалне активности ћелија која није специфична за некрозу веж се среће и код апоптозе и аутофагије.

Важно је поменути да *in vitro* апоптоза као и аутофагија условљава пермеабилizацију плазма мембране ("секундарна некроза") што није детектовано *in vivo* током апоптозе јер апоптотичне ћелије фагоцитују макрофаги и околне ћелије пре него што је интегритет њихове плазма мембране нарушен.

Осим тога, секундарна некроза може да настане услед поремећаја митотске активности као последица неповратног оштећења *DNA*. Убијање ћелија у екстремним условима попут ниске и високе температуре као и киселинама узрокује нерегулисане процесе разарања ћелијских мембрана и цитосола. На основу овога се претпостављало да је смрт ћелије, које је праћено брзим нарушавањем плазма мембране, структура цитоплазме и једра, пасиван и нерегулисан процес. Међутим, такав закључак је занемарио многе појаве и сазнања у којима је некротична ћелијска смрт регулисан процес, активиран специфичним физиолошким и патолошким стањима. Нека стања која активирају некрозу може активирати смрт ћелије апоптозом и аутофагијом у зависности од интензитета стимулуса и врсте ћелија. Међу најчешћим условима активације некрозе су исхемија и хипоксија, које могу да се симулирају *in vitro* лишавањем кисеоника, глукозе и других хранљивих материја. Хипоксија и исхемија се јављају у току туморског раста услед неадекватне васкуларне подпоре. Главни узрок некрозе под овим условима је недостатак енергије и да би преживеле неопходно је да повећају или смање потрошњу енергије. Будући да у одсуству кисеоника и хранљивих материја ћелије имају ограничене могућности за повећање *ATP-a* једини начин да се избегне некроза је да ћелије смање потрошњу *ATP-a*. (56). Надаље, *LKB1*, серин-треонин киназа која је често мутирана у туморима је важан фактор за активност *AMP-om* активираних киназа и преживљавање ћелија тумора услед одсуства глукозе (57). Недавно је описан још један модел адаптације како се спречила некроза словљена хипоксијом. *Ginouves* и аутори су показали да се стање акутне хипоксије (1% O₂) стабилизује помоћу хипоксијом индукованих фактора (*HIF1α* □ *HIF2α*), кључних за протекцију од некрозе индуковане хипоксијом. У стањима хроничне хипоксије (која траје више од 3 дана) ови фактори су деградирани (58). Поједине

компоненте имуног система су способне да индукују некрозу активацијом *TNF*, *FAS* и *TRAIL* рецептора. Активација *FAS* рецептора применом анти-*FAS* лиганда изазива некрозу заједно са апоптозом док активација *CD47* рецептора у лимфоидним ћелијама индукује само некрозу (59). Различити видови терапије у малигним обољењима могу да изазову некрозу у туморским ћелијама. У ове лекове спадају *DNA* алкализујући лекови попут *MNNG* (60), арсениктриоксид (61), фотодинамска терапија (62) и тамоксифен (63, 64). *Resveratrol* (65) и неке компоненте традиционалне Кинеске медицине попут хонокиола (66) и шиконина (67) имају потенцијал да изазову смрт туморских ћелија некрозом. Најважније, отпорност ћелија на апоптозу не спречава убијање туморских ћелија овим супстанцијама. Сходно томе, инхибитори каспазе нису спречили некрозу *BCR-ABL* позитивних хуманих ћелија леукемије које су третиране инхибитором протеин киназе, иматинибом (*Gleevec*). Занимљиво је да актиномицин *D*, *UV* зрачење и цисплатина изазивају апоптозу у младим хуманим фибробластима док у зрелим изазивају некрозу што је очигледно повезано са немогућношћу стабилизације *p53* тумор супресор гена (68). Постоји неколико кључних догађаја током иницијације и прогресије карцинома и сузбијање апоптозе спада међу најважније (69). Много онкогени могу да активирају програм апоптозе док ћелије царцинома инактивирају тумор супресоре који су укључени у апоптозу попут *p53* или Вах протеин или експримирају инхибитоте апоптозе попут *Bcl-2* и *Bcl-x* протеина. Током раста тумора ин vivo, туморске ћелије бивају изложене хипоксији и сходно томе нападнуте цитотоксинима из имуноског система тако да превенција апоптозе штити туморске ћелије о дове неповољне средине и промовише туморогенезу. Налази тих студија имају клинички значај јер су показале да ћелије које су отпорне на апоптозу могу бити респонсбилне на терапију лековима који изазивају смрт туморских ћелија некрозом. *Dinnen* и сарадници су показали да *p53* С терминални 22-aa пептид везан за 17-aa пептиде из *Drosophila antennapedia-e* може индуковати селективну некрозу у *p53* мутираним туморским ћелијама простате (70). Друге студије су показале да аутофагија има важну улогу у заштити туморских ћелија у исхемичним стањима. Показано је да ћелије отпорне на апоптозу умиру некрозом само ако је онемогућен процес аутофагије (71). Хистошке анализе су показале да је некроза појава која укључује велику популацију ћелија за разлику од апоптозе којом су захваћене појединачне ћелије. Овај тип ћелијске деструкције је условљен комбинацијом узрока: токсичношћу неких фактора које ослобађају

некротичне ћелије (нпр. *ROS*, *NOS*) и уништавају околне ћелије, супресијом фагоцитозе преко *ROS* и слабом мобилизацијом макрофага. За разлику од апоптозе у којој се садржај ћелија изолује а пре фагоцитозе, некротичне ћелије представљају моћне запаљенске и имунолошке стимулансе. Опсежне студије смрти туморских ћелија су током последње деценије извели неколико закључака о повезаности три главна начина смрти: апоптозе, некрозе и аутофагије. За неопластичне ћелије хематопоеетског порекла, апоптоза је преовлађујући облик ћелијске смрти ин витро и ин виво, што се подудара са високом апоптотичком осетљивошћу одговарајућих нормалних ћелија попут тимоцита, лимфоцити итд.

Зрачна и хемиотерапија у клинички релевантним дозама убијају туморске ћелије претежно апоптозом док се некроза јавља само у случајевима када је апоптоза блокирана нпр инхибиторима каспазе или прекомерном експресијом анти-апоптотичких протеина *Bcl-2* фамилије. За ову врсту карцинома, инхибитори *Bcl 2* протеина могу бити обећавајући начин за повећање осетљивости и ефикасности терапије.

Код карциноме дојке и простате апоптоза се ретко може наћи, ин виво, током развоја тумора или као последица хемиотерапије. У ин витро условима може бити изазвана уз примену високих доза (недостижних у клиници) радијације и лекова. Сходно томе, већина нормалних епителних ћелија су такође релативно отпорне на апоптозу. Шта више, не постоји зависност између осетљивости тумора на апоптозу и његовог одговора на терапију. Као пример, висока експресија *Bcl 2* протеина у неким солидним туморима, парадоксално, корелира са бољом прогнозом (72, 73) док није утврђена корелација између сензитивности тумора на терапију и експресије других про- и анти-апоптотичних чланова *BH3* породице. Истовремено, некроза у солидним туморима је детектована прилично често посебно након примене терапије или током раста тумора. Како конвенционалне дозе лекова и радијације у терапији карцинома не индукују директно некрозу сматра се да она настаје као последица поремећаја у пролиферативној активности туморских ћелија (смрт ћелија након ћелијске деобе са иререверзибилним оштећењима у *DNA*) Најчешћи узрок некрозе током развоја тумора је очигледно неадекватна снабдевеност кисеоником и хранљивим састојцима (метаболички стрес) туморских ћелија које показују брз раст. Студије су показале повезаност између апоптозе, аутофагије и некрозе током развоја тумора (74,75). Утврђено је да трансформисане епителне ћелије са супримираном

апоптозом могу преживети недостатак енергије ин витро и ин виво активирањем аутофагије и способношћу да на овај начин обезбеде есенцијалне хранљиве материје. Међутим, ако је аутофагија ћелија отпорних на апоптозу онемогућена, што се често дешава у туморима (нпр, активацијом *AKT-mTOR* сигнални пут), ове ћелије умиру некрозом (76). Према томе, аутофагија има важну улогу у превенцији некрозе током туморског раста. Парадоксално, упркос високом нивоу некрозе, ћелије карцинома са поремећајем апоптозе су биолошки агресивнији и показују бржи раст. Један од разлога за то је то што аутофагија ублажава оштећење *DNA* и геномску нестабилност која настаје током метаболичког стреса ин витро и ин виво (77). Анеуплоидија је једна од најважнији карактеристика биолошки агресивних форми карцинома и убрзава прогресију тумора новим мутацијама које промовишу инвазивност и метастазирање. Још један од могућих разлога због кога је некроза повезана са прогресијом карцинома је хронично запаљење узроковано некрозом ћелија. Инфламаторне форме карцинома посебно дојке, представљају најагресивније туморе што сугерише да запаљенске ћелије које инфилтришу тумор у покушају да убију туморске ћелије ослобађају цитокине који потпомажу преживљавање туморских ћелија (78). У складу са овим *TNF*, *IL-6*, *TGF β* и неки други цитокини имају промотивну улогу у прогресији тумора (79). С друге стране, недавне студије из јасно показују да исход антиканцерогене хемотерапије и радиотерапије не зависи само од способности ових агенаса да директно убијају ћелије, већ и на њихову способност да стимулишу имунски одговор (80-82).

Регресија тумора после третмана са доксорубицином или γ -зрачењем зависи од *T* посредованог имунског одговора који је озбиљно угрожен у имунодефицијентних мишева. Утврђено је да ослобађање *HMGB1* из умирућих туморских ћелија и његова интеракција са *TLR4* рецептором на ћелијама које презентују антиген (*APC*) је важно за супресију анти-туморских *T* лимфоцита *in vivo* (83-85). Студије које су проучавале ослобађање *HMGB1* који је специфичан маркер за некрозу показале су да је овај модел смрти неопходан за регресију тумора (86). Тренутни подаци указују да некроза туморских ћелија може играти двоструку улогу: ако настаје након терапије рака, може представљати добар терапијски одговор услед елиминације ћелија и активације имуног одговора. С друге стране, некроза која се јавља током развоја тумора је одлика агресивније форме

тумора коју карактерише бржи раст тумора услед стимулаторне улоге инфламације на раст тумора и генома нестабилности туморских ћелија.

1.6. Ангиогенеза

Ангиогенеза је у физиолошким условима, углавном ограничена на зарастање рана и репродукцију. Поред тога, ангиогенеза је саставни део честих патолошких стања и болести попут малигнух болести, диабетеса, псоријазе и реуматоидног артритиса (87). Како би покренуо неоваскуларизацију, тумор мења свој фенотип како би био способан да иницира овај процес. Докази добијени из анмалних сридија показали су да тумори у различитим стадијума показују различите фенотипе а да се стицање проангиогеног фенотипа јавља у раним туморским стадијумима и да је брзина његовог настанка условљена прогресијом тумора (88, 89). Анализе на узрцима хуманог диспластичног ткива су показале ангиогени потенцијал у више од 30% узорака док је у око 3% фенотип одговарао по својим карактеристикама неизмењеном ткиву дојке (90-92). Интересантно је да нормално ткиво дојке у блиуини малигне промене индукује ангиогенезу у знатно већој мери него што је то случај у нормалном ткиву дојке што намеће закључак да се фенотип ћелија као и проангиогени потенцијал мења пре настанка малигне промене (93). Анализом *MVD* као параметра за процену ангиогенезе показано је да бенигне лезије са високом *MVD* показују повећан ризик за настанак карцинома дојке. Такође, показано је да квантификација ангиогенезе у *in situ* лезијама може да укаже на могућност њихове прогресије у инвазивни карцином (94, 95) да предвиди терапијски одговор на неке видове лечења карцинома (96-100), корелира са настанком микрометастаза у коштаном сржи (101) и преживљавањем (102, 103). Иако различити типови тумора користе различите генетске путеве да успоставе васкуларну мрежу, улога онкогена и тумор супресор гена је неоспорна у фенотипској су трансформацији и иницијацији ангиогенезе. На ово указују студије које су показале да *Ras*, *myc*, *raf*, *c-erbB-2*, *c-jun* и *src* трансформисане ћелије показују снажан проангиогени фенотип (104-107). Међутим новонастали крвни судови показују повећану пропустљивост, испрекидан и обрнут ток (108). Резултат овако насталих крвних судова је да и поред већег броја васкуларних структура, допремање кисеоника је у знатној мери сиромашније него што је то реч у нормалном ткиву. Ово

доводи до хипоксије и стреса у микросредини који имају снажне ефекте на биологију тумора и резистентности на терапију (109).

Хипоксија је патофизиолошка последица структурно и функционално поремећене микроциркулације (109) и представља једну од особина солидних тумора. Као одговор на хипоксију, тумори одговарају продукцијом и ослобађањем хипоксијом индукованог фактора (*HIF*) (110). *HIF* одговор је посредован транскрипционим фактором *HIF-1 α* и конститутивно експресијом *HIF-1 β* . Оверекспресија *HIF-1 α* је идентификована у многим туморима са улогом у брзини раста тумора и промоцији метастатског потенцијала ових карцинома. У карциномима дојке, заступљеност *HIF-1 α* позитивних ћелија се повећава са клиничким стадијумом и повезана је са лошом прогнозом (111-114). Поред *HIF-1 α* , идентификоване су и друге изоформе овог протеина попут *HIF-2 α* и *HIF-3 α* (115, 116). Улога ових изоформи је сложена и неки докази указују да они у каснијим фазама антагонизују експресију гена индукованих хипоксијом. Занимљиво је да *HIF-1 α* и *HIF-2 α* активирају различите сетове гена индукованих хипоксијом (117), укључујући оне који су укључени у гликолизе, преживљавање и пролиферацију ћелија (118). Клиничка релевантност за карцином дојке није позната јер постоје само ограничени подаци о улози *HIF* изоформи. У карциномима дојке познато је да се *HIF-2 α* експримира у туморским ћелијама (119) и тумор асоцираним макрофагима (*TAMs*) (120). *HIF-2 α* позитивни *TAM* су повезани са туморском васкуларизацијом сугеришући да хипоксисјом индуковане групе *TAM* и *HIF-2 α* позитивни *TAM* промовишу настанак проангиогеног туморског фенотипа (120). Према томе, одговор на хипоксију преко *HIF* протеина може бити један од важних механизма којим настаје васкуларно ремоделирање у ткиву карцинома.

Механизми неоваскуларизације

Иако је ангиогенеза важан механизам у неоваскуларизације тумора, неколико других механизма помоћу којих тумори успостављају снабдевање крвљу су такође идентификовани што укључује васкуларно ремоделирање, васкулогенезу, васкуларну мимикрију и гломерулоидну ангиогенезу. Сваки од ових механизма може имати значај у одређеном типу тумора или у одређеној фази еволуције тумора али је релативни значај сваког у хуманим туморима још увек непознат. Међутим, ангиогенеза и васкуларно

ремоделирање вероватно представљају главне механизме у васкуларизацији рака дојке са доказима да васкуларна мимикрија може додатно играти улогу у инфламаторном карциному дојке. Стицање ових биолошких сазнања ће имати све важнију улогу са напредком индивидуализованог начина лечења Поред *MVD* која се користи као сурогат за ангиогенезу, многи други параметри неоваскуларизације тумора су такође истражени укључујући факторе ангиогене експресије, адхезионе молекуле, сазревање и пролиферацију ендотелних ћелија (121). Сва ова мнерења укључујући и процену *MVD* су повезана са бројним проблемима (122) и адекватно не дају информације о протоку крви унутар тумора који је променљив услед шантовања, стазе и обрнутог протока унутар туморске васкулатуре (123).

Ангиогенеза је стварање нових крвних судова из постојеће васкулатуре. Састоји се од више координисаних, условљених и независних корака. Ангиогени програм захтева деградацију базалне мембране, миграцију ендотелних ћелија и инвазију екстрацелуларног матрикса, са пролиферацијом ендотелијалних ћелија и формирањем лумена капилара пре сазревање и стабилизације нове васкулатуре. Завршни кораци захтевају инхибицију даље пролиферације ендотелних ћелија, реконституцију базалне мембране, као и спајање и организацију ендотелних ћелија у нове луминалне просторе.

За разлику од животињских модела у којима се ендотелне ћелије деле 30 до 40 пута брже у крвним судовима тумора, без обзира на врсту тумора, брзину раста или величину, у поређењу са нормалним ткивом, пролиферација ендотелних ћелија у хуманим туморима је релативно ретка. Последица овог налаза је да **васкуларно ремоделирање** представља доминантан механизам у успостављању неоваскуларизације у карциному дојке (124- 126). То се може догодити кроз различите процесе, укључујући коптирање којим тумори преузимају постојећу васкулатуру. Овакав механизам је присутна у раној фази развоја тумора мозга, у којима се постојећи крвни судови користе у одсуству ангиогенетског одговора (127-128). Сигнални путеви који се активирају преко тие2-ангиопоетина и *VEGF*-а регулишу ове механизме васкуларизације тумора.

На тај начин, у неким случајевима тумори могу да перзистирају као „паразити“ обављајући све неопходне метаболичке процесе, иако немају довољно развијену фиброваскуларну строму. Интусусцепција колоне тумора такође може бити још један од механизма којим тумори могу да обезбеде васкуларну подршку. Овај процес је брз и

независан од пролиферације ћелија а зависи од уметања туморских ћелија у постојеће крвне судове делећи их у два или више лумена. (129, 130). Овај механизам представља један од видова ремоделирања и могући доминантан начин којим тумори обезбеђују подршку.

Васкулогенеза је де ново генерација крвних судова која настаје из прогенитора ендотелних ћелија као код ембриона. У животињским моделима је показано да се циркулишући прекурсори ендотелних ћелија унутар тумора диференцирају у ендотелне ћелије и побољшавају неоваскуларизацију тумора кроз комбинацију васкулогенезе и конвенционалну ангиогенезу (131-134). У зависности од врсте тумора и модела постоји разлика у заступљеност васкулогенезе као кључног механизма неоваскуларизације (до 90%). У ортотопским моделима чине <5% док у хуманим туморима удео васкулогенезе је имао просек од 4,9% (у распону од 1-12%) (135, 136). Постоје докази који указују да је овај процес васкуларизације тумора чешће и значајан у почетном развоју тумора услед инхибиције матичних ћелија или мобилизације ендотелних прекурсора (137).

Ипак, још увек се разматра могућа улога паракриног дејства ендотелних ћелија које настају из коштане сржи у функцији подршке туморској васкулогенези (138). Опречни резултати студија могу настати као последица замене прегиниторија ендотелних ћелија које потичу из коштане сржи са ендотелним ћелијама тумора (139). Регулација овог процеса је регулисана снажним ангиогеним фактором *VEGF* који мобилише прекурсорске ћелије из коштане сржи али постоје неки подаци који указују да задржавање ових матичних ћелија захтева додатне факторе као што је стромални изведени фактор 1 (*stromal-derived factor 1*) (140). Стромални изведени фактор 1 је такође хипоксијом индукован преко *HIF* протеина (141). Анализе ткива карцинома дојке су показале да се васкулогенеза јавља у инфламаторном карциному дојке (142).

Гломерулоидна тела која су карактеристична за глиобластому такође су уочена у инвазивним карциномима дојке (143). То су веома сложени васкуларни агрегати који подсећају на гломеруле бубрега и састоје се од мреже крвних судова који су различито постављени. Њихово присуство је повезан са значајно краћим преживљавањем у карциномима дојке и других локализација (144). Њихова формација је у вези са *VEGF*, не само зато што је битан за њихову индукцију већ и за одржавање ових (145). Исто је примећено у анималним моделима дојке код којих је учињена трансфекција са *VEGF*

(146). Овај тип неоваскуларизације тумора такође може представљати вид васкуларног ремоделирања уместо класичне ангиогенезе (147).

Васкуларни мимикрија је неоваскуларизација која је у великој мери заступљена у меланомима ока и тумора јајника (148), али је описана и у карциномима дојке (149). Делимично облагање капиларне површине туморским ћелијама је познато дуго година (150) и недавно је доказана у животињским модела коришћењем напредних техника (151), али је васкуларна мимикрија дефинисана као комплетна капиларна мрежа сачињена од туморских ћелија пре него од ендотелних ћелија крвних судова (152,153). Важно је препознати ову врсту неоваскуларизације због терапијског значаја, јер васкуларна мимикрија као доминантан механизам у туморима не може да одговори на конвенционалне антиангиогене лекове.

Којим год механизмом тумори обезбеђује васкуларну подршку увек су ангажовани слични регулаторни фактори (мада се неки у већој мери користе у поједином процесима). Присуство хуморалног медијатора туморске ангиогенезе је предложено пре више од 60 година, али то је тек 1968.године показано да тумор индуковани фактор може изазвати раст капилара. (154, 155). *Folkman* и сарадници (156) су описали први ангиогени фактор назван туморски ангиогени фактор након чега је откривен велики број других ангиогених промотера и инхибитора (157, 158). Многи показују плејотропно дејство и њихова улога у различитим хуманим карциномима и данас није сасвим разјашњена. Међутим, неколико важних ангиогених сигналних путева учествује у неоваскуларизацији хуманих тумора. Промотери и инхибитори ангиогенезе који леже у основи успостављања снабдевања тумора крвљу потичу из туморских ћелија и/или других елемената тумора. Туморске ћелије могу регрутовати инфламаторне ћелије као што су макрофаги и мастоцити, који су богати извори проангиогених фактора и цитокина или могу изазвати ослобађање фактора раста и њихових рецептора из екстрацелуларног матрикса путем деградације протеазе. Епителне и ендотелне ћелије тумора могу да активирају тромбоците, који су богат извор ангиогених фактора и често су повишени код малигнитета. Инвазивни и *in situ* карциноми дојке експримирају многе проангиогене факторе укључујући *VEGF*, *FGF 1*, *FGF 2*, *PDGF*, *TGF β 1*, тимидин фосфорилазу, пјејотропин и адренормедулин (159-161). Међутим, сваки од ових фактора се експримира у различитој фази туморског раста и прогресије. Тимидин фосфорилаза се експримира у *in situ* (162) и *T1* карциномима дојке

(163), док се *VEGF* експримира у свим туморским стадијумима. Вероватно, карциноми дојке вероватно показују различите ангиогенетске профиле што ће изискивати коришћење другачијег спектра антиангиогених агенаса.

Студије су показале да **VEGF** породица игра главну улогу у већини хуманих карцинома (164). Овој породици припадају *VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D* и *PDGF* и представљају полупептиде који се јављају у више изоформи и формирају хомодимере и хетеродимере. Везују се високим афинитетом за рецепторе тирозин киназе на ендотелним ћелијама и то *Flt-1* (*VEGF receptor [VEGFR]1*), *KDR* (*VEGFR2*) и *Flt-4* (*VEGFR3*), који су одговорни за иницирање унутарћелијске сигнализације. Активација рецептора резултира различитим ефектима тако да активација *VEGFR1* промовише диференцијацију и васкуларно одржавање, *VEGFR2* индукује пролиферацију ендотелних ћелија и васкуларну пропустљивост док активација *VEGFR3* стимулише лимфангиогенезу. Додатна регулација се обавља кроз изоформе специфичних рецептора неуропилина 1 и неуропилина 2. Неуропилини не везују само три класе који су укључени у раст аксона већ и неке изоформе *VEGF*-а тако да функционишу као корецептори промовишући везивање *VEGF*-а за *VEGFR2* (165). Даља модулација се обавља протеолитичким процесирањем и/или хепарином који није само неопходан за везивање *VEGF-a* и *FGF-a*. Овај комплексни сигнални пут омогућава *VEGF*-у да испољи велики број ефеката укључујући повећање васкуларне пропустљивости, пролиферацијеу и преживљавање ендотелних ћелија као и формирање лумена новонасталих крвних судова. Иако је експресија *VEGF-a* карактеристична углавном за ендотелне ћелије овај фактор експримирају и неке запаљске ћелије попут макрофага као и самих ћелија тумора. *VEGF-A* се експримира у ћелијама тумора плућа, мозга и гастроинтестиналног и урогениталног тракта као и у ин ситу лезија и инвазивном карциному дојке (166). У неким студијама експресија *VEGF-a* је повезана са *MVD* и прогнозом потенцирајући значај *VEGF-a* у хуманим малигним болестима. *VEGF* се ослобађа као одговор на хипоксију и његов промотер је један од гена који се активира као одговор на ниску концентрацију кисеоника и изазива трансформацију која је неопходна за даљу ангиогенезу (проангиогени фенотип). Међутим, улога од стране других чланова породице у хуманим болестима није још увек сасвим јасна јер тумори који нису у стању да експримирају *VEGF-A* могу другим члановима ове породице да индукују повећање васкуларизације у ткиву

VEGF-B, *VEGF-C* и *VEGF-D* се такође експримирају у карциномима дојке са значајном повезаношћу са метастазама у лимфним чворовима, прогнозом и лимфатичном густином у туморском ткиву (167-174). Ово може бити важно из два разлога. Сваки од ових фактора може помоћу тумору у снабдевању крвљу и омогућити трансформацију у проангиогени фенотип. Ово сугерише да ангиогена терапија мора бити усмерена на већи број мета из породице *VEGF*-а. Друго многи од ових проангиогених фактора имају синергистичко дејство са другим факторима (нпр, *VEGF A* и *FGF 2*), што је показано ин витро.

Иако постоје многе антиангиогене мете већина лекова је усмерена на блокаду сигналног пута који активира *VEGF* због његове круцијалне улоге у патолошкој ангиогенези и његовог утицаја на ендотелне ћелије. Терапијом се могу „гађати“ лиганди и рецептори (екстрацелуларни и интрацелуларни крајеви тирозин киназе) и на тај начин се инхибирају фактори који последично промовишу синтезу и ослобађање *VEGF-a*.

Ангиогенеза представља формирање нових крвних судова из постојеће микроваскуларне мреже и од есенцијалне је важности за многе физиолошке и патолошке процесе попут исхране туморског ткива и исхемичне прогресије карцинома. Овај сложени процес је укључен у ремоделирање екстрацелуларног матрикса и пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија (175). Васкуларизација је неопходна за туморски раст и метастазираје (176). Када допремање крви није адекватно у туморском ткиву, туморске ћелије умиру апоптозом/некрозом. Ендоглин (*CD105*) је помоћни протеин трансформишућег фактора бета и његова експресија је регулисана пролиферативном активношћу ендотелних ћелија. Из тог разлога, ендоглин представља адекватан маркер за проучавање туморске ангиогенезе и неоваскуларизације. Улога ендоглина као потенцијалног дијагностичког, прогностичког и терапијског маркера је проучавана у великом броју студија (177) Ендоглин је помоћни корецептор за *TGF-β* i плејотропни цитокин који регулише ћелијску пролиферацију, диференцијацију, миграцију и адхезивност (178-181). *TGF-β* сигнализација се обавља преко хетеродимерског, рецепторског серин/тирозин комплекса *TGF-β* рецептор тип 1 (*TGF-βR1*) и *TGF-βR2*. *TGF-β1* функционише као туморски супресор али и као индуктор инфламације и као такав промовише ослобађање ангиогених фактора из запаљенских ћелија *in vivo* (182). Ендоглин се везује за *TGF-β1* и *β3* који су структурно повезани са активним *TGF-βR2* (183,184). На овај начин се активирају цитоплазматске киназе *TGF-βR*, фосфорилација *TGF-βR1* и

последично смањење *SMAD* сигналних протеина (185). С обзиром на дистрибуцију у ткиву и познату функционалну повезаност са *TGF- β* , ендоглин обавља значајну улогу у процесу ангиогенезе. Описане су две изоформе ендоглина *L* и *S*, које се међусобно разликују у дужини унутарћелијског домена, дистрибуцији у ткиву и степену фосфорилације. *L*-ендоглин се састоји од 47 аминокиселина, показује висок степен фосфорилације и експримира се претежно у ендотелним ћелијама док се *S*-ендоглин састоји од само 14 аминокиселина. (186,187). Обе форме су фосфорилване јер су саставни део активног *TGF- β* рецептора типа 2 (*TGF- β 2*) (188,189) Солубилна форма ендоглина је такође идентификована у серуму пацијената са карциномом као и код здравих испитаника (190). Повишен ниво ендоглина је пронађен код пацијената са метстатским меланомом као и код пацијената са карциномом дојке код којих постоји повећан ризик за настанак удаљених метстаза (191, 192). Улога ендоглина у ангиогенези је расветљена студијом на *knockout* мишевима која је показала да недостатак овог гена узрокује смрт мишева услед васкуларних дефеката, посебно примитивног васкуларног плексуса у жуманчаној кеси (193). Утврђена је и повезаност између нивоа експресије ендоглина и маркера ћелијске пролиферације попут *cyclin-A* и *Ki-67* (194). Са друге стране, инхибиција ендоглина у *HUVEC* у *in vitro* условима инхибира ангиогенезу (195). У складу са чињеницом да хипоксија индукује ангиогенезу (196), потврђено је да је активност промотера за ендоглин, *mRNA* као и ниво самог протеина повећана услед присуства хипоксијом индукованог фактора типа 1 (*HIF-1*) (197). *In vivo* и *in vitro* студије су потврдиле да поред активности ендоглина, хипоксија појачава активност сигналног пута *ALK-1* (198). Јаче имунохистохемијско бојење применом анти-*CD105* моноклонских антитела је присутно у ендотелним ћелијама новонасталих крвних судова, као што је то случај у туморској неоваскуларизацији у поређењу са ендотелним ћелијама у неизмењеном ткиву (199-201). *CD31* моноклонско антитело показује имунореактивност истог степена у ендотелним ћелијама неизмењеног као и карциномом захваћеног ткива дебелог црева док је код примене анти-*CD105* моноклонских антитела имунореактивност знатно израженија у ткиву карцинома односу на неизмењено ткиво дебелог црева (202). На анималном моделу карцинома плућа индукованом *LLC1* туморском линијом показано је да мишеви који су суфицијентни са ендоглин показују спорији туморски раст и мањи степен ангиогенезе у односу на контролну групу мишева, чиме је у још једном моделу

потврђена значајна улога ендоглина у ангиогенези (177). Овај налаз је изазвао интересовање за студије које истражују улогу ендоглина у дијагностици, прогнози и терапији тумора. Интратуморска микроваскуларна густина, квантификована имунохистохемсијском методом има прогностички значај и повећана *MVD* у туморима корелира са краћим укупним преживљавањем (203-206). Иако већина студија потврђује овај став постоје студије које нису у складу са овом тврдњом (207). Највероватноје ове разлике настају као последица различитих метода бојења као и примене различитих панендотелних ћелијских маркера. Стандардизација начина бојења и квантификације би у значајној мери хомогенизовала резултате студија с тим што је примена адекватних ћелијских маркера главни предуслов (208). *Akagi* и сарадници су у својој студији показали постепено увећање *MVD*, мерену применом анти-ендоглина, од колоректалних дисплазија ниског до високог градуса као и од дисплазије високог градуса до карцинома дебелог црева (209). *MVD* квантификована анти-ендоглином је показала негативну корелацију са прогнозом болести код пацијената са астроцитомом и глиобластомом док пан-ендотелни маркер *CD31* није показао прогностички значај (210, 211). Слично овоме код пацијаната са неситноћелијским карциномом плућа, хепатоцелуларним и карциномом дојке постоји обрнута повезаност између *MVD* мерене ендоглином и укупног преживљавања, док примена *CD34* антитела није показала значајну разлику у преживљавању (212-215). Поред тога, *MVD* одређена анти-ендоглином је показала већу повезаност са *VEGF*-ом за разлику од *MVD* одређиване са анти-*CD34* mAb и анти-*CD31* (216, 217). Код пацијената са карциномом простате експресија *CD105* позитивно корелира са *Gleason* скором док постоји такође значајна позитивна корелација са стадијумом тумора код сквамозелуларних карцинома усне дупље (218, 219). Имунохистохемсијско бојење ендоглином се показало као сензитивније у обележавању капилара у карциномима грлића материце и као значајнији маркер у предикцији метастатски измењених лимфних чворова у односу на фактор VIII (220). Експресија ендоглина поред наведеног значајно корелира и са експресијом *Ki67* у глиобластомима (221) али не и код аденома хипофизе (222). Изузетно је важно напоменути да нису све студије потврдиле прогностички значај *MVD* одређиване применом анти-ендоглина. (223). Ипак, узимајући у обзир све досадашње студије на туморима различитих локализација може се рећи да је ендоглин значајно супериорни маркер за прогнозу малигних болести у односу на традиционалне маркере

ендотелних ћелија као што су *CD31*, *CD34* и фактор VIII. Посебно су интересантни резултати студија које су показала да пацијенти са метастатским карциномом дојке и дебелог црева показују значајно већу концентрацију серумског ендоглина него контролне групе (224-226). Поред тога, примена хемиотерапије редукује серумске вредности овог маркера (225). Узевши све заједно, може се закључити да серумска концентрација ендоглина може играти значајну улогу у дискриминацији пацијената са унапредовалим малигним болестима као и пацијената са повећаним ризиком за развој удаљених метастаза. Поред тога, може бити примењен у склопу редовног праћења пацијената након хемиотерапије (227).

1.2. IL-33

Главни циљ овог истраживања је да се испита улога и значај *IL-33/ST2* сигналног пута у процесима некрозе и ангиогенезе карцинома дојке. Зато у уводном делу се детаљно објашњава грађа и функција *ST2* молекула и *IL-33*, као и биолошки ефекти *IL-33/ST2* сигналног пута у онкогенези.

1.2. 1. Грађа

IL-33 је члан *IL-1* фамилије цитокина. Идентификован је 2005. године, када су *Schmitz* и сарадници анализирајући чланове *IL-1* фамилије цитокина открили лиганд за *ST2L*. Тада је показано да када се *ST2L* веже за рецепторски комплекс изазива се *Th2* имунски одговор, што је супротно осталим члановима ове фамилије (*IL-1* и *IL-18*) који поспешују *Th1* имунски одговор. Детаљније студије у вези са овим цитокином су указале на сличност *IL-33* и нуклеарног фактора венула са високим ендотелом (енгл. *Nuclear factor of high endothelial venules*, NF-HEV), који је пак повезан са регулацијом транскрипције истовремено функционишући као цитокин и као нуклеарни транскрипциони фактор. *IL-33* се конститутивно експримира у многим ткивима (плућа, мозак, кожа, кичмена мождина), при чему су његови главни извори фибробласти, ендотелне и епителне ћелије.

Овај цитокин је локализован у једру. Састоји се од *N* терминалног домена, који је одговоран за његову једарну локализацију и *C* терминалног домена који је сличан *IL-1* преко кога се овај цитокин везује за свој рецептор. *N* терминални домен *IL-33* садржи везујући мотив који гради *H2A-H2B* димер на нуклеозомалној површини и поспешује формирање хроматина.

Различита обрада *mRNA* у *ST2* гену генерише три изоформе *ST2* протеина:

- трансмембрански протеин (*ST2L*)
- секретовану-солубилну и
- варијанту форму (*ST2V*).

Студије које су проучавале улогу *ST2L* у имунском систему показале су да многе ћелије имунског система (макрофаги, мастоцити, Т лимфоцити) експримирају овај рецептор. *IL-33* се везује за *ST2L* који је члан суперфамилије *Toll like* рецептора. Овако повезани граде хетеродимерски комплекс на коме је експримиран *IL-1R* помоћни протеин. Преко

помоћног протеина тј. преко његовог *TIR* домена преноси се сигнал који активира *MyD88* и покреће транскрипцију нуклеарних фактора (*NF- κ B*, *IRAK-1/4*, *MAP* киназе), што као крајњу последицу има продукцију проинфламацијских медијатора. Поред тога, сигнализација путем *ST2L* промовише развој *Th2* лимфоцита и поларизацију имунског одговора у *Th2* правцу секрецијом *IL-4*, *IL-5* и *IL-13*. *sST2* се понаша као рецептор “мамац” са улогом да инактивира *IL-33*, док функција *ST2V* још увек је неразјашњена а сама изоформа рецепта је присутна најчешће у гастроинтестиналном тракту у људи.

1.2.2. Функција

Највећи број студија до данас је усмерен на проучавање улоге *IL-33* у карциномима са знатно мање сазнања о улози *ST2* рецептора. *IL-33* има двоструку улогу. Прва функција *IL-33* је класична улога цитокина коју остварује фомирањем комплекса *IL-33/ST2L*, док друга улога је улога транскрипционог фактора. Највећи број истраживања је фокусиран на улогу *IL-33/ST2* сигналног пута у хроничним обољењима. Обзиром на значај инфламације у развоју карцинома, новије студије проучавају улогу овог сигналног пута у карциногенези. Показано је да серумска концентрација *IL-33* је повећана у пацијената са малигним обољењима, као што су карцином желуца, плућа и хепатоцелуларни карцином. Такође, потврђене су повишене вредности *sST2* у серуму пацијената са метастатским карциномом дојке и хепатоцелуларним карциномом. Jovanović et al. су показали да активацијом *IL-33/ST2* сигналног пута се инхибира антитуморски имунски одговор, последично убрзавајући развој удаљених метастаза. Насупрот томе, Fang et al. су указали на значајну улогу овог сигналног пута у инвазивности и метастазирања туморских ћелија. Док, инхибиција *IL-33* у глиомима и карциному дебелог црева успорава туморски раст, миграцију и формирање колонија *in vitro*, а *in vivo* за резултата има мањи карцином.

У 19. веку Вирхов је први претпоставио да инфламација у туморима је повезана са неопластичним растом. Бројне студије су подупреле ову хипотезу, да хронична инфламација за крајњи резултат има карцином. *IL-33* је повезан са инфламацијом која се одиграва у карциномима.

IL-33 се може експримирати у нормалном епителу, али исто тако се може детектовати епителним ћелија добро диферентованог карцинома. Док, експресија овог цитокина је редукована у слабодиферентованим туморским ћелијама. *IL-33* је високо експримиран у

фибробластима стромалног ткива карцинома. Показано је да *IL-33* има важну улогу у иницијацији развоја карцинома. Овај цитокин има улогу у процесу фиброзе и хроничних инфламацијских обољења. Процес фиброзе карактерише прекомерни раст ожиљног ткива састављен од компоненти екстрацелуларног матрикса (колаген, хијаулонронска киселина, фибронектин, протеоглигани) на месту оштећења ткива. Фиброза која је узрокована хроничним запаљењем укључује различите стимулусе као што су инфекција, аутоимунски одговор, алергија и туморгенеза. Главни ћелијски играчи су фибробласти и миофибробласти који су првенстваено ћелије које продукују колаген. Показано је да се *IL-33* у фибробластима срца ослобађа услед биомеханичког оптерећења, док у фибробластима коже и синовији код хуманог реуматоидног артритиса и у мишићем моделу се ослобађа услед дејства проинфламацијских цитокина. У обољењима јетре, која као једну од последица има фиброзу, *IL-33* ослобађају стелатне ћелије. У ткиву изолованом од пацијената са инфламацијском болести црева *IL-33* доминатно експримирају миофибробласти. *Yanaba* и сарадници су показали да серумска концентрација *IL-33* је повећана у пацијената оболелих од системске склерозе и повезана је тешким обликом плућне фиброзе. Субкутана администрација *IL-33* изазива кутану фиброзу. Такође, овај цитокин промовише повреду плућа које су изазване блеомицином, као и фиброзу изазвану алтернативно активираним макрофагима.

Развојем тумора покреће се имунски одговор на туморе. Иmunски одговор тип 1 се карактерише *Th1* ћелијама које продукују *IFN- γ* , цитотоксичним *T* лимфоцитима, *NK* и *NKT* ћелијама и овај одговор представља кључну компоненту имунског одговора на туморе. Присуство компоненти имунског одговора тип 1 представља повољан прогностички знак. Познато је да *Th1* и *CD8+* *T* лимфоцити који инфилтришу тумор нису у стању да одговоре на локалне и системске механизме имунске супресије како у анималним моделима тако и у људи.

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

стромалним ћелијама карцинома велики број студија показује да IL-33 је редукован у многим епителним ћелијама.

IL-33 се експримира у нормалном ткиву дојке и његова експресија је редукована у DCIS дојке, што представља рани преинвазивни стадијум у настанку инвазивне форме овог карцинома. *Kretschmer* и сардници су потврдили да је експресија IL-33 редукована у карциному дојке. Присуство метастаза у лимфним чворовима карлице представља лош прогностички фактор у раном стадијуму пацијенткиња са карцином грлића материце. Овакви резултати су указивали да експресија IL-33 у туморским ћелијама N- пацијенткиња у поређењу са N+ мања, сугеришући да са експресијом IL-33 опада и прогресија малигне болести. У другој студији је детектовано значајно мање IL-33 у ендотелним и епителним ћелијама цервикса у тешким облицима цервикалне интраепителне дисплазије. Такође, потврђена је ниска експресија IL-33 у карциному дојке високог градуса у односу на карциноме ниског градуса. У *Her2+* мишијим туморима дојке експресија IL-33 је мања у поређењу на експресију у преканцерозним лезијама. Код пацијената са колоректалним карциномом код којих је присутна мутација на *p53* експресија IL-33 је значајно мања.

1.2.3. Улога и значај IL-33 и ST2 у имунском одговору

IL-33 може да модулира функцију свих ћелија које експримирају ST2 рецептор. Показано је да ST2 молекула се специфично експримира на T лимфоцитима и представља важан ефекторски молекул Th2 имунског одговора. Делујући на наивне T лимфоците, IL-33 подстиче диференцијацију Th2 лимфоцита, чак и у одсуству IL-4. Стимулација ефекторских Th2 лимфоцита, IL-33 подстиче продукцију IL-4, IL-5 и IL-13, као и хемотаксу Th2 лимфоцита.

Недавно је показано да NKT ћелије експримирају ST2 рецептор. Иако је очекивано да изазове поларизацију T лимфоцита у Th2 смеру. Третман IL-33 изазвао је продукцију Th1 и Th2 цитокина. IL-33 је снажан активатор мастоцита, базофила и еозинофила. Администрација IL-33 у мастоцитима изазива продукцију IL-5, IL-13, гранулоцитно-моноцитног фактора стимулације раста колоније (енгл. *GM-CSF*) и *TNF- α* . IL-33 такође, подстиче и сазревање, као и преживљавање ових ћелија у инфламираном ткиву. Базофилни гранулоцити након стимулације овим цитокином секретују друге цитокине (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, *GM-CSF*). Уз то, IL-33 функционише као хемоатрактант базофила.

Еозинофилни гранулоцити третирани *IL-33* појачано стварају *IL-8* и имају продужен животни век.

IL-33 активира ћелије које презентују антиген (енгл. *Antigen presenting cells*, APC). Примена *IL-33* појачава поларизацију алтернативно активираних макрофага и стимулише продукцију *CCL17* и *CCL24* хемокина. Група аутора је показала да *IL-33* подстиче развој дендритских ћелија. Ове ћелије добијене након стимулације *IL-33* су фенотипски функционално незреле са смањеним капацитетом наивних *T* лимфоцита, али са могућношћу поларизације имунског одговора у *Th2* смеру.

Обзиром да је *ST2* експримиран на готово свим ћелијама имунског система, као и у многим ткивима и органима, *IL-33/ST2* сигнални пут важну улогу у патогенези многих болести, тако што подстиче *Th2*, а истовремено супримира *Th1/Th17* имунски одговор.

1.3. МИШЈИ МОДЕЛ ТУМОРА ДОЈКЕ

1.3.1. Експериментални модел карцинома дојке изазван *4T1* ћелијском линијом

4T1 туморску линију су изоловали *Miller* и сарадници из спонтано насталог тумора дојке у *BALB/c* мишу (228, 229). Представља анимални модел који одговара IV стадијуму хуманог карцинома дојке. Инокулација туморским ћелијама је могућа директним убризгавањем (ињекцијом) у масно јастуче млечне жлезде, интравенски у репну вену, артеријски катетеризацијом десне каротиде или ињекцијом у леву преткомору срца. Убризгавањем у ткиво дојке туморске ћелије расту брзо, формирајући примарни тумор који се карактерише способношћу брзог метастатског ширења. Секундарни депозити у удаљеним органима настају у периоду од 3 до 6 и то превасходно у плућима, јетри, костима и мозгу (230-233). *4T1* индуковани тумори примарно али не и искључиво метастазирају хематогеним путем. Студије у којима су туморске ћелије детектоване у удаљеним као и у лимфним чворовима у близини примарног тумора су потврдиле да *4T1* линија метастазира лимфогеним путем (231, 234). Експериментални подаци прикупљени проучавањем *4T1* индукованих карцинома дојке показали су да се туморске ћелије знатно чешће налазе у крви (38/58 мишева) експерименталних животиња него у дренирајућим лимфним чворовима (12/58) (231).

Анализом животиња и органа у различитим временским пресецима утврђено је да *4T1* туморска линија прво метастазира у плућа (од 7 до 14 дана након инокулације, зависно од

броја инокулисаних ћелија) док се у јетри секундарни депозити појављују касније (од 21. до 28. дана након инокулације).

Метастатски тумори у мозгу се детектују након 35. дана од инокулације (235). Пут метастатског ширења започиње од примарног тумора, а након тога највероватније преко плућа и дренирајућих лимфних чворова до јетре и мозга (231, 235).

Метастазе које настају од *4T1* индукованог тумора дојке показују дистрибуцију сличну хуманом карциному дојке. Поред тога, употреба ове ћелијске линије је последњих година посебно добила на значају јер је једна од ретких коју карактерише способност спонтаног метастазирања у кости (236, 237). Интравенска апликација *4T1* туморске линије показује исту дистрибуцију метастаских промена уз значајно краће време за њихову детекцију. Овакав метастатски потенцијал као и брз раст примарног тумора чине *4T1* индуковани карцином дојке одличним моделом за проучавање раста и метастазирање тумора. Са друге стране, обзиром да је *4T1* модел синген са *BALB/c* мишевима овај модел се користи и за испитивање улоге имунског система у расту и метастазирању тумора (235).

Гени се различито експримирају у *4T1* ћелијама и категорисани су у зависности од ћелијске локализације и функције. Значајан број ових гена има улогу у ћелијској адхезивности, миграцији, ангиогенези, модификацији екстрацелуларног матрикса, функцији цитоскелета, пролиферацији ћелија, апоптози и преживљавању, ћелијском метаболизму, запаљењу и имунском одговору (235). Забележена је и експресија неких транскрипционих фактора и гена који учествују у модификацији хроматина. Појачана је експресија гена који кодирају међућелијске спојеве/везе (*Cldn3*, *Cldn4*, *Cldn7* и *Tjp2*), адхерине (*Cdh1* и *Vill1*), фокалне адхезије (*Itga3*, *Itga6* и *Lama5*) и спојне филаменте (*Krt1-18* и *Krt2-7*) што указује да *4T1* линија има више епителних карактеристика него не-метастатске линије тумора дојке. Повећана експресија матрикс-протеиназа (*Mmp3*, *Mmp9* и *Mmp13*), урокиназног активатора плазминогена (*Plau*) и секретованих инхибитора протеаза (*Serpina3g*, *Serpin2* и *Lcn2*) указује на појачану способност ремоделирања екстраћелијског матрикса (енгл. *ECM*). Од сигналних путева који су активирани у *4T1* ћелијској линији најизраженији је *Jak/Stat* сигнални пут на шта указује појачана експресија *Jak* и *Stat* молекула и смањена експресија *Socs1* (инхибитора *Jak/Stat* сигналног пута. *4T1* ћелијска линија карцинома дојке показује значајно смањење нивоа *CDK2*-асоцираног протеина 1, p53 протеина и инхибитора циклин зависне киназе *p21* (*Cdkn1a*) и

циклина *G* (*Ccng1*). Ове промене убрзавају почетну фазу ћелијског циклуса ($G1 \rightarrow S$) и инхибирају одговор ћелије на оштећење *DNK*. Супротно овоме, експресија *Gadd45* је повећана. *Gadd45* је регулисан хипоксијом и смањењем глукозе као и *p53*. Повећана експресија појединих гена је осетљива на хипоксију и/или смањење глукозе (*Pfkfb3*, *Vegfc*, *Flt1* и *Trib3*), што указује да повећана експресија *Gadd45* настаје услед ових фактора и да *4T1* ћелијска линија чак и под оптималним условима егуистира у стању стреса или псеудо-стреса (235).

ЦИЉ СТУДИЈЕ

Основни циљ планираног истраживања је испитивање улоге осовине IL-33/IL-33R у биологији туморске некрозе и неоангиогенезе тумора дојке.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

- У мишјем моделу тумора дојке, испитати ефекат делеције гена за IL-33R на:
 1. Величину поља некрозе
 2. Експресију IL33 и VEGF-а током раста тумора

- У хуманим туморима дојке, испитати:
 1. Експресију IL33, IL-33R и VEGF-а и микроваскуларну густину и њихову међусобну повезаност
 2. Експресију IL33, IL-33R и VEGF-а у односу на присуство некрозе у тумору
 3. Повезаност експресије IL33 и IL-33R у туморским и стромалним ћелијама
 4. Повезаност некрозе и експресије IL-33 и IL-33R са стандардним пато-хистолошким параметрима (величина тумора, хистолошки градус, инвазија лимфних и крвних судова, нодални статус, моноклеарна инфилтрација).

ОСНОВНЕ ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЧКОГ РАДА

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

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживање је спроведено у Центру за патологију, Клиничког центра Крагујевац и Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, у периоду од јуна 2012.године до августа 2015.године.

Експерименталне животиње које су коришћене у студији су добијале људску бригу и сви експерименти су одобрени и вођени у складу са водичем Етичког комитета за животиње, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Пајенти који су укључени у студију су потписали информисани пристанак и одобрили коришћење ткивних узорака у научноистраживачке сврхе. Истраживачки пројекат је одобрио Етички комитет, Клиничког центра Крагујевац, као непрофитну клиничку студију. Протокол је спроведен у складу са важећом регулативом Добре клиничке праксе (GCP, енгл. Good Clinicall Practice) и Хелсиншке декларације.

Лабораторијске животиње

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

Поступак добијања *knock out* мишева

Knock out мишеви поседују један или више нефункционалних гена. Представљају најбољи анимални модел за проучавање гена чија функционалност још увек није довољно разјашењена или је сасвим непозната. Методологија стварања *knock out* мишева се заснива на уношењу путем вектора страног, нефункционалног, хомолог гена у ембрионалне матичне ћелије са циљем хомологе рекомбинације и замене функционалног гена

нефункционалним. У току хомологе рекомбинације долази до замене гена између пара хомологих секвенци два молекула ДНК које имају сличне или идентичне нуклеотиде (238,239)

У даљем поступку бирају се само ћелије у којима се одиграла жељена рекомбинација. Вектор садржи и два додатна гена за контролу рекомбинације (240,241):

1. Нео ген, носилац резистенције на неомицин
2. ТК ген, ген за вирусну тимидин киназу

Вектор се убацује у културу ћелија гајених у медијуму који садржи неомицин, као и ганцикловир или FIAU (енгл. 1-(29-deoxy-29-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodo-uracil) који се под утицајем тимидин киназе метаболишу у токсични продукт. Нео ген се увек уграђује у геном ћелије, док се ТК ген исказује само када се не догоди хомолога рекомбинација. Ћелије резистентне на неомицин, а са активним ТК геном биће уништене помоћу ганцикловира или FIAU. Међутим, преживеће све ћелије у којима се одиграла хомолога рекомбинација јер ће бити резистентне и на неомицин и на ганцикловир или FIAU (240, 241).

BALB/c мишеви са циљаном делецијом гена за IL-33R

Хомозиготни IL-33R^{-/-} мишеви дизајнирани су у лабораторији проф.др Mekenzija (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, United Kingdom) векторским искључивањем T1/ST2 гена. Вектор је тако конструисан да унесе ген одговоран за резистентност на неомицин између дефинисаних места: XbaI на четвртом и BamHI на петом егзону T1/ST2 гена и на тај начин уклони већи део четвртог и петог егзона. Вектор има 5,1kb (кило-базних) парова који обезбеђују 5' хомологију и 2kb пара који обезбеђују 3' хомологију са ендогеним T1/ST2 геном. Хомологи крајеви направљени су PCR техником (енгл. Polymerase Chain Reaction), коришћемкем Pfu turbo полимеразе (Stratagene). Хомологни 5' крај инсертованог гена добијен је помоћу нуклеотида: 5'-AGT-GCATCTAGAGATACTGATGAGGCACC и 5'-CTTCTTTCTAGAT-TATTCAAGTTGGGGC-TATTTAAAAGAAGCC, а хомологни 3' крај помоћу нуклеотида: 5'-CCACCGGATCCT-TCACAGTTGAAGGTAAGCTCTTGGCTTCAACAAGGG и 5'-GGAAGGAAAAAAGC-GGCCGCGATCTCGCTCCACAGAGATGAGGAACGGCC. Вектор

је линеаризован и инсертован у E14.1 ембрионалне матичне ћелије (Alberts et al.2007). Од 1600 Г418-резистентних клонова потврђених Southern анализом помоћу пробе А, свега 5 је имало коректно инсертован ген. Проба А је направљена PCR техником, помоћу прајмера: 5'-TACGTAACCTCCCA-TGTGCAGTCCTTGCTGCC и 5'-GTACACATCACAGGCATGAGGG. Хибридизацијом са пробом за секвенцу резистентну на неомицин потврђена је величина инсертованог сегмента као и присуство само једне инсерције. Затим су, у циљу стварања химера, две од третираних ембрионалних матичних ћелија убризгане у 3,5 дана старе бластоците добијене из BALB/с мишева. Овако добијени мишеви укрштени су са BALB/с мишевима у генотип ембрионалних матичних ћелија је преношен на потомство. Хомозиготи за нефункционалан T1/ST2 ген добијени су у наредним генерацијама инцестим спаривањем хетерозигота.

У овако добијеним IL-33R^{-/-} мишевима није детектована разлика у броју ћелија крви у односу на IL-33R^{+/+} мишеве. Уз то, анализирани су и субпопулације лимфоцита у тимусу, слезини, лимфним чворовима, и показано је да нема разлике у укупном броју лимфоцита, као и у односу CD4⁺/CD8⁺ ћелија код IL-33R^{-/-} и IL-33R^{+/+} мишева (242).

Ћелијска линија мишијег тумора дојке 4T1

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

Ова линија је добијена из спонтаног насталог тумора дојке у BALB/с мишу (234, 243). Представља анимални модел за проучавање IV стадијума карцинома дојке. Ћелије се могу инокулисати директно у масно јастуче млечне жлезде (инјекцијом), интравенски у латералну репну вену, артеријски хируршком катетеризацијом десне каротидне артерије или инјекцијом у леву преткомору срца. Након убризгавања директно у ткиво дојке, 4T1 ћелије расту брзо, формирајући примарни тумор и дају хематогене метастазе у плућима, јетри, костима и мозгу у периоду од 3 до 6 недеља након инокулације (228, 231, 234, 236.)

Индукција примарног тумора дојке

Туморске ћелије 4T1 су култивисане у комплетном DMEM медијуму (Dulbecco's Modified Eagles Medium) који садржи: 4,5g/l глукозе, 10% феталног бовиног серума (FBS), 2mmol/l

L-глутамин, 1mmol/ml натријум пирувата, 10mmol/l HEPES-a, 100U/l пеницилина, 100mg/ml стрептомицина и 1mmol/l мешаних неесенцијалних аминокиселина (Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, MO, USA). Како је најлабилнија компонента комплетног медијума аминокиселина L-глутамин, која је потребна већини ћелија сисара и има полуживот од приближно 3 недеље, медијум који се користи дуже од 3 недеље, прављен је без глутамин, а глутамин чуван као замрзнут, концентрован шток, додаван је пре употребе медијума (0,1-0,6g/l).

Ћелије извађене из контејнера са течним азотом су брзо одмрзаване у воденом купатилу (37°C, не дуже од два минута). Додавањем 9ml комплетног медијума и центрифугирањем на 350G 10 минута, уклоњен је крио-протективни медијум. Крио протективни медијум јесте комплетан медијум за раст ћелија са додатком 5% DMSO. Након одливања супернатанта ћелије су ресуспендоване у 1ml комплетног медијума, шребачене у фласк за култивацију и инкубиране у атмосфери 5% CO₂, засићеној воденом паром на температури од 37°C. Пре употребе, комплетан медијум је инкубиран најмање 15 минута, да би се стабилизовала рН вредност. Ћелије су култивисане у посудама за културу ћелија – T₂₅ фласкови (BD Falcon) у стриктно асептичним условима. Просечно време дуплирања броја ћелија износи од 24 до 48^h.

Субконфлуентне ћелије, у логаритамској фази раста, подигнуте су из флашка краткотрајним третирањем трипсином (0,25% трипсин са хелатором 0,02% EDTA који су растворени у PBS-у (енгл. Phosphate Buffered Saline; PBS, PAA Laboratories GmbH)). Ћелије су затим опране у комплетном медијуму, да би FBS инактивисао трипсин и спречио оштећење ћелија. Ћелије су додатно пране у PBS-у, без FBS-a, пре употребе у сваком *in vivo* експерименту. Процент живих ћелија одређиван је виталним бојењем трипан плавим, а у експерименталном раду су коришћене само суспензије ћелија са вијабилношћу већом од 95%. Трипан плаво је боја која служи за разликовање мртвих и живих ћелија јер улази искључиво у ћелије са нарушеним интегритетом ћелијске мембране, док живе ћелије са очуваном ћелијском мембраном остају необојене (244).

Различити истраживачи, у експерименталном раду су користили различити број туморских ћелија 4T1 за индукцију болести, који се кретао од 1×10^3 до 1×10^6 (230). У свим

експериментима овог истраживања коришћемо је 5×10^4 туморских ћелија за индукцију тумора (245-247)

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

Жртвовање, одвајање ткивног материјала и верификација индукованог тумора.

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

Процена раста тумора у мишијем моделу тумора дојке

Раст примарног тумора је праћен свакодневно, регистрањем палпабилног тумора а његова величина је одређивана морфометријски, коришћењем нонијуса. Након жртвовања мишева и екстирпације тумора применом аналитичке ваге одређивана је маса тумора као и запремина тумора на основу формуле (245-247):

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

Фиксација ткива и бојење хематоксилином и еозином (Н&Е)

У рутинској обради препарата, узорци ткива су фиксирани у 10% неутралном, пуферисаном раствору формалина, у току 24 часа, на собној температури. Након моделирања, ткивни узорци су пласирани у одговарајуће касете које су монтиране у ткивни процесор (Leica TP 1020, Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Даље, узорци су у ткивном процесору дехидратисани потапањем кроз серију алкохола растуће концентрације, просветљавани у ксилолу и прожимани парафинским воском на следећи начин: два пута у 86%-тном етанолу у трајању од по 1,5^h; два пута у 96%-тном етанолу у трајању од по 1,5^h; три пута у апсолутном алкохолу у трајању од по 1,5^h; три пута у ксилолу у трајању од по 1,5^h и потопљени три пута у парафински восак чија је

температура од 58-60°C у трајању од по 1,5^h. Након процедуре у ткивном процесору у трајању од 16^h, ткивни узорци су разливани и калупљени 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 хематоскилин-еозин. Плочице са ткивним пресецима су загрејане у термостату на температури од 58°C у трајању од 60 минута. Рехидратација је постигнута потапањем ткивних пресека исечака у серију опадајућих концентрација алкохола 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, НЕММ-ОТ-1L, BioGnost S, Zagreb, Croatia). Потом су ткивни исечци испирани 1 минут у текућој води и најзад бојени алкохолним еозином у трајању од 3 минута (Eozin Y 1% vodeni, EOY-10-OT-1L, BioGnost, Zagreb, Croatia). Након бојења уследила је дехидратација исечака потапањем у серију растућих концентрација алкохола: најпре 1 минут у 86%-тном алкохолу, затим 10 минута у 96%-тном алкохолу и на крају 10 минута у апсолутном алкохолу. Након бојења и дехидратације уследио је поступак просветљавања када су исечци потопљени 10 минута у мешавину ксилола и алкохола у односу 1:1, а затим два пута по 10 минута само у ксилолу. На овако обојене ткивне пресеке на крају смо наносили Канада балзам (Canada balsam, Centrohem, Београд, Србија) и прекрили их покровним стаклима. Овако припремељени ткивни исечци су након 24-часовног сушења, анализирани светлосним микроскопом (x100, x200, x400).

Фотографисање ткивних пресека и аквизиција слика

Ткивни пресеци индукованих тумора дојке, бојени Н&Е методом, фотографисани су дигиталном камером (Axioscam ICc1, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany) појединачним фотографијама у маниру „црва“ применом микроскопског увећања 200x и AxioVision softver-a (AxioVision v.4.8.2.0, Carl Zeiss Microscopy GmbH, München, Germany). Сlike су снимљене у резолуцији од 1536x2048 пиксела и сачуване на хард

диск-у, у TIFF формату. 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.

Компјутерска квантификација некрозе у туморском ткиву

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

Испитивана популација

У студију су укључени ткивни узорци 40 пацијенткиња са инвазивним дукталним карциномом дојке које су оперативно лечене (мастектомија) у Клиници за хирургију

Клиничког центра Крагујевац, у периоду од 2003 до 2005 а којима је дијагноза верификована у Центру за патоанатомску дијагностику Клиничког центра Крагујевац. Класификација тумора је учињена према критеријумима UICC (енгл. The Union for International Cancer Control)- TNM, а градирање према класификацији WHO (engl. World Health Organization). У студију су укључене пацијенткиње са карциномима дојке, који су на основу величине класификовани у T2 и T3 стадијум. Сви карциноми дојке су затим подељени на две групе: са детектованом и без детектоване некрозе у туморском ткиву.

Након фиксације и рутинске обраде оперативног ткивног материјала, микроскопском анализом Н&Е обојених препарата постављана је патохистолошка дијагноза, као и стандардна имунохистохемијска анализа.

Поред дијагнозе, микроскопски преглед је укључивао одређивање стандардних и нестандардних параметара тј особина тумора. Хистопатолошки извештај садржи податке о патолошком стадијуму болести (pTNM) базиран на величини тумора и присуству метастаза у регионалним лимфним нодусима, хистолошком типу и степену диференцијације тумора, нуклеарном градусу и митотском индексу, присуству стромалне моноклеарне реакције, екстензивне некрозе у тумору, дезмоплазије и перидукталне еластозе, постојању лимфне, васкуларне и перинеуралне инвазије, конфигурацији туморског руба, стању ресекционих маргина, одсуству или присуству других патолошких лезија и преканцерозних стања у тумору.

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

Искључујући критеријуми за одабир испитаница су старост изнад 65 година, жене којима је дијагностикована или су раније лечене од малигне болести, други хистолшки типови карцинома дојке, пацијенткиње са интермедијарним c-erbB-2 потврђеним након ретестирањња имунохистохемијском методом.

Имунохистохемијски метод бојења ткивних исечака калупљених у парафин

Ткиво је 24 часа фиксирано у 10%-тном неутралном, пуферизованом формалину и калупљено у парафин. Резови дебљине 4-5 μm , су монтирани на посебне високо адхерентне плочице SuperFrost® и сушени на температури од 56°C у току 1 сата. За детекцију ER и PR рецептора примењена су моноклонска хумана антитела (DAKO, Denmark) и високо сензитивна, специфична стрептавидин-биотин имунохистохемијска метода (LSAB+ / HRP, DAKO, Denmark), у којој је стрептавидин обележен пероксидазом, а као хромоген је коришћен 3,3-диаминобензидин. У току бојења, истовремено су тестирани и познати негативни и позитивни ткивни узорци, а један ткивни пресек из испитиваног парафинског калупа, тестиран је реагенсом који је замењивао примарно антиестрогенско и антипрогестеронско антитело.

Процедура је подразумевала поступке демаскирања антигена, блокирања ендogene пероксидазе, инкубирања препарата са примарним антисерумом и поступак извођења ИНС методе LSAB+/HRP. Након депарафинизације и рехидрације ткивних пресека вршено је демаскирање антигена одговарајућим поступцима. Формалдехид у току фиксације, као и парафин у току калупљења, изазивају конфигурацијске промене протеина у ткиву формирањем интермолекуларних веза. Дуготрајна формалинска фиксација може да маскира антигене и умањи ефекат специфичног бојења. Стога се поступком демаскирања антигена постиже обнављање примарне конфигурације антигена, уклањањем нежељених интермолекуларних веза. Демаскирање антигена вршило се високом температуром у микроталасној пећници Molipex Compact, у 0,1M цитратном пуферу, рН 6,0, на 800W, у трајању од 21 минут. Након демаскирања антигена је уследило блокирање ендogene пероксидазе, 3% воденим раствором H_2O_2 у трајању од 10 минута, а затим је наносено примарно антитело, са инкубацијом од 1^h на собној температури, у влажној комори.

DAKO LSAB+ kit, у коме је стрептавидин обележен пероксидазом (HRP) или алкалном фосфатазом (AP), базира се на обележеној стрептавидин биотин (SAB) методи, али користи високо рафинирану авидин-биотин комплексну тростепену технику, у којој биотинизирано секундарно антитело реагује са неколико стрептавидинских молекула коњугованих пероксидазом. Ради се о екстремно осетљивој и прилагодљивој ИНС методи, која је у поређењу са ABC методом сензитивнија чак 8 пута. С обзиром да се у киту налази

појачан систем стварања сигнала за детекцију антигена присутних у ниским концентрацијама, тј. систем који омогућава повећање интензитета бојења као компензацију за низак титар примарног антитела, оптимално разблажење примарног антитела је до 20 пута веће него у класичној пероксидаза-антипероксидаза (PAP) техници, тј. неколико пута веће него у класичној ABC или SAB техници.

Поступак извођења LSAB+/HRP састоји се у инкубирању, прво са биотинизираним везујућим антителом, а затим са стрептавидином обележеним пероксидазом. Поступак се завршава инкубацијом пресека у мешавини супстрат-хромогена (H_2O_2 и 3-amino-9-ethyl-karbazol у N,N,-диметилформаиду; AEC+ Substrate-Chromogen kit, Cat. No. K3469, DAKO-Denmark), 5 минута на собној температури.

Као општи растварач антисерума и средство за испирање између различитих корака у току имунохистохемијске процедуре бојења коришћен је 0,1M фосфатни пуфер рН 7,4. На крају исечци су бојени Мауег-овим хематоксилином.

Имунохистохемијски метод бојења смрзнутих ткивних исечака

Препарати са замрзнутим исечцима ткива, обележени писачем за стакло, преносили су се брзо, да се не би отопили, у расхлађени ацетон (чува се заједно са препаратима у замрзивачу на $-20^{\circ}C$), где су остављани по 2 минута ради фиксирања. Препарати су опрани 3 пута по 5 минута у *PBS*-у (*Phosphate-Buffered Saline-PBS*, рН-7.2). Блокирање ендогене пероксидазе је извршено десетоминутним потапањем у 0.3% раствор хидрогена у *PBS*-у, а затим су поново испрани 3 пута по 2 минута у *PBS*-у. Примарна антитела су након растварања у *PBS*-у наносена на исечке. Плочнице су инкубирани у влажној комори 1^h , на собној температури. Препарати су затим опрани 3 пута по 2 минута у *PBS*-у и на њих су нанесена, предходно растворена у *PBS* -у, секундарна антитела. Поново је вршена инкубација у влажној комори 30 минута на собној температури, а затим је следило испирање, 3 пута по 2 минута у *PBS* -у. *Streptavidin-Horseradish Peroxidase*, предходно припремљен у одговарајућој концентрацији у *PBS* -у, је у оквиру следећег корака наносена на плочице, након чега је поновљена инкубација у влажној комори од 30 минута на собној температури и, затим су плочице опране 3 пута по 2 минута у *PBS* -у. Завршно, након nanoшења припремљеног раствора *DAB* супстрата (*diaminobenzidine tetrachloride/*

chromogen substrate) у одговарајућој концентрацији на исечке, плочице су инкубиране 5 минута у влажној комори на собној температури, или колико је било потребно да се добије жељени интензитет боје (ако је реакција успешна, боја се запажа већ после десатак секунди). Препарати су испрани 3 пута по 2 минута у дестилованој води и на исечке је наносен раствор Mayer-овог хематоксилина (контрастно или помоћно бојење). Следило је поновно испирање водом са чесме, потапање у кисели алкохол 5 минута и испирање дестилованом водом. На крају, у киветама растућих концентрација алкохола (95%, 100%) препарати су дехидрирани и испирани три пута у ксилолу. Околина ткива на плочицама је осушена папирном ватом, након чега је стављано по кап канада-балзама и исечци су прекривани покровним стаклом.

Контрола квалитета и специфичности имунохистохемијског бојења

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

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

Позитивне контроле за дата антитета	
Estrogene receptor α	Карцином дојке
Progesterone receptor	Карцином дојке
HER2	Карцином дојке
p53 Protein	Карцином дојке
VEGF	Карцином дојке
CD105	Плацента
IL33	Кожа
IL-33R	Кожа

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

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

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

Очитавање имунохистохемијске експресије IL-33, IL-33R, p53 и VEGF-a у мишијем и хуманом ткиву тумора дојке

Имунохистохемијска експресија p53, VEGF, IL-33 и IL-33R је одређивана семиквантитативно од стране два истраживача. Експресија p53 и VEGF-a је квантификована само у подручју инвазивног карцинома. Позитивност на p53 протеин је очитавана и анализирана на основу Alred скорa тј збир појединачних скорова за проценат и интензитет бојења туморских ћелија са једарном експресијом овог протеин. Експресија VEGF-a је процењивана на основу критеријума за скоровање који су предложили Rydén и сардници (248) за интерпретацију овог белега у инвазивном карциному дојке. Очитавано је искључиво цитоплазматско бојење туморских ћелија и имунохистохемијски скор је одређиван на основу процента туморских ћелија које су биле позитивне на VEGF. Скала за оцењивање експресије се кретала у опсегу од 0 до 5: 0=одсуство имунохистохемијске реакције; 1= \leq 1% позитивних ћелија; 2=1–10% позитивних ћелија; 3=10–50% позитивних ћелија; 4=50-90% позитивних ћелија и 5 \geq 90% позитивних ћелија. Имунохистохемијска експресија IL-33 и IL-33R је независно квантификована у туморским и стромалним ћелијама и приказивана као проценат позитивних ћелија у односу на укупан број еваулираних ћелија. У зависности од израчунате „cut off“ вредности за процентуалну заступљеност стромалних ћелија позитивних на IL-33 и IL-33R у односу на некрозу, сви тумори су подељени на две групе и анализирани као карциноми са ниском и високом експресијом. Процент имунохистохемијске експресије је одређиван бројањем ћелија у 5 различитих микроскопских поља на увећању x400.

Евауалација микроваскуларне густине (MVD) у карциномима хуманог порекла

Микроваскуларна густина (MVD) је процењивана имунохистохемијском методом, применом анти-CD105 антитета и употребом светлосног микроскопа (Axioskop 40, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany). Појединачне ендотелне ћелије или кластери позитивни на CD105 детектовани су као крвни судови. Присуство крвних ћелија или фибрина без детектованих ендотелних ћелија нису анализирани као микроваскуларни елементи као ни крвни судови са мишићним зидом. Све плочице су првобитно анализирани на микроскопским увећањима 40x и 100x. На овај начин су одређивана три „жаришта“ (енг. „hot spots“) тј. поља са највећом микроваскуларном концентрацијом, а затим су ова поља фотографисана на 200x увећању применом дигиталне камере (AxioCam ICc1, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany). Независно, два истраживача су применом софтвера (AxioVision v.4.8.2.0, Carl Zeiss Microscopy GmbH, München, Germany) спровела анализу генерисаних фотографија и утврдили број микроваскуларних структура у претходно одабрана три „жаришта“. MVD (микроваскуларне структуре/HPF) је израчунавана према критеријумима које су поставили Weidner и сарадници (249) тј као средња вредност појединачних MVD у три одабрана микроскопска фокуса.

Прогностички индекси у хуманом карциному дојке

Nottingham-ov прогностички индекс

Публикован је 1982.године (250) а допуњен 10 година касније (250) након чега је у већини установа ушао у праксу као рутински одређиван прогностички фактор. Израчунава се преко формуле:

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

Код хистолошког градуса, добра диференцијација тумора добија 1 бод, средња 2 и слаба 3 бода. Нодални статус се такође класификује у три групе; прва група је без метастаза у лимфним чворовима (1 бод), 2 добијају ако је захваћено од 1-3 нодуса, а 3 ако су метастатски депозити присутни у више од 4 лимфна нодуса. Добијене вредности се распоређују у три прогностичке групе; добру (скор мањи од 3,4) интермедијерну (3,4-5,4) и лошу (скор већи од 5,4). Што је NPI већи, утолико је прогноза лошија (251).

Имунохистохемијски прогностички индекс

У новије време, као резултат имунохистохемијске детекције и мерења експресије, различити онкогени, сами или у комбинацији са другим факторима, користе се за формирање ИИП (252). Формира се на следећи начин: сваком p53 или HER-2 позитивном тумору се додељује 1 бод, а негативним туморима приписује се 0. Тумори са експресијом естрогених и прогестеронских рецептора добијају 0 бодова, а без ове експресије 1. На тај начин тумори могу добити од 0-4 поена, и према њиховом броју сврставају се у 3 прогностичке групе: прва група је са добром прогнозом (0-1 бод), друга са интермедијерном (2) и трећа група са лошом прогнозом (3-4).

Снага студије и величина узорка

Снага студије за истраживање на мишевима је израчунавана на основу студије Јовановића и сарадника (246) где је као примарна зависна исходишна варијабла узета експресија CD31, а као примарни независни узрочни фактор – апликација рекомбинатног IL-33. Експресија CD31 је приказана као број ендотелних ћелија у примарном тумору (нумеричка континуирана варијабла) тако да је претпостављена статистички значајна корелација ова два параметра слабе до умерене јачине, ради добијања што већег узорка. Средња вредност броја ендотелних ћелија позитивних на CD31 у групи која је третирана рекомбинантним IL-33 била је $30,80 \pm 30\%$, а код групе која није третирана IL-33 $10,57 \pm 30\%$. За израчунавање величине узорка користили смо двострани независни t тест, жељену снагу студије $1-\beta=0,99$ (99%), вероватноћу грешке I типа (α) 0,05 и претпоставку да ће обе групе садржати подједнак број експерименталних животиња. На основу задатих параметара израчунали смо да је неопходно да укупан узорак садржи 14 експерименталних животиња, односно по 7 у свакој групи ($n_1 = n_2 = 6,0491 \approx 7$).

Прорачун величине узорка је заснован на претпоставци да постоји повезаност између некрозе и експресије IL-33 у туморском ткиву. Као примарна, зависна исходишна варијабла је узета експресија IL-33, а као примарни независни, узрочни фактор – присуство некрозе у туморском ткиву. Вредности експресије се изражавају у процентима (нумеричка континуирана варијабла) тако да је, на основу досадашњих студија, претпостављена статистички значајна корелација ова два параметра слабе до умерене јачине, ради добијања што већег узорка (што је мања корелација, потребан је већи узорак).

Величина узорка ће бити израчуната на основу разлике у експресији IL-33 у туморским ћелијама у зависности од хистолошког градуса инвазивног дукталног карцинома дојке, приказаној у студији Liu и сарадника (253), где је средња вредност процентуалне експресије туморског IL-33 у групи карцинома са хистолошким градусом I и II била $87,33 \pm 18,70$, а код градуса III била је $58,64 \pm 41,96$. За израчунавање величине узорка узето је да ће се користити двострани независни t-тест, да је жељена снага студије $1-\beta=0,80$ (80%), вероватноћа грешке I типа (α) 0,027 и да обе групе имају подједнак број испитаница. Применом комерцијалног програма G*Power v.3.0.10 утврдили смо да је за за дате критеријуме неопходан узорак од 42 испитанице, односно 21 болесница по групи ($n_1 = n_2 = 20,62275 \approx 21$).

Статистичка обрада података

Статистичка обрада резултата извршена је помоћу комерцијалног програмског пакета SPSS (SPSS v.20.0, SPSS Inc., Chicago, IL). У анализи добијених резултата најпре је коришћена дескриптивна статистика за опис општих карактеристика узорка: апсолутни бројеви и пропорције (фреквенције, проценти), мере централне тенденције (аритметичке средине) и мере варијабилитета (стандардна девијација). Нормалност расподеле евалуирана је тестом Kolmogorov-Smirnov. За поређење средњих вредности променљиве двеју популација коришћен је независни t тест и Mann-Whitney-јев тест. За поређење средњих вредности променљиве више популација коришћена је анализа варијанси (ANOVA) и Kruskal-Wallis-ов тест. Испитивање зависности две описне променљиве реализовано је помоћу χ^2 теста и Fisher-овог теста. Зависности две нумеричке променљиве испитивана је помоћу Pearson-овог и Spearman-овог коефицијента корелације. Испитивање утицаја више променљивих на бинарну променљиву урађено је помоћу мултиваријантне бинарне логистичке регресије. Могућност да нека променљива буде маркер испитивана је помоћу криве оперативне карактеристике примаоца (енгл. *Receiver operating characteristic curve, ROC curve*), при чему су, за погодно утврђен cut-off, одређивани сензитивност и специфичност. Одређивањем сензитивности и специфичности теста за поједине онкогене дат је ниво поузданости ових анализа. Процена функције преживљавања је утврђена методом Kaplan-Meier-а, а Log-rank тест је коришћен за поређење скала. Статистичке анализе су урађене са интервалом поверења од 95%. За статистички значајну разлику у

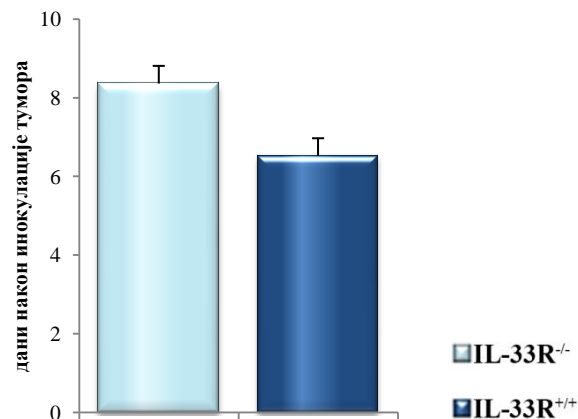
добијеним вредностима сматра се када је $p < 0,05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0,01$.

РЕЗУЛТАТИ

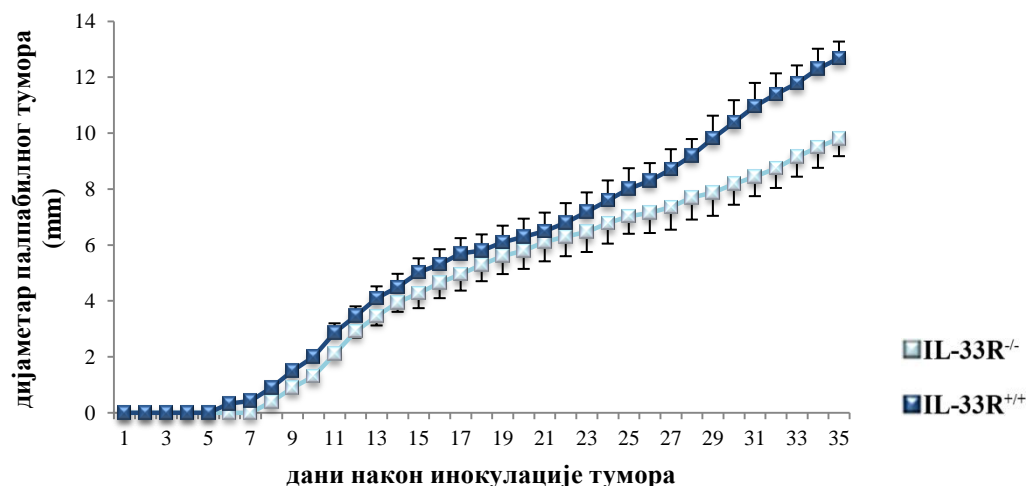
Делетија гена за IL-33R успорава раст примарног 4T1 тумора и повећава поље туморске некрозе

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

Код IL-33R^{-/-} мишева палпабилни тумор се појављује касније, тако да је средња вредност времена протеклог од инокулације туморских ћелија до појаве палпабилног тумора значајно већа код IL-33R^{-/-} него код IL-33R^{+/+} мишева (Графикон 1).



Графикон 1. Одсуство гена за IL-33R успорава појаву палпабилног тумора. IL-33R^{-/-} (n=24) и IL-33R^{+/+} (n=24) мишевима су тумори индуковани апликацијом ћелијске линије 4T1 BALB/c мишијег карцинома дојке. Малигне ћелије 4T1 (5×10^4) су ресуспендоване у 50 μ l PBS-а и директно убризгане у масно јастуче 4. млечне жлезде мишице. Појава тумора је утврђивана свакодневном палпацијом код сваког миша појединачно. Време потребно да се код IL-33R^{-/-} мишева појави палпабилни тумор је продужено у односу на мишеве који експримирају IL-33R (6,5 \pm 0,6 vs. 8,4 \pm 0,4 дана; p<0,05). Резултат је приказан као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је одређивана Students' T тестом.



Графикон 2. Делетија гена за IL-33R успорава раст примарног тумора код мишева. Након појаве палпабилног тумора, пречник тумора је одређиван свакодневним мерењем нонијусом код IL33^{-/-} (n=24) и IL33^{+/+} (n=24) мишева. Просечна вредност пречника тумора код IL-33R^{+/+} мишева је током мерења била већа али је статистички значајна разлика утврђена 36. дана након инокулације ($9,81 \pm 0,63$ vs. $12,68 \pm 0,59$; $p < 0,05$). Резултат је приказан као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је одређивана Students' T тестом.

Мерењем различитих параметара величине тумора (пречник, запремина и маса) и применом Mann Whitney-јевог теста утврдили смо да постој статистички значајна разлика у величини тумора између IL-33R^{-/-} и IL-33R^{+/+} мишева, који су жртвовани 36-ог дана. Пречник тумора након екстирпације, је већи у IL-33R^{+/+} мишева ($16,45 \pm 1,34$) у односу на IL-33R^{-/-} ($11,77 \pm 1,78$) ($p=0,0001$) (Графикон 3А). Показана је и статистички значајна разлика између пречника тумора у групи IL-33R^{+/+} мишева који су жртвовани 29-ог ($9,88 \pm 1,22$) и 36-ог дана ($16,45 \pm 1,34$) ($p=0,0002$) (Графикон 3А). У групи IL-33R^{-/-} мишева нисмо забележили ову разлику ($p > 0,05$) (Графикон 3А).

Запремина тумора након екстирпације, 36. дана експеримента, је већа у IL-33R^{+/+} мишева ($571,05 \pm 112,11$) у односу на IL-33R^{-/-} ($278,30 \pm 91,41$) ($p=0,0002$) (Графикон 3Б).

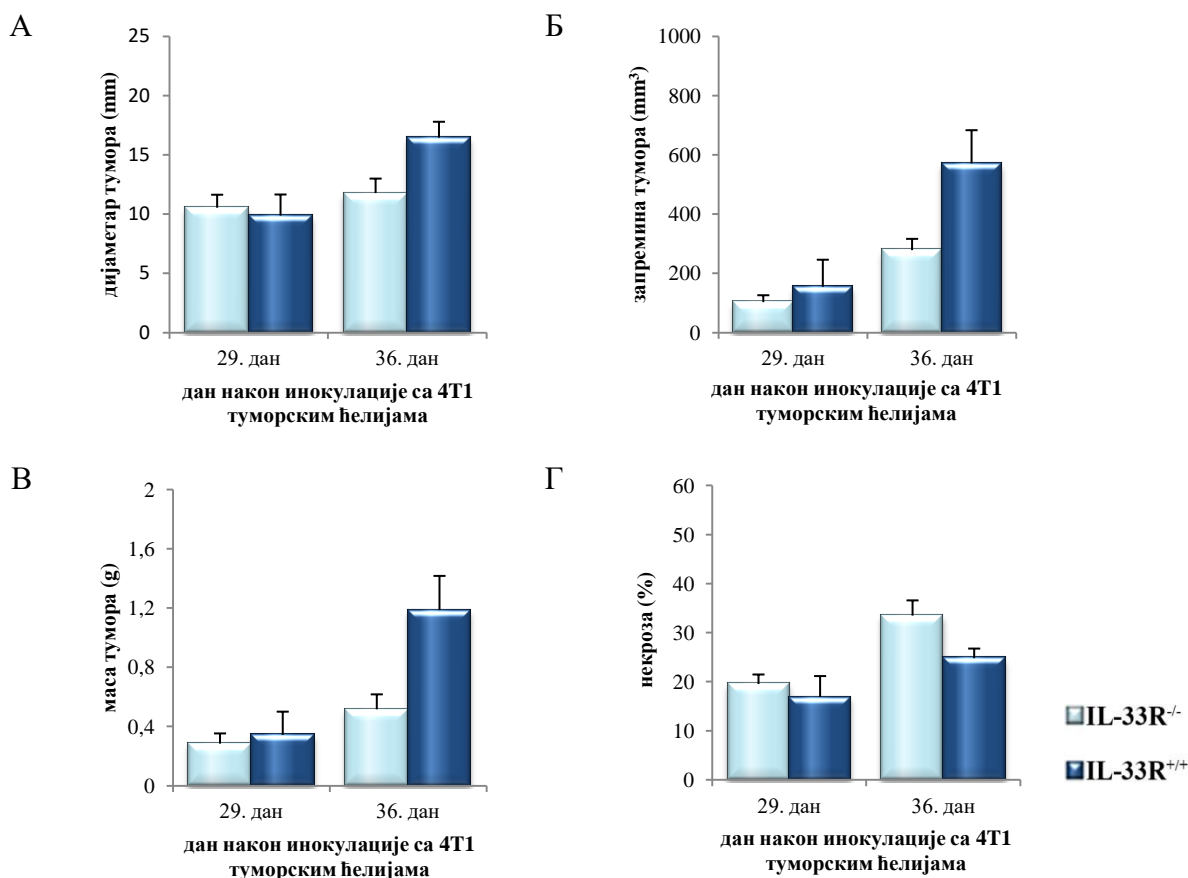
Забележен је статистички значајан пораст у запремини примарног тумора у групи IL-33R^{+/+} мишева од 29. до 36. дана експеримента ($154,56 \pm 38,13$ vs. $571,05 \pm 112,11$; $p=0,0006$), али не и у групи IL-33R^{-/-} мишева ($p > 0,05$) (Графикон 3Б).

Маса тумора након екстирпације, је већа у IL-33R^{+/+} мишева (1,19 ± 0,23) у односу на IL-33R^{-/-} (0,52 ± 0,16) (p=0,0006) (Графикон 3В).

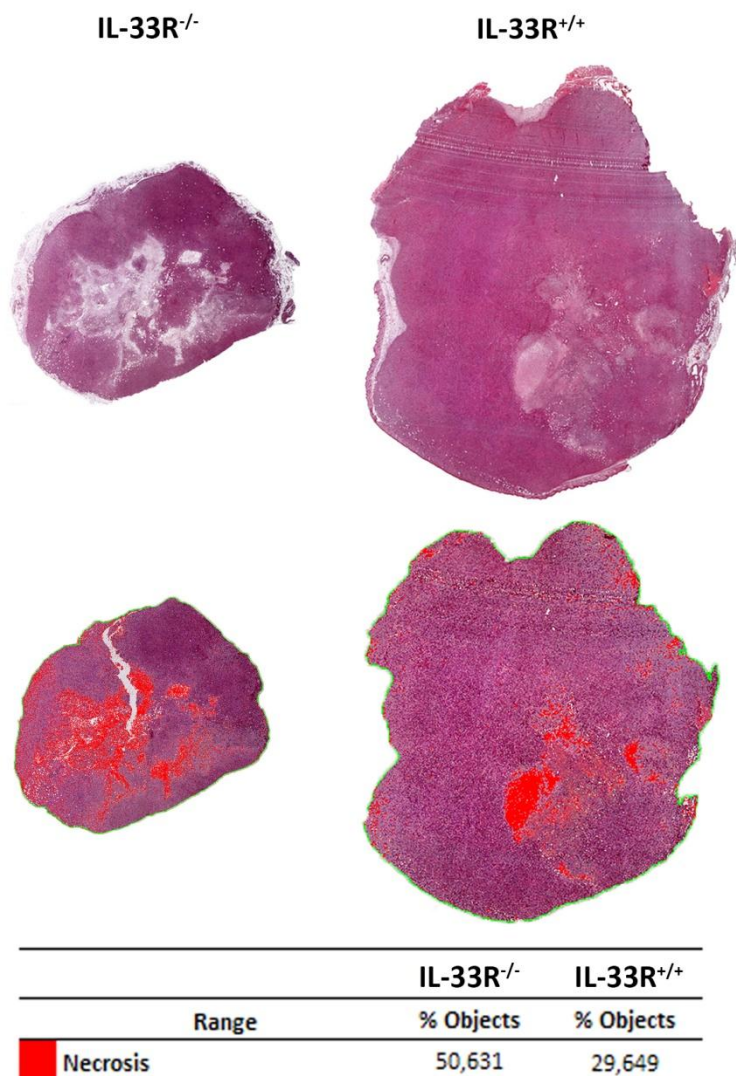
Забележен је статистички значајан пораст у маси примарног тумора у групи IL-33R^{+/+} мишева од 29. до 36. дана експеримента (0,34 ± 0,10 vs. 1,19 ± 0,23; p=0,0003), али не и у групи IL-33R^{-/-} мишева (p>0,05) (Графикон 3Б)

Применом Mann Whitney-јевог теста утврдили смо да постоји статистички значајна разлика у средњој вредности процентуалне заступљености некрозе између IL-33R^{-/-} (33,49 ± 1,96) и IL-33R^{+/+} мишева (24,81 ± 3,1) (p=0,027), жртвованих 36-ог дана (Графикон 3Г). Такође, утврдили смо статистички значајну разлику у некрозу у групи IL-33R^{-/-} између мишева који су жртвовани 29-ог (19,54 ± 4,26) и 36-ог (33,49 ± 1,96) дана (p=0,010) (Графикон 3Г). Иста статистички значајна разлика је примећена и у групи IL-33R^{+/+} мишева који су жртвовани 29-ог (16,91 ± 1,95) и 36-ог дана (24,81 ± 3,1) (p=0,040) (Графикон 3Г). Међутим, разлика између средњих вредности у процентуалној заступљености некрозе у туморском ткиву је била знатно већа у групи IL-33R^{-/-} (13,95%) у односу на групу IL-33R^{+/+} мишева (7,9%) (Графикон 3Г).

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



Графикон 3. Делеција гена за IL-33R успорава раст примарног тумора и појачава некрозу у 4T1 индукованом тумору дојке. IL-33^{-/-} (n=24) и IL-33R^{+/+} (n=24) мишеви су жртвовани 29-ог и 36-ог дана након инокуације. **А.** Након екстирпације тумора, нонијусом је мерен највећи пречник тумора. Средња вредност пречника тумора је била значајно већа код IL-33R^{+/+} мишева 36-ог дана (p=0,0001). Ова разлика није утврђена након жртвовања мишева 29-ог дана (p>0,050). Код IL-33R^{+/+} мишева забележена је и статистички значајна разлика у пречнику тумора између мишева који су жртвовани 29-ог и 36-ог дана (p=0,0002) супротно групи IL-33R^{-/-} мишева (p>0,05). **Б.** Запремина тумора је одређивана применом формуле $L \times W^2/2$, где L представља највећи а W најмањи пречник тумора. Средња вредност запремине тумора је била значајно већа код IL-33R^{+/+} мишева 36-ог дана (p=0,0002). Ова разлика није утврђена након жртвовања мишева 29-ог дана (p>0,05). Код IL-33R^{+/+} мишева забележена је и статистички значајна разлика у запремини тумора између мишева који су жртвовани 29-ог и 36-ог дана (p=0,0006) супротно групи IL-33R^{-/-} мишева (p>0,05). **В.** Маса тумора је одређивана применом аналитичке ваге. У складу са другим параметрима величине тумора, просечна маса тумора је била значајно већа код IL-33R^{+/+} мишева 36-ог дана (p=0,0006). Ова разлика није утврђена након жртвовања мишева 29-ог дана (p>0,05). Код IL-33R^{+/+} мишева забележена је и статистички значајна разлика у маси тумора између мишева који су жртвовани 29-ог и 36-ог дана (p=0,0003), што није регистровано у групи IL-33R^{-/-} мишева (p>0,05). **Г.** Средња вредност процентуалне захваћености туморског ткива некрозом је била значајно већа код IL-33R^{-/-} мишева 36-ог дана (p=0,027). Ова разлика није утврђена након жртвовања мишева 29-ог дана (p>0,05). Такође, у обе групе мишева забележена је и статистички значајна разлика у туморској некрози између мишева који су жртвовани 29-ог и 36-ог дана (IL-33R^{-/-} p=0,010; IL-33R^{+/+} p=0,040). Резултат је приказан као аритметичка средина ± SEM. Статистичка значајност је одређивана Students' T тестом.



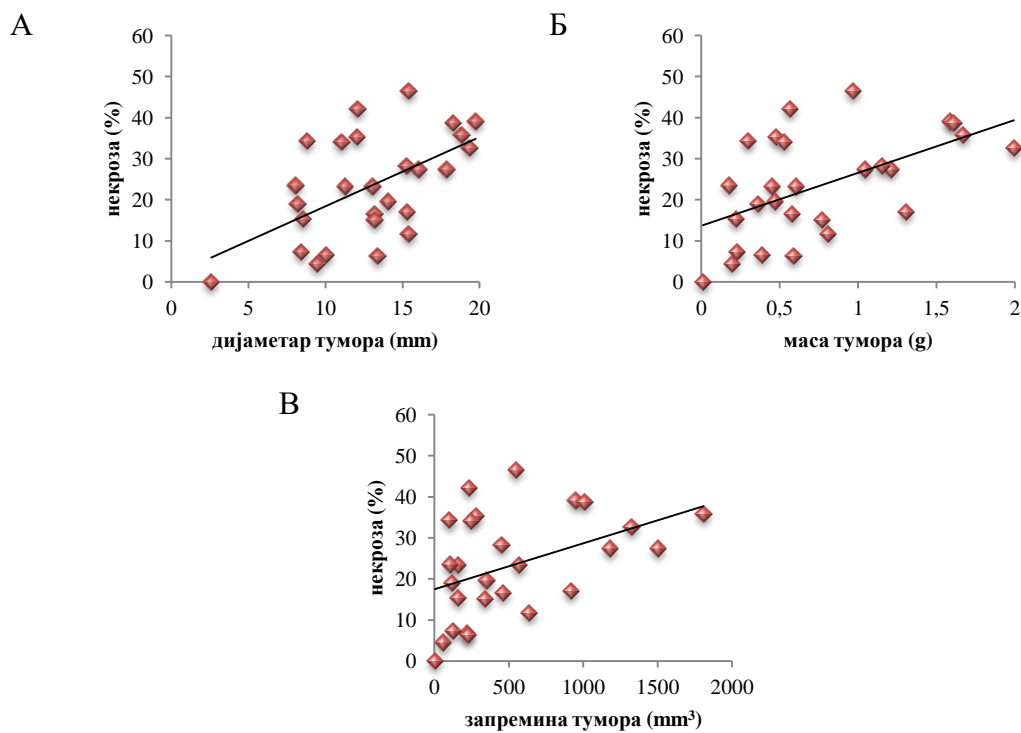
Слика 1: Одсуство гена за IL-33R је праћен мањим примарним тумором уз значајно повећање туморске некрозе. IL-33^{-/-} (n=24) и IL-33^{+/+} (n=24) мишеви су жртвовани 29-ог и 36-ог дана након инокуације. Ткивни пресеци индукованих тумора дојке бојених Н&Е су фотографисани појединачним фотографијама у маниру „црва“ применом микроскопског увећања 200х. На основу начињених фотографија, применом софтверског пакета Adobe Photoshop CS6, за сваки тумор посебно генерисан је мозаик. Фотографије добијене на овај начин представљале су целокупни пресек туморског ткива који је даље анализиран применом софтверског пакета Image Pro Plus (v. 6.0.0.206). У првом кораку одређивана је регија од интереса (ROI), тј туморско ткиво у односу на позадину. Некроза у примарном карциному дојке (црвени пиксели) је квантификована одабиром нијанси боја које одговарају ткиву захваћеном некрозом и приказана као процентуална вредност у односу на укупну површину туморског ткива (ROI).

Присуство некрозе у примарном тумору је детектовано микроскопском анализом ткивних пресека примарног тумора, бојених хематоксилин-еозин методом, након жртвовања

животиња 29-ог и 36-ог дана експеримента. Насупрот споријем расту примарних тумора код IL-33R^{-/-} мишева, код IL-33R^{+/+} животиња смо забележили бржи раст тумора и мање поље некрозе у туморском ткиву (Графикон 2, Слика 1).

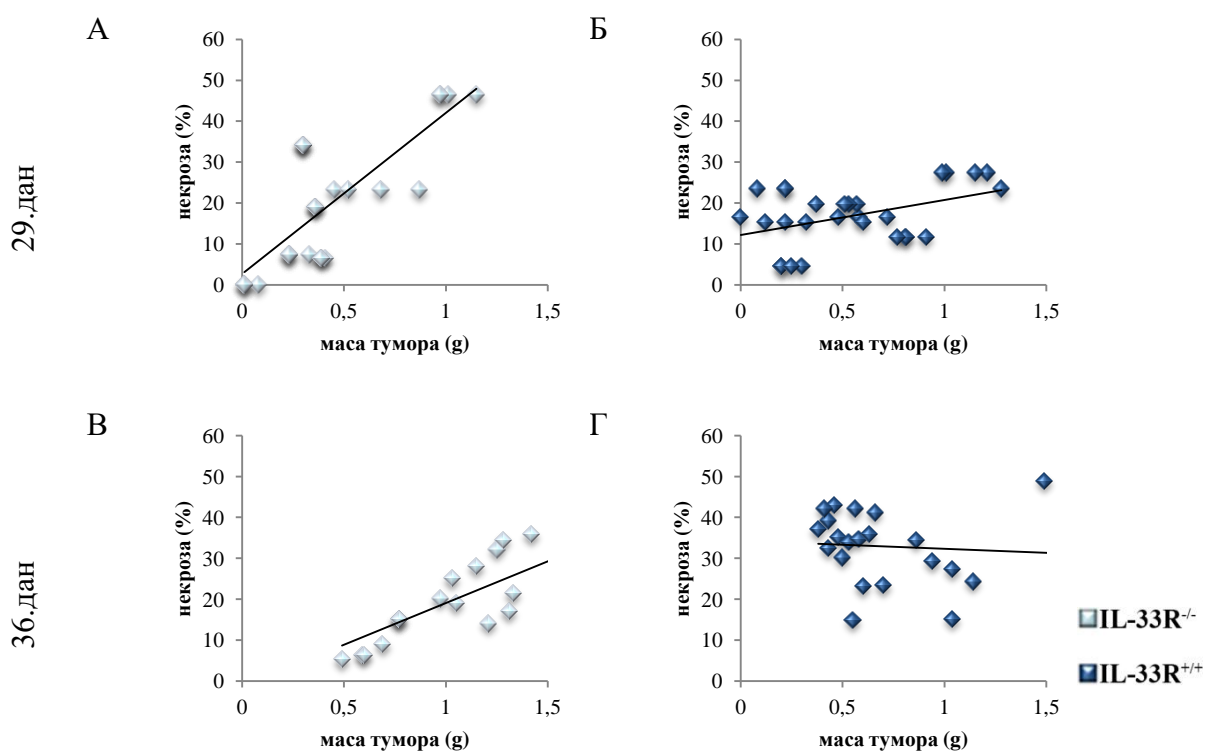
Спорији раст тумора код IL-33R^{-/-} мишева праћен значајно већим степеном туморске некрозе у односу на туморе индуковане у IL-33R^{+/+} животиња.

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



Графикон 4. Повезаност величине тумора и некрозе у 4Т1 индукованом тумору дојке. Анализом параметара величине тумора, на целом узорку ($n=48$), утврђена је статистички значајна позитивна корелација између пречника ($r=0,554$; $p=0,003$), масе ($r=0,514$; $p=0,006$) и запремине тумора ($r=0,474$; $p=0,012$) са процентуалном заступљеношћу некрозе у примарном 4Т1 тумору дојке. Статистичка значајност је одређивана применом Spearman-овог коефицијента корелације.

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



Графикон 5. Величина тумора је у позитивној корелацији са некрозом у примарном 4Т1 тумору дојке код IL-33R^{-/-} али не и код IL-33R^{+/+} мишева. А. Маса тумора је у позитивној корелацији са некрозом у групи IL-33R^{-/-} мишева жртвованих 29 дана након инокулације ($r=0,643$; $p<0,0001$). **Б.** У групи IL-33^{+/+} ова повезаност није статистички значајна ($r=0,214$; $p=0,274$). **В.** Код IL-33R^{-/-} мишева жртвованих 36. дана од инокулације постоји статистички значајна позитивна корелација између масе тумора и некрозе ($r=0,821$; $p<0,0001$). **Г.** У групи IL-33^{+/+} ова повезаност није статистички значајна ($r=-0,086$; $p=0,690$). Идентични резултати су добијени и анализом односа осталих параметара величине примарног тумора (највећи пречник и запремина) и некрозе. Подаци нису приказани. Статистичка значајност је одређивана применом Sперман-овог или Pearson-овог коефицијента корелације, у зависности од природе расподеле података.

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

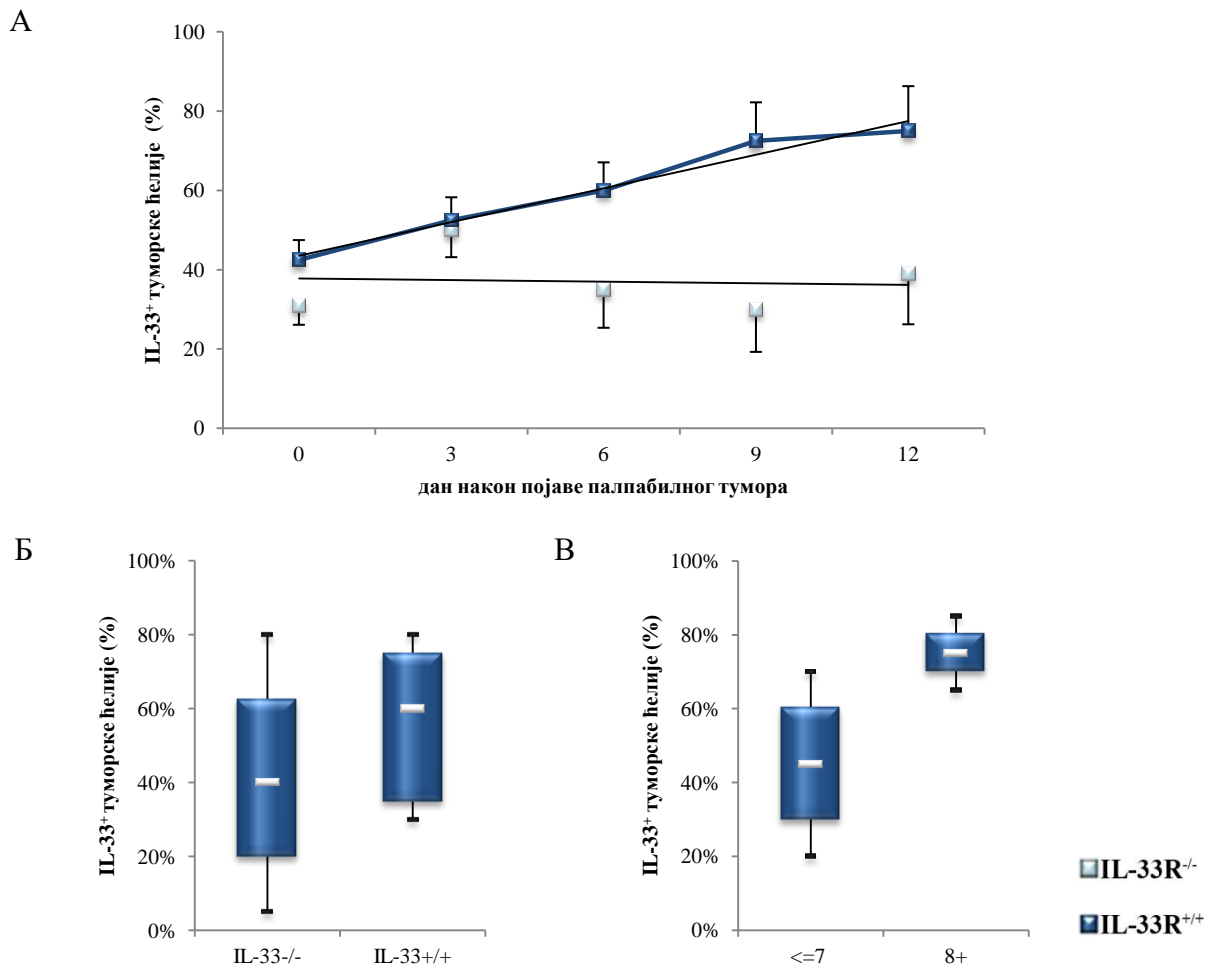
Исту статистику применили смо и на мишеве који су жртвовани 36-ог дана експеримента. Испитујући природу везе између масе тумора и некрозе, у обе групе мишева, применом Spearman-овог коефицијента корелације утврдили смо статистички значајну, јаку позитивну корелацију у групи IL-33R^{-/-} ($r=0,821$; $p<0,0001$) (Графикон 5В) мишева али не и у групи IL-33R^{+/+} мишева ($r=-0,086$; $p=0,690$) (Графикон 5Г).

Експресија IL-33 у туморским ћелијама корелира са величином тумора код IL-33R^{+/+} али не и код IL-33R^{-/-} мишева

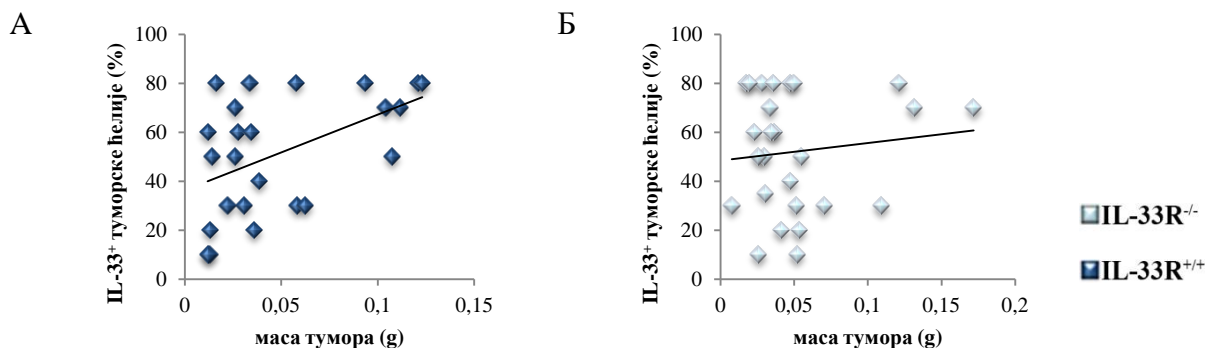
У циљу праћења динамике експресије IL-33 у туморском ткиву кроз време IL-33R^{+/+} и IL-33R^{-/-} мишева, мишеви су жртвовани сваког трећег дана након појаве палпабилног тумора. Експресија IL-33 је одређивана имунохистохемијским бојењем ткивних пресека смрзнутог туморског ткива. Експресија IL-33 показује временски зависно повећање код IL-33R^{+/+} мишева. Насупрот овоме, код IL-33R^{-/-} мишева нисмо забележили повећање експресије IL-33 током периода праћења од 12 дана, што је указало на механизам позитивне повратне спреге IL-33/IL-33R осовине (Графикон 6А). Поред овога, експресија IL-33 у туморским ћелијама је била значајно већа код IL-33R^{+/+} мишева у односу на IL-33R^{-/-} (Mann Whitney-јев test, $p=0,022$) (Графикон 6Б, Слика 2). Желели смо да знамо након ког дана од појаве палпабилног тумора настаје значајна разлика у имунохистохемијској експресији IL-33 у 4Т1 туморским ћелијама код WT мишева. Мишеве смо груписали у оне који су жртвовани до седмог и од осмог дана од појаве палпабилног тумора. Применом Mann Whitney-јевог теста утврдили смо статистички значајну разлику између ове две групе мишева ($p=0,001$) (Графикон 6В). У групи IL-33R^{-/-} мишева није било разлике у експресији IL-33 ($p>0,05$).

Имунохистохемијском анализом смо показали да у групи IL-33R^{+/+} мишева постоји јака позитивна корелација између величине тумора (пречник, запремина, маса) и експресије IL-33. Применом Spearman-овог коефицијента корелације утврдили смо средње јаку,

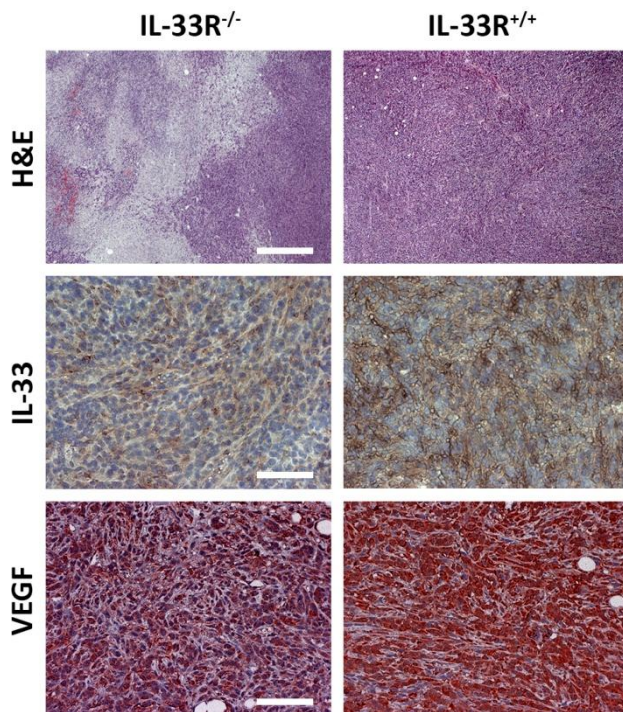
позитивну корелацију између масе тумора и експресије IL-33 у туморским ћелијама 4T1 индукованог тумора дојке ($r=0,462$; $p=0,023$) (Графикон 7А). Корелација није нађена у групи IL-33R^{-/-} мишева ($p>0,05$) (Графикон 7Б).



Графикон 6. Експресија IL-33 у туморским ћелијама 4T1 карцинома дојке је значајно мања код IL-33^{-/-} мишева. А. Временска зависност и разлика у експресији IL-33 у туморском ткиву између IL-33R^{+/+} и IL-33R^{-/-} групе, је утврђивана тако што су мишеви жртвовани сваког трећег дана након појаве палпабилног тумора а затим је, имунохистохемијском методом, на ткивним пресецима смрзнутог туморског ткива одређивана експресија IL-33. Експресија IL-33 показује временски зависно повећање код IL-33^{+/+} мишева. Насупрот овоме, код IL-33R^{-/-} мишева није забележено повећање експресије IL-33 током периода праћења од 12 дана (* $p=0,019$, ** $p=0,003$). **Б.** Процент позитивних туморских ћелија на IL-33 је статистички значајно већи у групи IL-33R^{+/+} мишева ($p=0,022$). Статистичка значајност је одређивана применом Mann Whitney-јевог теста. **В.** У групи IL-33R^{+/+} мишева постоји значајна разлика у средњој вредности позитивних туморских ћелија између мишева који су жртвовани до или после 7 дана од појаве палпабилног тумора ($p=0,001$). Статистичка значајност је одређивана применом Mann Whitney-јевог теста.



Графикон 7. Експресија IL-33 у туморским ћелијама 4Т1 тумора дојке позитивно корелира са величином тумора, код IL-33R^{+/+} мишева. А. Маса тумора и експресија IL-33 у туморским ћелијама 4Т1 тумора дојке позитивно корелирају код IL-33R^{+/+} мишева ($r=0,462$; $p=0,023$). **Б.** Не постоји значајна корелација масе тумора и експресије IL-33 у туморским ћелијама IL-33R^{-/-} мишева ($p>0,05$). Идентични резултати су добијени и анализом повезаности експресије IL-33 и других параметара величине тумора (највећи пречник и запремина). Подаци нису приказани. Статистичка значајност је одређивана применом Спегман-овог коефицијента корелације.



Слика 2. Експресија IL-33 и VEGF-а у туморским ћелијама 4Т1 индукованог карцинома дојке у IL-33R^{-/-} и IL-33R^{+/+} мишева. Микроскопском анализом H&E бојених препарата (горњи панел) уочава се већи тепаен некрозе у туморима индукованих у IL-33R^{-/-} мишева (оригинално увећање $\times 100$, референта линија $200\mu\text{m}$). Процентуална заступљеност туморских ћелија позитивних на IL-33 (средњи панел) и VEGF (доњи панел) као и интензитет бојења је знатно већи у туморима IL-33R^{+/+} мишева (оригинално увећање $\times 200$, референта линија $100\mu\text{m}$).

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

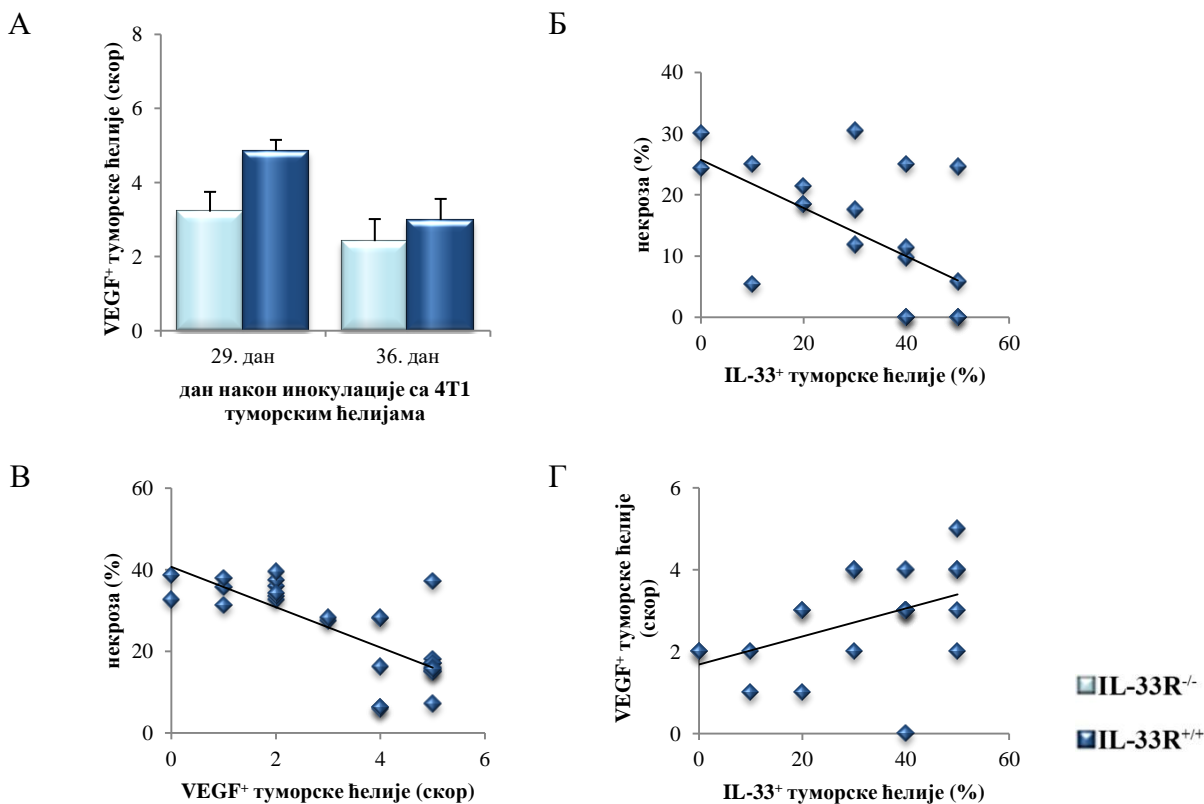
У наставку истраживања анализирали смо експресију VEGF-а у туморском ткиву. Експресија VEGF-а је процењивана на основу критеријума за скоровање који су предложили Rydén и сардници (49) за интерпретацију овог белега у инвазивном карциному дојке. Очитавано је искључиво цитоплазматско бојење туморских ћелија и имуносхистохемијски скор је одређиван на основу процента туморских ћелија које су биле позитивне на VEGF. Скала за оцењивање експресије се кретала у опсегу од 0 до 5: 0=одсуство имунохистохемијске реакције; 1= \leq 1% позитивних ћелија; 2=1–10% позитивних ћелија; 3=10–50% позитивних ћелија; 4=50-90% позитивних ћелија и 5 \geq 90% позитивних ћелија.

Mann Whitney-јевим тестом смо утврдили да делеција IL-33R смањује експресију VEGF-а у туморским ћелијама и разлика је статистички значајна 29-ог дана ($3,21 \pm 0,53$) након инокулације у поређењу са IL-33R^{+/+} мишевима ($4,86 \pm 0,60$) ($p=0,05$) (Графикон 8А, Слика 2). У групи IL-33R^{+/+} мишева, просечна експресија VEGF скорa је била статистички значајно мања код мишева жртвованих 36-ог ($2,99 \pm 0,57$) у односу на 29-ти дан ($4,86 \pm 0,60$) ($p=0,032$) (Графикон 8А).

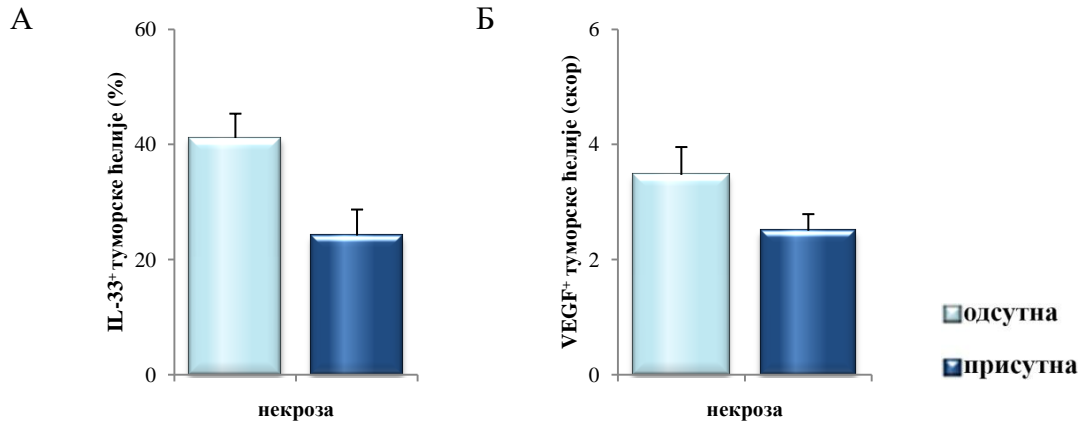
Када смо упоредили експресију IL-33 и VEGF-а и поље некрозе у примарном тумору дојке, показали смо да је експресија IL-33 у негативној корелацији са туморском некрозом, 36-ог дана након инокулације тумора, код IL-33R^{+/+} животиња (Spearman-ов коефицијент корелације, $r=-0,574$; $p=0,007$) (Графикон 8Б). У складу са овим податком, VEGF скор је такође у негативној корелацији са туморском некрозом 36-ог дана након инокулације тумора у IL-33R^{+/+} мишева (Spearman-ов коефицијент корелације, $r=-0,750$; $p<0,0001$) (Графикон 8В). Овај феномен није потврђен у групи IL-33R^{-/-} мишева ($p>0,05$). Коначно, експресија IL-33 је у позитивној корелацији са VEGF скором у туморским ћелијама у IL-33R^{+/+} мишева (Spearman-ов коефицијент корелације, $r=0,512$; $p=0,018$) (Графикон 8Г).

IL-33R^{+/+} мишове смо поделили на две групе: без и са детектованим некротичним пољима у туморском ткиву и анализирали смо експресију IL-33 и VEGF-а. Експресија IL-33 била је значајно већа у туморима без некротичних поља ($24,17 \pm 4,52$ vs. $41,11 \pm 4,23$) ($p=0,012$)

(Графикон 9А). И експресија VEGF-а је била значајно већа у туморима са детектабилном некрозом ($2,5 \pm 0,29$ vs. $3,47 \pm 0,48$) ($p=0,037$) (Графикон 9Б).



Графикон 8. Експресија VEGF-а у туморским ћелијама 4T1 карцинома дојке је значајно мања код IL-33R^{-/-} мишева. А. Делетија IL-33R смањује експресију VEGF-а у туморским ћелијама и разлика је статистички значајна 29-ог дана након инокулације у поређењу са IL-33R^{+/+} мишевима ($p=0,05$). У групи IL-33R^{+/+} мишева, средња вредност VEGF скорa је статистички значајно мања код мишева жртвованих 36-ог у односу на 29-ти дан ($p=0,032$). Резултат је приказан као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста. **Б.** Код IL-33R^{+/+} животиња, 36-ог дана од инокулације регистрована је статистички значајна негативна корелација између експресије IL-33 и туморске некрозе ($r=-0,574$; $p=0,007$). **В.** У групи IL-33R^{+/+}, VEGF скор је у негативној корелацији са туморском некрозом 36-ог дана након инокулације. **Г.** Експресија IL-33 је у позитивној корелацији са VEGF скором у туморским ћелијама у IL-33R^{+/+} мишева ($r=0,512$; $p=0,018$). Статистичка значајност је анализирана применом Spearman-овог коефицијента корелације.



Графикон 9. Туморска некроза негативно корелира са експресијом IL-33 и VEGF-а у туморским ћелијама 4T1 индукованог карцинома дојке у IL-33R^{+/+} мишева. Након екстирпације и микроскопске анализе ткивних пресека туморског ткива узетог од IL-33R^{+/+} мишева, тумори су подељени на групу са и без детектоване некрозе. **А.** Поређењем експресије IL-33 у туморским ћелијама 4T1 индукованог тумора код IL-33R^{+/+} мишева утврђена је повећана експресија овог белега у туморима без некротичних поља ($p=0,012$). **Б.** Тумори без микроскопски детектоване некрозе показују значајно већу експресију VEGF-а ($p=0,037$). Резултат је приказан као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

Експресија IL33, IL-33R и VEGF-а је у инверзној корелацији са некрозом у хуманом карциному дојке

Са циљем утврђивања релевантности експерименталних података добијених на мишевима проучавали смо експресију IL-33, IL-33R и VEGF-а и MVD у туморским ћелијама 40 пацијенткиња код којих је дијагностификован инвазивни дуктални карцином дојке. Демографске карактеристике пацијенткиња су приказане у табели 1.

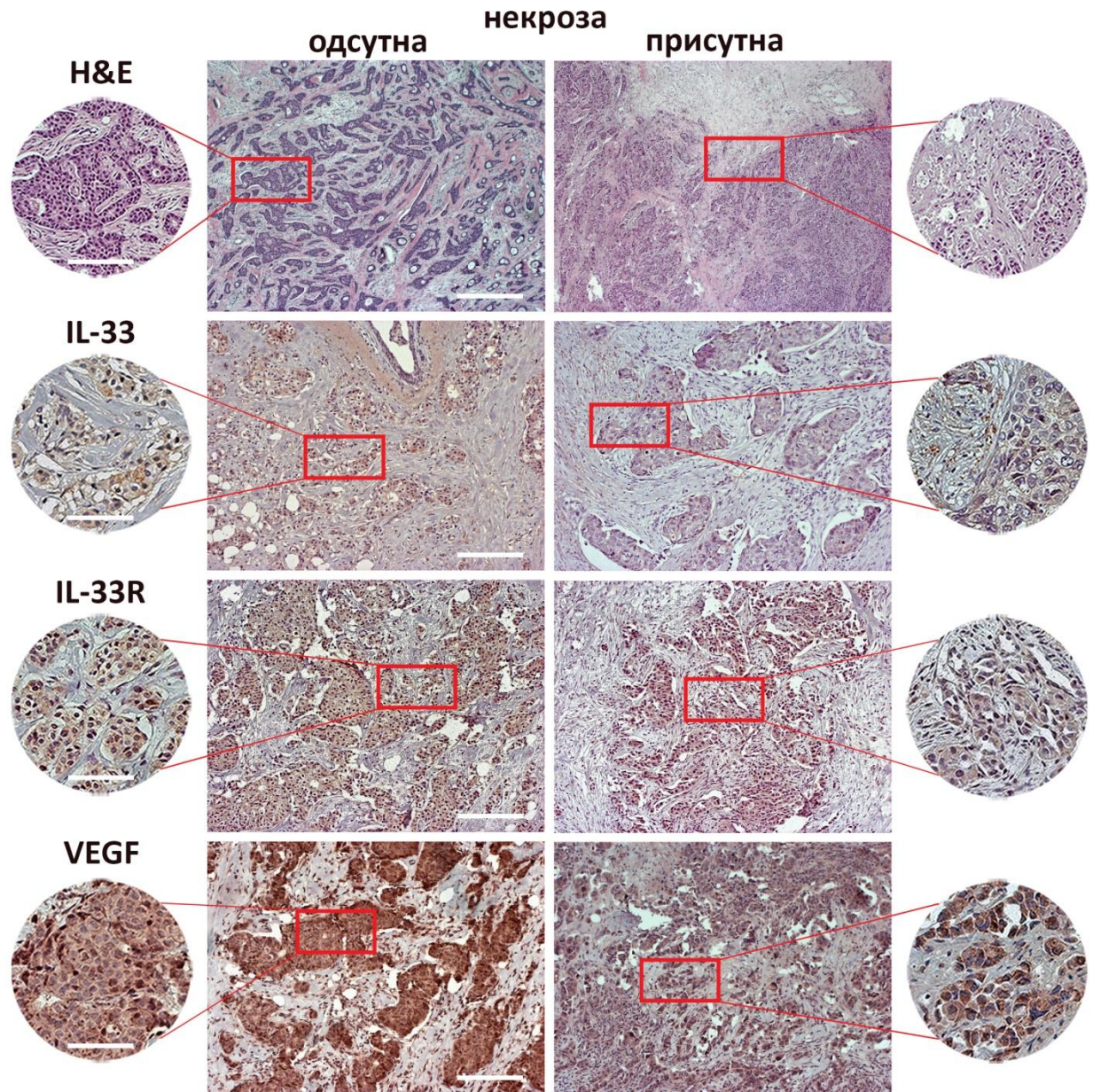
Како бисмо испитали разлику у експресији IL-33, IL-33R и VEGF-а у зависности од некрозе све пацијенткиње смо поделили на две групе у зависности од присуства ($n=20$) или одсуства ($n=20$) некротичних поља у ткиву карцинома дојке (254) (Слика 3). Између испитиваних група није било разлике у старости, величини и стадијуму тумора према АЈСС класификацији (Табела 1).

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

Табела 1. Клиничко-патолошке карактеристике испитаника. Студија обухвата 40 пацијенткиња са инвазивним дукталним карциномом дојке које су категорисане у групу без (n=20) и са (n=20) детектованом некрозом у туморском ткиву. Није утврђена статистички значајна разлика у животној доби, величини и Т стадијуму тумора према АЈСС препорукама (p>0,05). Статистичка значајност је тестирана χ^2 и Mann Whitney-јевим тестом.

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

Применом Student-овог t теста утврдили смо да постоји статистички значајна разлика у експресији IL-33 и IL-33R у туморским ћелијама карцинома дојке у којима је детектована некроза. Средња вредност експресије IL-33 је била већа у групи тумора без некрозе (13,11 ± 3,73) у односу на групу тумора са некрозом (9,02 ± 3,15) (p=0,05) (Графикон 10А, Слика 3). Такође, експресија IL-33R је била већа у истој групи тумора (15,55 ± 2,47 vs. 43,2 5 ± 5,24) (p<0,0001) (Графикон 10Б, Слика 3). Слично томе, експресија VEGF-а у туморским ћелијама је била мања у туморима у којима је детектована некроза (2,88 ± 0,35 vs. 3,61 ± 0,22) (p=0,015) (Графикон 10В, Слика 3). Анализом односа експресије истих маркера (Spearman-овим коефицијентом корелације) утврдили смо позитивну корелацију имунохистохемијске експресије IL-33 (r=0,375; p=0,017), односно IL-33R (r=0,292; p=0,038) са експресијом VEGF-а у туморским ћелијама карцинома дојке (Графикон 10Г и Д).

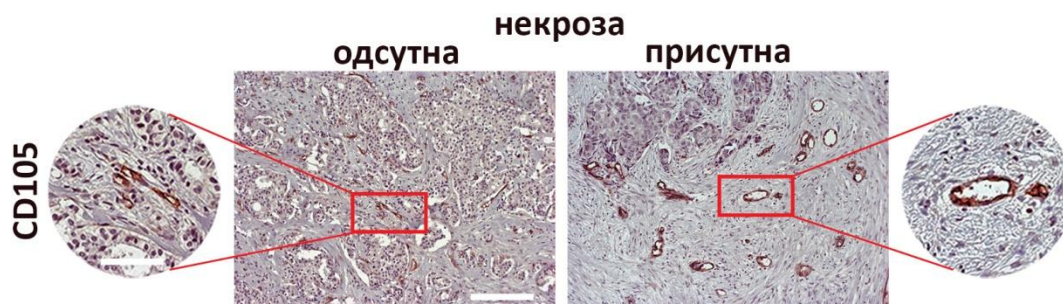


Слика 3. Разлика у експресији IL-33, IL-33R и VEGF-а у зависности од присуства некротичних поља у ткиву карцинома дојке. Репрезентативне микрофотографије ткивних пресека хуманог карцинома дојке, бојених стандардном H&E методом. Пацијенти су класификовани у две групе у зависности од присуства (n=20) или одсуства (n=20) некротичних поља (оригинално увећање x100, референтна линија 200µm; оригинално увећање x200, референтна линија 100µm) (**горњи панел**). Процент туморских ћелија позитивних на IL-33 (**горњи-средњи панел**), IL-33R (**доњи-средњи панел**) и VEGF (**доњи панел**) као и интензитет бојења је значајно већи у карциномима дојке у којима није детектована некроза (оригинално увећање x100, референтна линија 200µm; оригинално увећање x200, референтна линија 100µm)

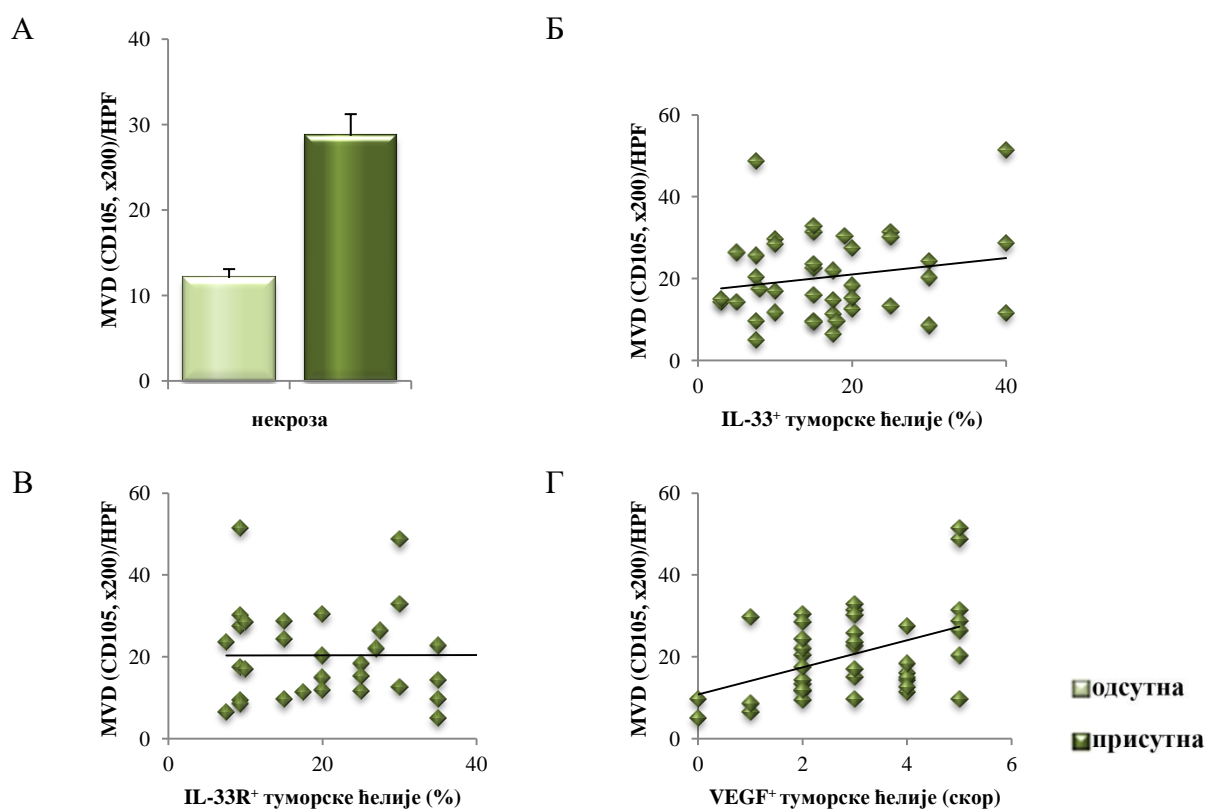
VEGF је у позитивној корелацији са MVD у перинекротичном рубу хуманог карцинома дојке

Микроваскуларна густина (MVD) је анализирана имунохистохемијском методом, применом анти-CD105 антитела и употребом светлосног микроскопа (Axioskop 40, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany) (Слика 4). Појединачне ендотелне ћелије или кластери позитивни на CD105 детектовани су као крвни судови. Присуство крвних ћелија или фибрина без ендотелних ћелија није детектовано као микроваскуларни елемент као ни крвни судови са мишићним зидом. Сви ткивни исечци су првобитно анализирани на микроскопским увељачањима 40x и 100x. На овај начин су одређивана три „жаришта“ (енг. „hot spots“) тј. поља са највећом микроваскуларном концентрацијом, а затим су ова поља фотографисана на 200x увељачању применом дигиталне камере (AxioCam ICc1, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany). Независно, два истраживача су применом софтвера (AxioVision v.4.8.2.0, Carl Zeiss Microscopy GmbH, München, Germany) спровела анализу генерисаних фотографија и утврдили број микроваскуларних структура у претходно одабрана три „жаришта“. MVD (микроваскуларне структуре/HPF) је израчунавана према критеријумима које су поставили Weidner и сарадници (249) тј. као средња вредност појединачних MVD у три одабрана микроскопска фокуса.

MVD је статистички значајно већа у туморима са детектабилном некрозом ($28,67 \pm 2,54$) у поређењу са туморима у којима микроскопском анализом нисмо детектовали некротична поља ($12,03 \pm 1,04$) (Mann Whitney-јев тест, $p < 0,0001$) (Графикон 11А, Слика 4). Крвне судове, груписане у кластере, највећим бројем смо уочили у зони перинекротичног руба. Због дистрибуције новонасталих крвних судова, анализирали смо повезаност експресије IL-33, IL-33R и VEGF-а у овој зони са MVD. Израчунавањем Spearman-овог коефицијента корелације нисмо утврдили статистички значајну корелацију између експресије IL-33 ($p > 0,05$) и IL-33R ($p > 0,05$) у перинекротичном рубу са MVD (Графикон 11Б и В). Међутим, статистички значајна корелација постоји између експресије VEGF-а у туморским ћелијама око зоне некрозе и MVD ($r = 0,340$; $p = 0,032$) (Графикон 11Г).



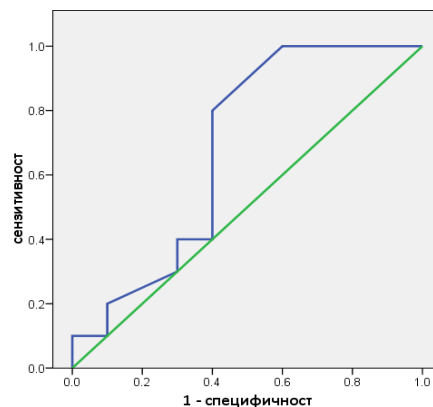
Слика 4. Имунохистохемијска процена MVD. MVD је израчунавана као средња вредност појединачних MVD у три одабрана микроскопска фокуса. У туморима са присутном некрозом детектован је већи број новонасталих крвних судова (оригинално увећање x100, референтна линија 200 μ m; оригинално увећање x200, референтна линија x100 μ m).



Графикон 11. Туморска некроза је праћена већом MVD у хуманом карциному дојке. **А.** Средња вредност MVD је статистички значајно већа у групи тумора са некрозом у односу на туморе у којима микроскопском анализом нису утврђена поља некрозе $p < 0,0001$. Резултат је приказан као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста. **Б.** Не постоји статистички значајна корелација између MVD и експресије IL-33 ($p > 0,05$) и **В.** IL-33R у перинекротичном рубу ($p > 0,05$). **Г.** Постоји позитивна корелација између MVD и имунохистохемијске експресије VEGF-а у зони тумора око некрозе ($r = 0,375$; $p = 0,017$). Статистичка значајност је анализирана применом Spearman-овог коефицијента корелације.

Експресија IL-33 је поуздан маркер за некрозу али за разлику од некрозе не утиче на преживљавање оболелих од карцинома дојке

Следеће нас је занимало да ли је експресија IL-33 у туморским ћелијама добар маркер за постојање некрозе у туморском ткиву. Како бисмо проценили значај IL-33 као маркера применили смо израчунавање ROC криве.



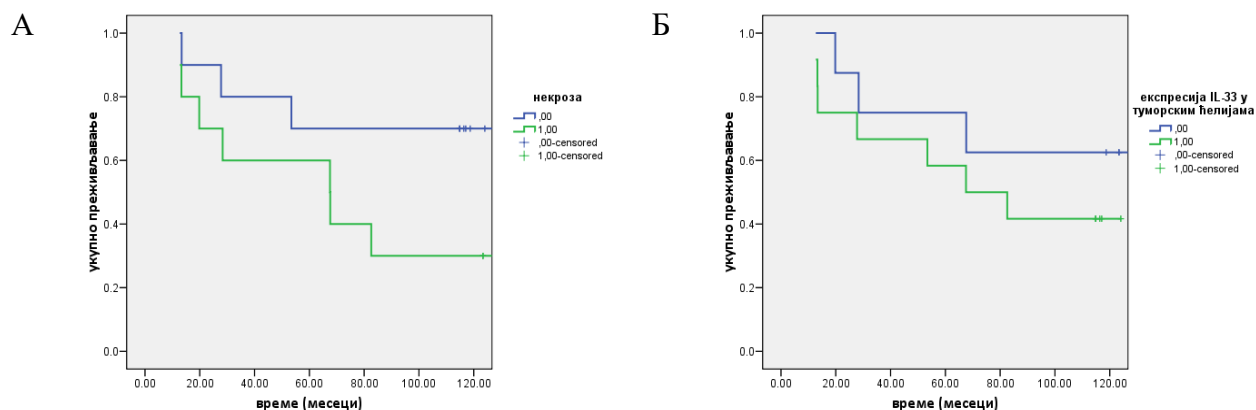
Графикон 12. Анализа експресије IL-33 у туморским ћелијама и значај у предикцији некрозе у ткиву хуманог карцинома дојке. Смањена експресија IL-33 у туморским ћелијама указује на присуство некрозе у туморском ткиву. AUROC (енгл. Area under receiver operating characteristic curve)=0,680, $p=0,051$, сензитивност 80,0%, специфичност 60%, cut off point 4%. Статистичка значајност је утврђена применом ROC анализе.

На основу добијених резултата може се констатовати да је експресија IL-33 у туморским ћелијама поуздан маркер у предикцији некрозе у хуманом карциному дојке (AUROC=0,680, $p=0,051$) (Графикон 12). Резултати јасно показују да оптимална гранична вредност у процентулавној заступљености IL-33 позитивних туморских ћелија износи 4% и да ова вредност омогућује јасно раздвајање пацијената са и без некрозе у инвазивном дукталном карциному дојке (сензитивност 85,2%, специфичност

88,6%). Статистичка анализа је потврдила да смањена експресија IL-33 у туморским ћелијама може да укаже на присуство некрозе у туморском ткиву.

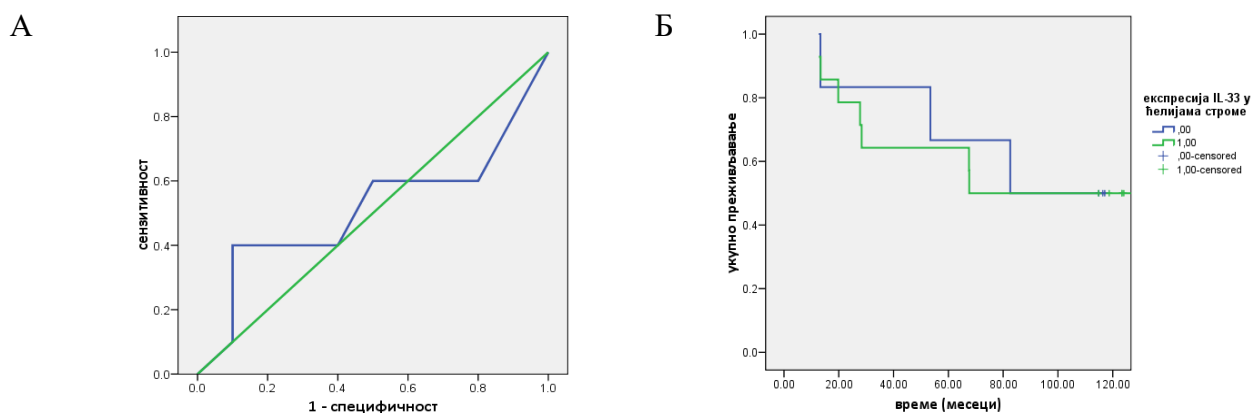
Применом Kaplan Meier-ове криве и Mantel-Cox теста процењивали смо значај некрозе и експресије IL-33 на десетогодишње преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке. Десетогодишње преживљавање у групи тумора са некрозом је 30% у поређењу са групом тумора без детектабилне некрозе у којој преживљавање износи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

За анализу утицаја експресије IL-33 на преживљавање, карциноми дојке су подељени на групу са ниском ($<4\%$ позитивних туморских ћелија) и високом експресијом ($\geq 4\%$ позитивних туморских ћелија). Наше израчунавање је показало да експресија IL-33 у туморским ћелијама статистички значајно не утиче на преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке иако је у групи позитивних карцинома, десетогодишње преживљавање било краће у односу на негативне туморе (41,7% vs. 62,5%) (Mantel-Cox, $p=0,174$) (Графикон 13Б).



Графикон 13. Утицај некрозе и експресије IL-33 у туморским ћелијама на преживљавање пацијената. А. Након периода праћења од 10 година преживљавање пацијената у групи тумора са некрозом је 30% у поређењу са групом тумора у без детектабилне некрозе у којој преживљавање износи 70%. Разлика у преживљавању је статистички значајна ($p=0,020$). Б. Експресија IL-33 у туморским ћелијама статистички значајно не утиче на преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке ($p=0,174$). Статистичка значајност је анализирана применом Mantel Cox-овог теста и Kaplan Meier-ове криве.

Експресија IL-33 у стромалним ћелијама није поуздан маркер за процену некрозе у ткиву хуманог карцинома дојке (AUROC 0,515, $p=0,871$) (Графикон 14А). Како на основу оваквог резултата нисмо успели да одредимо „cut off“ вредност, стромалну експресију смо класификовали на две групе користећи препоруке за тестирање Her2 у карциному дојке. Поштујући ове критеријуме, тумори су класификовани на групу са ниском ($\leq 10\%$ позитивних ћелија) и високом ($>10\%$ позитивних ћелија) експресијом IL-33 у ћелијама строме.

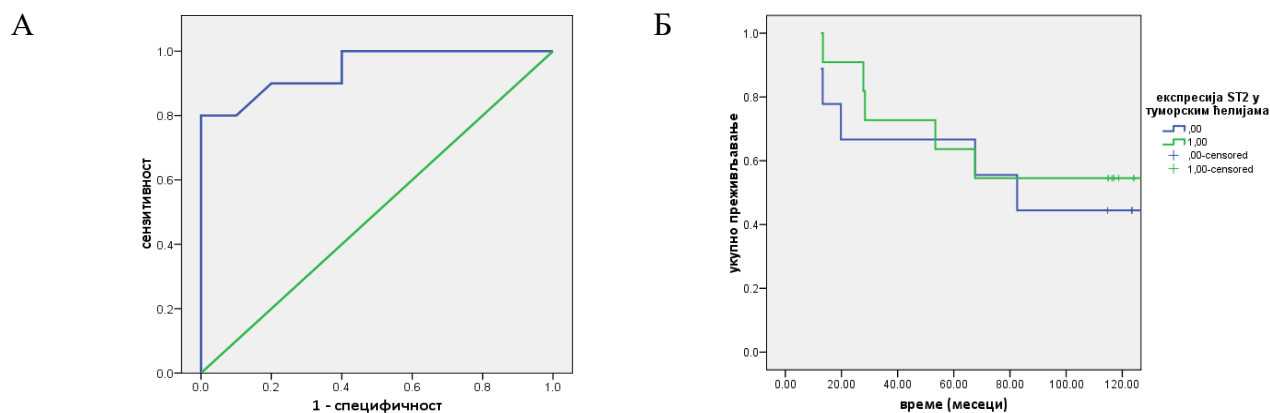


Графикон 14. Анализа значаја експресије IL-33 у стромалним ћелијама у предикцији некрозе и утицаја на преживљавање пацијената. **А.** Експресија IL-33 у стромалним ћелијама не указује на присуство некрозе у туморском ткиву. AUROC (енгл. Area under receiver operating characteristic curve)=0,515, $p=0,871$, Статистичка значајност је утврђена применом ROC анализе. **Б.** Експресија IL-33 у стромалним ћелијама статистички значајно не утиче на преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке ($p=0,849$). Статистичка значајност је анализирана применом Mantel Cox-овог теста и Kaplan Meier-ове криве.

Анализирајући утицај стромалне експресије IL-33 на десетогодишње преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке, закључили смо да овај маркер нема статистички значајан удео у преживљавању, ако се читавање експресије обавља у ћелијама строме (Mantel Cox, $p=0,849$) (Графикон 14Б). Десетогодишње преживљавање у обе групе пацијенткиња је износило око 50%.

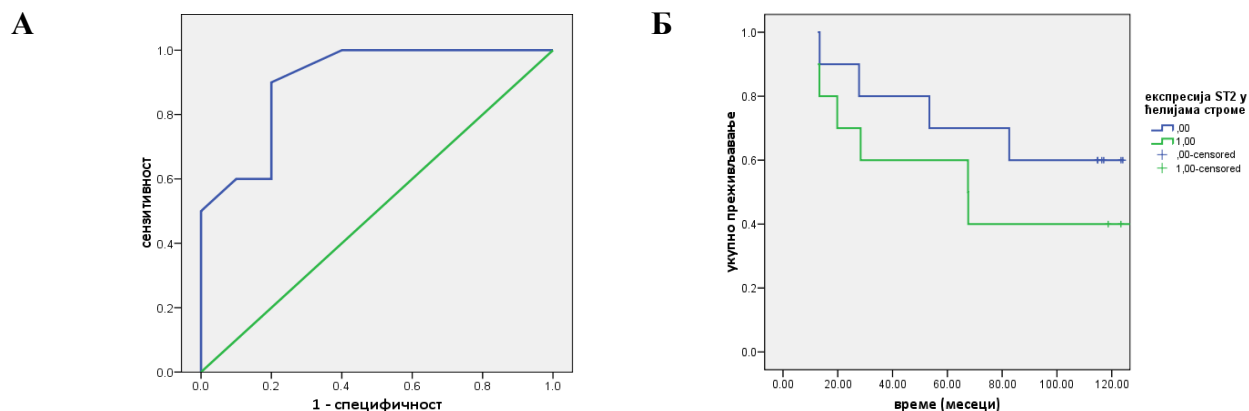
Даљим израчунавањем ROC криве и процењујући експресију IL-33R у туморским ћелијама као маркера некрозе, утврдили смо да је експресија овог маркера уз „cut off“ од

22,5% одличан параметар за процену некрозе у туморском ткиву карцинома дојке, при чему ниска експресија означава већу вероватноћу да су у ткиву тумора присутна некротична поља (Графикон 15А). За анализу утицаја експресије IL-33R у туморским ћелијама на преживљавање, карциноми дојке су подељени на групу са ниском (<22,5% позитивних ћелија) и високом експресијом (≥22,5% позитивних ћелија).



Графикон 15. Анализа значаја експресије IL-33R у туморским ћелијама у предикцији некрозе и утицаја на преживљавање пацијената. А. Смањена експресија IL-33R у туморским ћелијама указује на присуство некрозе у туморском ткиву. AUROC (енгл. Area under receiver operating characteristic curve)=0,945, $p < 0,0001$, сензитивност 90,0%, специфичност 80,0%, cut off point 22,5%. Статистичка значајност је утврђена применом ROC анализе. **Б.** Експресија IL-33R у стромланим ћелијама статистички значајно не утиче на преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке ($p=0,427$). Статистичка значајност је анализирана применом Mantel Cox-овог теста и Kaplan Meier-ове криве.

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



Графикон 16. Анализа значаја експресије IL-33R у стромалним ћелијама у предикцији некрозе и утицаја на преживљавање пацијената. А. Повећана експресија IL-33R у стромалним ћелијама указује на присуство некрозе у туморском ткиву. AUROC (енгл. Area under receiver operating characteristic curve)=0,905, $p < 0,0001$, сензитивност 90,0%, специфичност 80,0%, cut off point 13,75%. Статистичка значајност је утврђена применом ROC анализе. Б. Експресија IL-33R у стромалним ћелијама статистички значајно не утиче на преживљавање пацијенткиња са карциномом дојке ($p=0,158$). Статистичка значајност је анализирана применом Mantel Cox-овог теста и Kaplan Meier-ове криве.

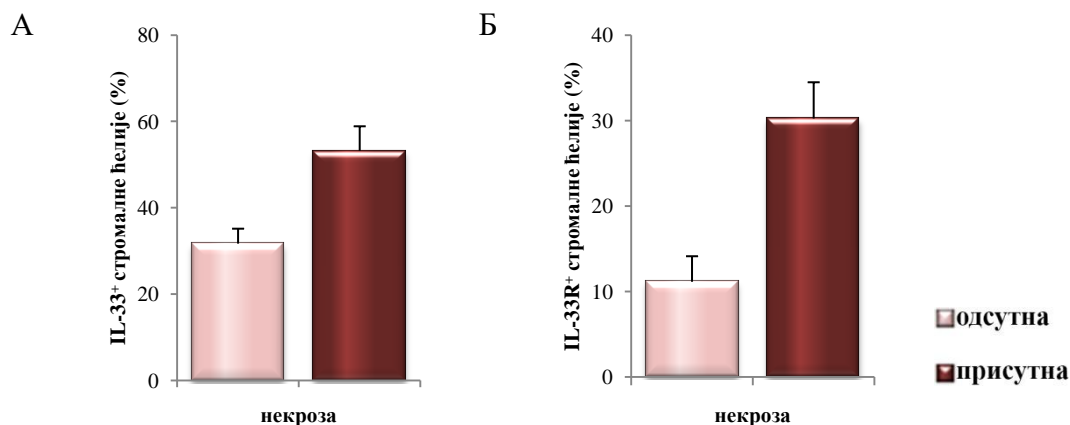
Експресија IL-33R у стромалним ћелијама се показала као поуздан маркер за процену присуства некрозе у ткиву хуманог карцинома дојке, при чему позитивност од $\geq 13,75\%$ стромалних ћелија указује на постојање екстензивних некротичних поља у ткиву тумора (Графикон 16А). На основу овако детерминисане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

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

Како се IL-33 и IL-33R експримирају и у ћелијама тумора и строме занимао нас је утицај експресије ових маркера на испитиване параметре као и однос између стромалне и туморске експресије IL-33 и IL-33R.

Применом Mann Whitney-јевог теста утврдили смо да је експресија IL-33 и IL-33R у туморским ћелијама већа у туморским ћелијама карцинома у којима смо детектовали поља

некрозе. Иако је проценат стромалних ћелија које експримирају IL-33 већа у групи карцинома са детектабилним пољем некрозе ($53,22 \pm 5,69$) у односу на групу без некрозе ($31,76 \pm 3,46$), ова разлика није статистички значајна (Mann Whitney-јев тест, $p=0,082$) (Графикон 17А). Са друге стране, експресија IL-33R у стромалним ћелијама је већа у групи са некрозом и разлика је статистички значајна ($11,14 \pm 2,99$ vs. $30,27 \pm 4,24$) (Mann Whitney-јев тест, $p<0,0001$) (Графикон 17Б).

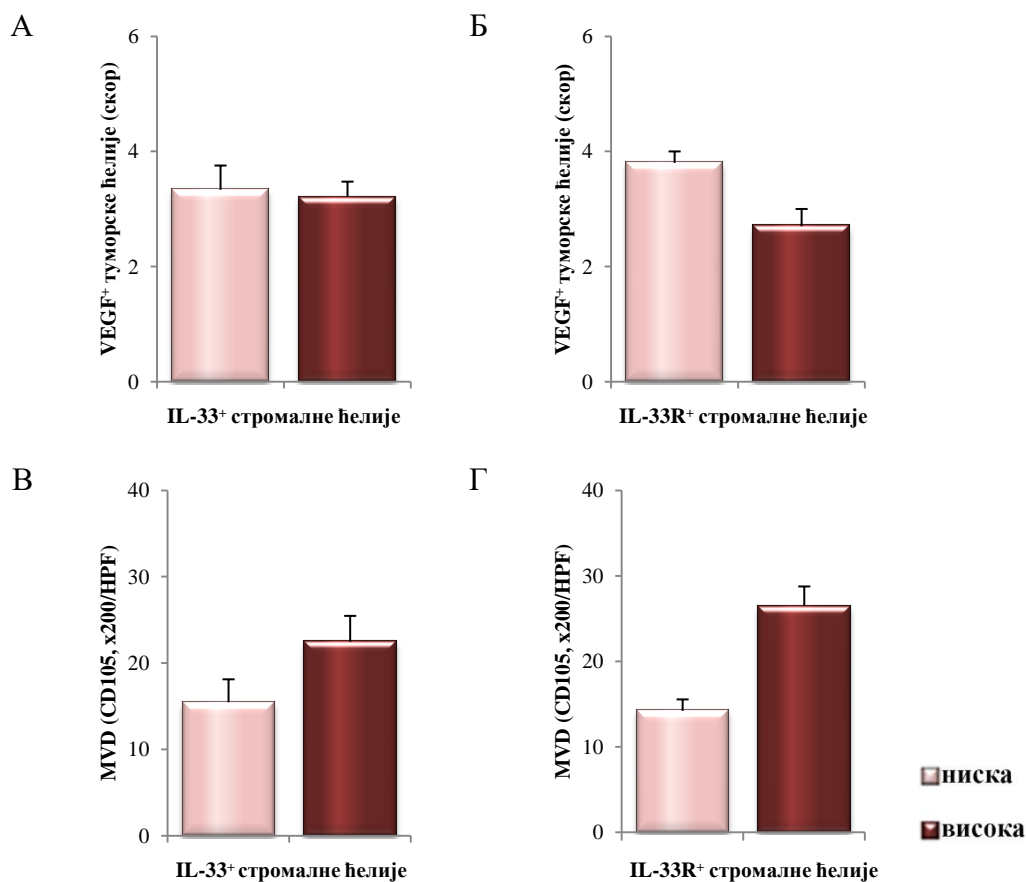


Графикон 17. Некроза повећава експресију IL-33 и IL-33R у ћелијама туморске строме хуманог карцинома дојке. А. Разлика у средњим вредностима процентуалне заступљености IL-33 позитивних ћелија строме није статистички значајна. Просечна вредност експресије је већа у групи тумора са некрозом у односу на туморе у којима микроскопском анализом нису утврђена поља некрозе ($p=0,082$). Б. Експресија IL-33R у ћелијама строме је статистички значајно већа у групи тумора са некрозом у односу на туморе у којима микроскопском анализом нису утврђена поља некрозе ($p<0,0001$). Резултат је приказан као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

Како бисмо утврдили разлику у експресији VEGF-а и MVD у зависности од имунохистохемијске експресије IL-33 и IL-33R у ћелијама строме, све карциноме смо на основу позитивности поделили на две групе и анализирали као карциноме са: ниском ($\leq 5\%$ позитивних ћелија) и високом експресијом ($>5\%$ позитивних ћелија). Од раније је познато да осовина IL33/IL-33R стимулише ангиогенезу и да су запаљенске ћелије, као саставни део туморске строме, један од кључних елемената у том процесу. Из тог разлога смо анализирали улогу IL-33/IL-33R сигналног пута у стромалним ћелијама и његов ефекат на настанак нових крвних судова.

Експресија VEGF-а у туморским ћелијама се не разликује између група са ниском ($3,33 \pm 0,42$) и високом ($3,21 \pm 0,26$) експресијом IL-33 у стромалним ћелијама (Mann Whitney-јев тест, $p > 0,05$) (Графикон 18А). Група карцинома која је имала високу стромалну експресију IL-33R имала је нижу средњу вредност VEGF скорa ($2,74 \pm 0,32$) у поређењу са карциномима који су имали ниску ($3,82 \pm 0,21$) стромалну IL-33R експресију (Mann Whitney-јев тест, $p < 0,0001$) (Графикон 18Б).

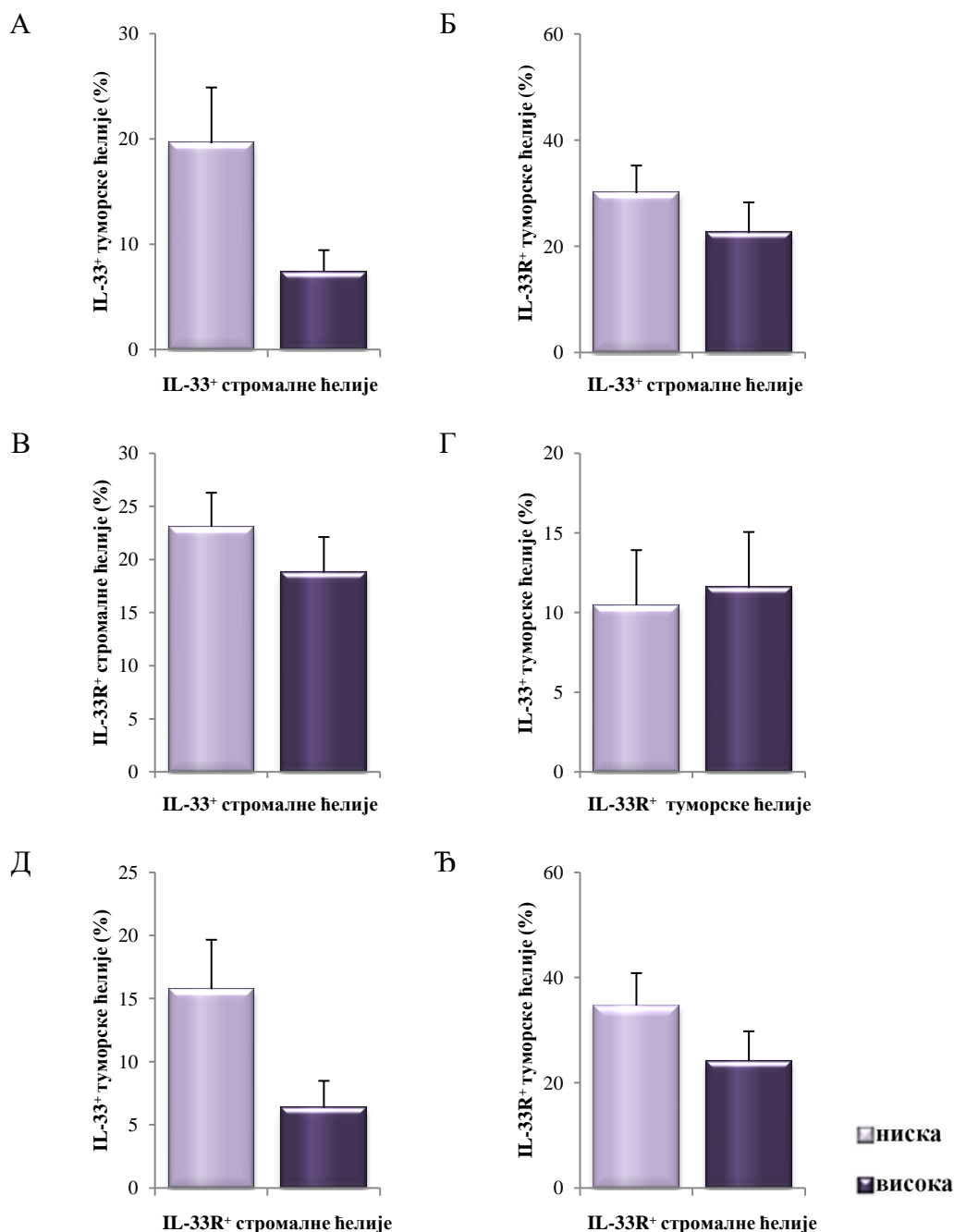
Насупрот експресији VEGF-а у туморским ћелијама, група тумора са високом експресијом IL-33 показује већу средњу вредност MVD ($15,45 \pm 2,66$) у поређењу са групом карцинома која је имала ниску ($22,46 \pm 3,01$) експресију IL-33 (Mann Whitney-јев тест, $p = 0,025$) (Графикон 18В). Такође, овај феномен је у складу са поређењем MVD у групама карцинома са ниском ($14,18 \pm 1,34$) и високом ($26,47 \pm 2,25$) експресијом IL-33R (Mann Whitney-јев тест, $p < 0,0001$) (Графикон 18Г).



Графикон 18. Експресија IL-33 и IL-33R у ћелијама строме повећава број новонасталих крвних судова у ткиву карцинома дојке. А. Разлика у средњим вредностима скорова за експресију VEGF-а у туморским ћелијама није статистички значајна између група тумора са ниском и високом експресијом IL-33 у ћелијама строме ($p > 0,05$). **Б.** Тумори са ниском експресијом IL-33R у ћелијама строме показују статистички значајну, већу, средњу вредност VEGF скорa у туморским ћелијама ($p < 0,0001$). **В.** Разлика у средњим вредностима броја новонасталих крвних судова је статистички значајно већа у групи тумора са високом експресијом IL-33 у ћелијама строме ($p = 0,025$). **Г.** Тумори са високом експресијом IL-33R у ћелијама строме показују статистички значајну, већу, средњу вредност MVD ($p < 0,0001$). Резултати су приказани као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

Инверзна експресија IL-33 и IL-33R између туморских и стромалних ћелија хуманог карцинома дојке

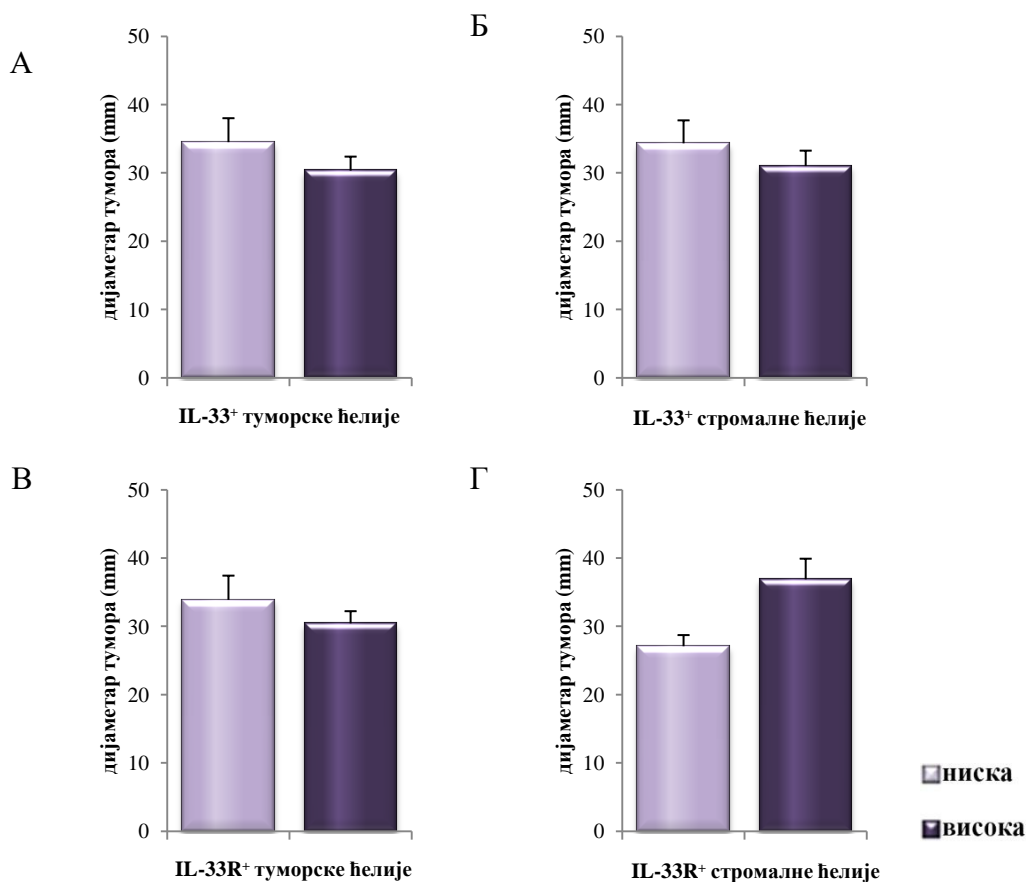
Упоредивали смо експресију IL-33 у туморским ћелијама у односу на експресију истог маркера у стромалним ћелијама, и обрнуто. Експресија IL-33 у туморским ћелијама значајно је већа у туморима у којима је ниска експресија IL-33 у стромалним ћелијама ($7,39 \pm 2,04$ vs. $19,58 \pm 5,30$; Mann Whitney-јев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



Графикон 19. Инверзна експресија IL-33 и IL-33R у туморским и стромалним ћелијама хуманог карцинома дојке. А. Процентуална заступљеност IL-33 позитивних туморских ћелија је значајно већа у групи тумора са ниском експресијом IL-33 у ћелијама строме ($p=0,001$). Б. У зависности од степена експресије IL-33 у ћелијама строме није забележена статистички значајна разлика у процентуалној заступљености IL-33R позитивних туморских ($p>0,05$) и В. IL-33R позитивних ћелија строме ($p>0,05$). Г. У зависности од степена експресије IL-33R у туморским ћелијама није забележена статистички значајна разлика у процентуалној заступљености IL-33 позитивних туморских ћелија ($p>0,05$). Д. Карциноми са ниском стромалном експресијом IL-33R показују већу вредност процентуалне позитивности туморских ћелија на IL-33 ($p=0,003$) и Б. IL-33R ($p=0,044$). Резултати су приказани као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

Пацијенте са тумором дојке поделили смо на групе, на основу експресије IL-33/IL-33R и анализирали смо величину тумора у новоформираним групама. Дијаметар тумора се није значајно разликовао између група пацијената са ниском ($34,5 \pm 3,51$) и високом експресијом туморског IL-33 ($30,33 \pm 2,05$) ($p=0,435$) (Графикон 20А). Такође, разлика у величини није значајна ни у групама са ниском ($34,33 \pm 3,36$) и високом експресијом IL-33 у стромалним ћелијама ($31,00 \pm 2,26$) ($p=0,404$) (Графикон 20Б). Ипак, средња вредност пречника у групама ниске експресије туморског и стромалног IL-33 је била у просеку већа.

Различити нивои експресија IL-33R у туморским ћелијама нису утицали на дијаметар тумора ($30,45 \pm 1,78$ vs. $33,89 \pm 3,55$) ($p=0,784$) (Графикон 20В). Супротно овоме, пацијенткиње у чијим туморима је детектована висока експресија IL-33R у стромалним ћелијама у просеку су имале већи пречник тумора ($36,9 \pm 3,02$) у односу на пацијенткиње са туморима ниске стромалне експресије IL-33R ($27,1 \pm 1,63$) ($p=0,022$) (Графикон 20Г).



Графикон 20. Пречник тумора се није разликовао у зависности од степена експресије IL-33 и IL-33R у туморским и ћелијама строме. А-Г. Дијаметар тумора се није значајно разликовао између група пацијената са ниском и високом експресијом IL-33 и IL-33R у туморским и ћелијама строме ($p > 0,05$). Резултати су приказани као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

Некроза и клиничкопатолошки параметри

Када смо пацијенте са тумором дојке поделили на две групе, на основу присуства поља некрозе, упоређивали смо проценте једарне експресије и интензитета имунохистохемијског бојења ER, PR, HER2 и p53 у туморским ћелијама у овако дефинисаним групама. Средња вредност скора за експресију ER је статистички значајно већа у групи карцинома у којима нису детектована подручја некротичног ткива ($7,1 \pm 0,18$) у односу на карциноме са некрозом ($2,4 \pm 0,99$) (Mann Whitney-jev test, $p < 0,0001$) (Графикон 21А, Слика 5). Аналогно експресији ER, експресија PR је већа у групи карцинома без некрозе а разлика је високо статистички значајна ($1,5 \pm 0,82$ vs. $5,6 \pm 0,76$)

(Mann Whitney-јев тест, $p=0,005$) (Графикон 21Б, Слика 5). Процентуална заступљеност Her2 позитивних карцинома дојке није се статистички значајно разликовала у групама карцинома, са и без некрозе (χ^2 тест, $p>0,05$) (Табела 2, Слика 5). Анализом експресије p53, утврдили смо статистички значајну разлику у средњој вредности Allred скова између групе карцинома са ($2,1 \pm 0,82$) и без подручја некрозе ($4,5 \pm 0,92$) ($p=0,008$) (Графикон 21В, Слика 6).

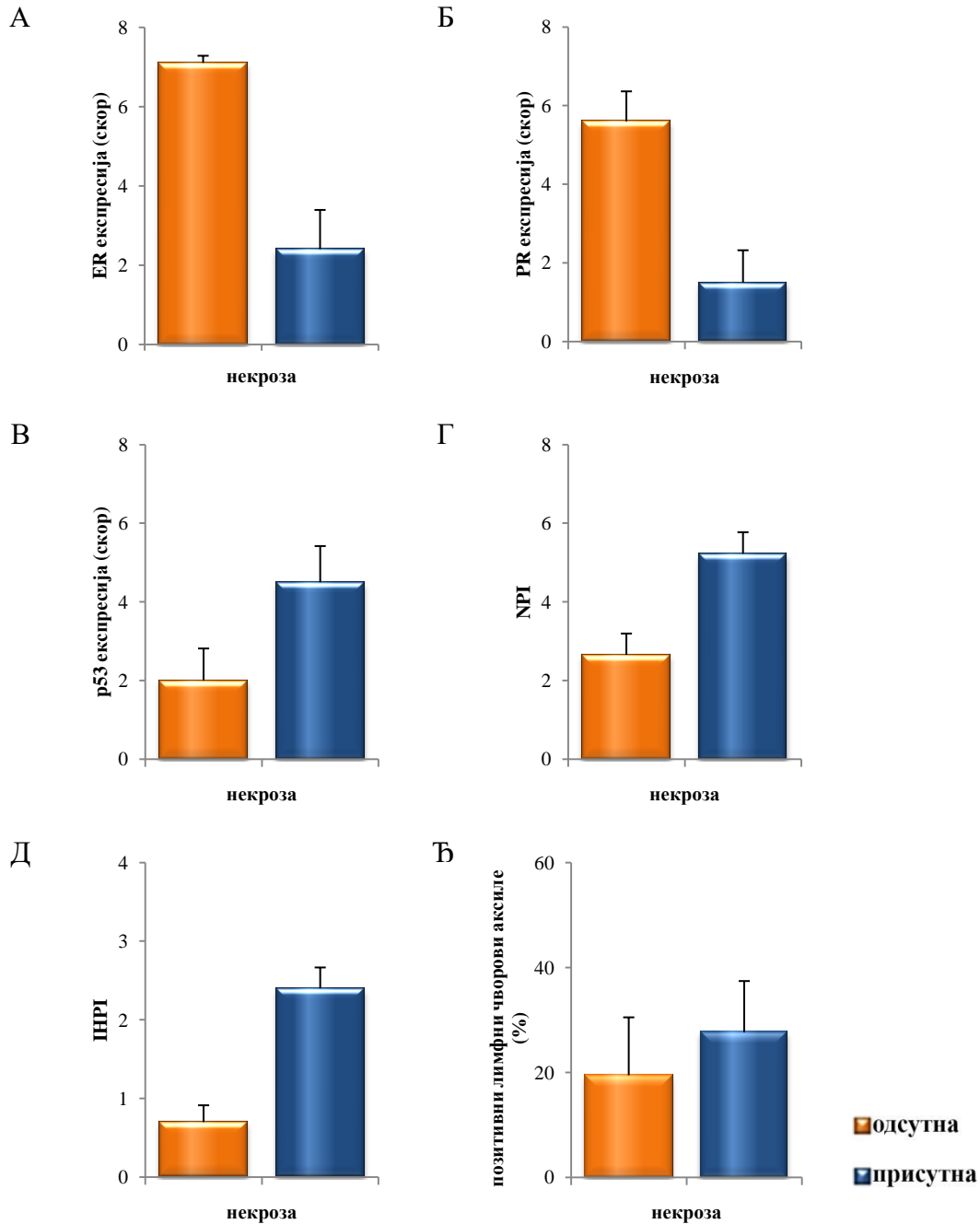
Nottingham-ов прогностички индекс смо израчунали према формули:

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

Код хистолошког градуса, добра диференцијација се бодује 1 поеном, средња са 2 и слаба са 3 бода. Нодални статус је класификован у три групе: 1 бод - без метастаза у лимфним чворовима, 2 бода - ако је захваћено од 1 до 3 нодуса, 3 - бода ако су метастатски депозити присутни у више од 4 лимфна нодуса. Већа вредност NPI означава лошију прогнозу болести (250,251). У групи карцинома са некротичним подручјима установили смо, статистички значајну, већу, средњу вредност NPI у поређењу са карциномима без некротичних поља ($2,65 \pm 0,54$ vs. $5,23 \pm 0,55$) ($p=0,005$) (Графикон 21Г).

ИNPI се формира као резултат имунохистохемијске детекције и мерења експресије различитих онкогена. За p53 и HER-2 позитивност, сваком тумору се додељује по 1 бод, а негативним туморима приписује се 0. Тумори са експресијом естрогених и прогестеронских рецептора добијају 0 бодова, а без ове експресије 1. Укупан ИNPI скор се креће у опсегу од 0 до 4 поена и сврстава се у 3 прогностичке групе: прва група је са добром прогнозом (0-1 бод), друга са интермедијерном (2) и трећа група са лошом прогнозом (3-4). Група тумора у којој су детектована поља некрозе показали су, статистички значајну, већу, средњу вредност ИNPI скова у поређењу са карциномима без некротичних поља ($0,7 \pm 0,21$ vs. $2,4 \pm 0,27$) ($p=0,001$) (Графикон 21Д).

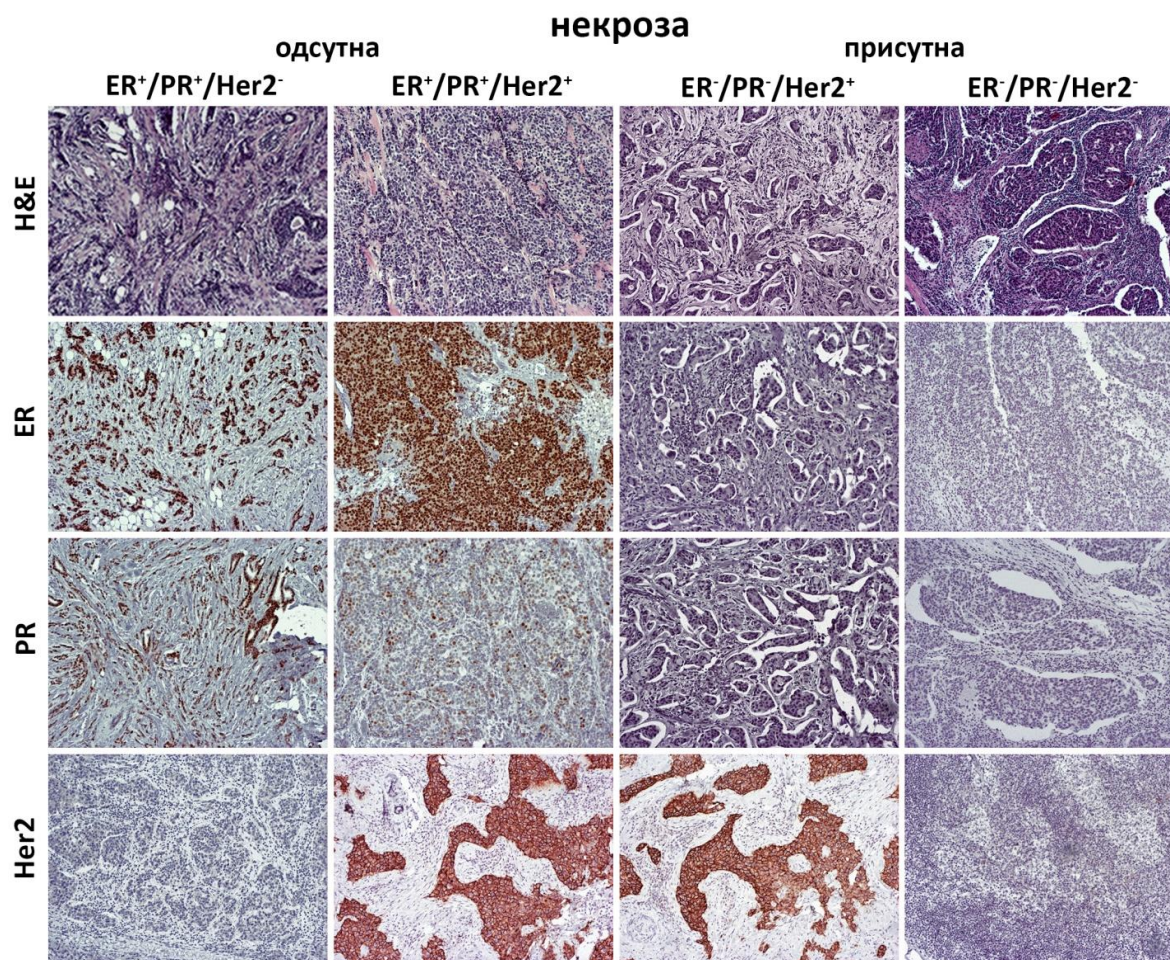
Повезаност некрозе са другим клиничкопатолошким параметрима приказан је у табели 2.



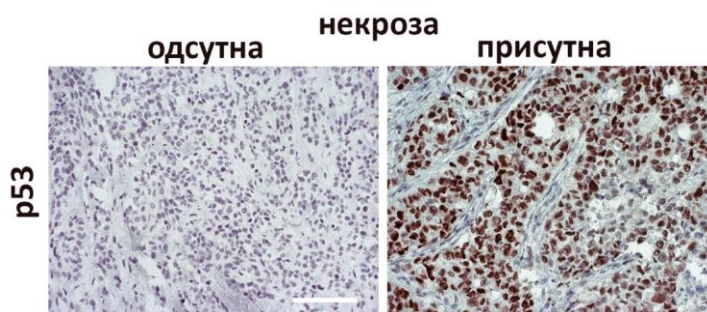
Графикон 21. Туморска некроза је повезана са клиничкопатолошким параметрима лоше прогнозе у хуманом карциному дојке. А. Средње вредности скорова за експресију ER и **Б.** PR су статистички значајно веће у групи карцинома у којима нису детектована подручја некротичног ткива у односу на карциноме са некрозом ($p < 0,0001$, $p = 0,005$). **В.** Тумори у којима су микроскопском анализом детектована поља некрозе показују статистички значајну већу средњу вредност скорa за експресију p53 ($p = 0,008$), **Г.** NPI ($p = 0,005$) и **Д.** INPI ($p = 0,001$) у односу на групу без некрозе. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

Некроза				
ВАРИЈАБЛА		ОДСУТНА	ПРИСУТНА	p
Her2	<i>Негативни</i>	18 (56,3%)	14 (43,8%)	0,236
	<i>Позитивни</i>	2 (25,0%)	6 (75,0%)	
Хистолошки градус	<i>I+II</i>	20 (83,3%)	4 (16,7%)	<0,0001*
	<i>III</i>	0 (0%)	16 (100%)	
Нуклеарни градус	<i>I+II</i>	19 (82,6%)	4 (17,4%)	<0,0001*
	<i>III</i>	1 (5,9%)	16 (94,1%)	
Митотски индекс	<i>I+II</i>	20 (55,6%)	16 (44,4%)	0,114*
	<i>III</i>	0 (0%)	4 (100%)	
Инвазија крвних судова	<i>Негативни</i>	14 (53,8%)	12 (46,2%)	0,740*
	<i>Позитивни</i>	6 (42,9%)	8 (57,1%)	
Инвазија лимфних судова	<i>Негативни</i>	12 (75,0%)	4 (25,0%)	0,024*
	<i>Позитивни</i>	8 (33,3%)	16 (66,7%)	
Перинеурална инвазија	<i>Негативни</i>	6 (100%)	0 (0%)	0,027*
	<i>Позитивни</i>	14 (41,2%)	20 (58,8%)	
СМР	<i>I+II</i>	20 (58,8%)	14 (41,2%)	0,027*
	<i>III</i>	0 (0%)	6 (100%)	
Статус аксиларних лимфних нодуса	<i>Негативни</i>	14 (70,0%)	6 (30,0%)	0,027*
	<i>Позитивни</i>	6 (30,0%)	14 (70,0%)	
Процент позитивних аксиларних лимфних нодуса		19,45 ± 7,59	27,64 ± 6,71	0,105**
χ^2 тест*				
Mann Whitney-јев тест**				

Табела 2. Однос туморске некрозе у ткиву хуманог карцинома дојке са стандардним клиничкопатолошким параметрима. Студија обухвата 40 пацијенткиња са инвазивним дукталним карциномом дојке које су категорисане у групу без (n=20) и са (n=20) детектованом некрозом у туморском ткиву. Статистичка значајност је тестирана χ^2 и Mann Whitney-јевим тестом.



Слика 5. ER/PR/Her2 статус у зависности од присуства некрозе у ткиву хуманог карцинома дојке. Репрезентативне микрофотографије показују одсуство некрозе у туморима са високом експресијом ER и PR насупротив ER и PR негативним туморима. Her2 позитивност је присутна у туморима без обзира да ли су микроскопском анализом уочена поља некрозе (оригинално увећање x100, референтна линија 200µm).



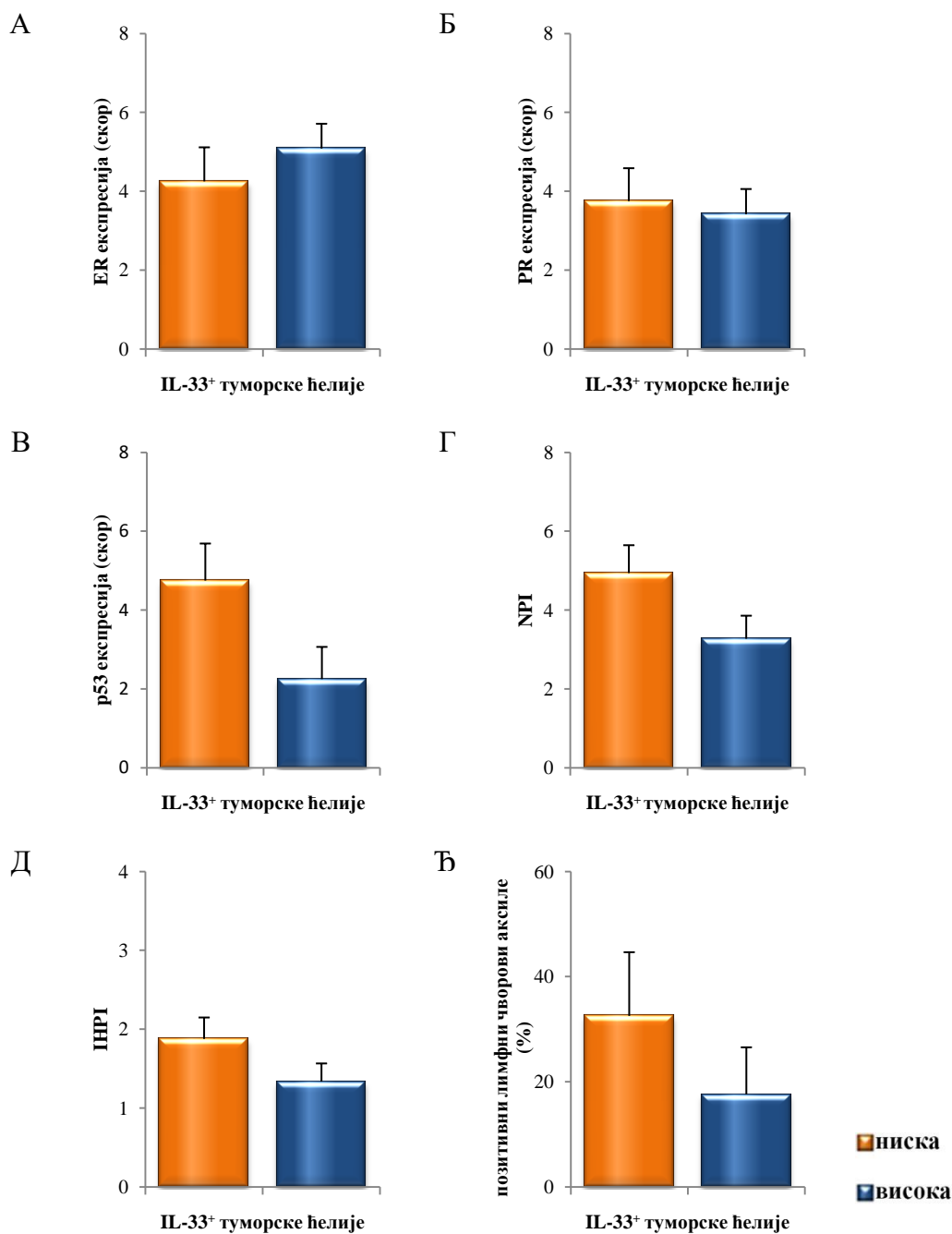
Слика 6 Експресија p53 у зависности од присуства некрозе у ткиву хуманог карцинома дојке. Репрезентативне микрофотографије показују високу експресију p53 у тумору у коме су уочена поља некрозе насупротив p53 негативном карциному дојке (оригинално увећање x200, референтна линија x100µm).

Експресија IL-33 у туморским ћелијама и клиничкопатолошки параметри

Пацијенте са тумором дојке класификовали смо у две групе на основу високе, односно ниске експресије IL-33 у туморским ћелијама. У овако формираним групама анализирали смо клиничко-патолошке параметре. Средња вредност скорa за експресију ER није статистички значајно измењена у групи карцинома са повећаном ($5,08 \pm 0,63$) у односу на карциноме са ниском експресијом IL-33 ($4,25 \pm 0,86$) (Mann Whitney-јев тест, $p > 0,05$) (Графикон 22А). Такође, разлика у средњој вредности скорa за експресију PR није статистички значајна између ове две групе ($3,42 \pm 0,64$ vs. $3,75 \pm 0,83$) (Mann Whitney-јев тест, $p > 0,05$) (Графикон 22Б). Као што се види у табели, анализом експресије Her2, нисмо утврдили статистички значајну разлику у процентуалној заступљености позитивних карцинома у зависности од степена експресије IL-33 у туморским ћелијама (χ^2 тест, $p > 0,05$) (Табела 3). У групи карцинома са ниском експресијом IL-33 средња вредност Allred скорa за p53 била је статистички значајно већа ($4,75 \pm 0,94$) у односу на карциноме са повећаном експресијом IL-33 у туморским ћелијама ($2,25 \pm 0,82$) (Mann Whitney-јев тест, $p = 0,007$) (Графикон 22В).

Статистички значајна, већа вредност, NPI је забележена у групи карцинома са ниском експресијом туморског IL-33 ($3,27 \pm 0,71$ vs. $4,94 \pm 0,71$) (Mann Whitney-јев тест, $p = 0,013$) (Графикон 22Г) док се вредност INPI није значајно разликовала између испитиваних група ($1,33 \pm 0,23$ vs. $1,87 \pm 0,27$) (Mann Whitney-јев тест, $p > 0,05$) (Графикон 22Д).

Повезаност експресије IL-33 са стандардним патохистолошким параметрима смо анализирали применом χ^2 и Mann Whitney-јевог теста и резултати су приказани у табели 3.



Графикон 22. Ниска експресија IL-33 у туморским ћелијама је повезана са високим вредностима експресије p53 и LNPI. А. Средње вредности скорова за експресију ER и **Б.** PR се не разликују између група карцинома са различитим степеном експресије IL-33 у туморским ћелијама ($p > 0,05$). **В.** Тумори са ниском експресијом IL-33 у туморским ћелијама показују статистички значајну већу средњу вредност скорa за експресију p53 ($p = 0,007$) и **Г.** NPI ($p = 0,013$) и **Д.** Не постоји значајна разлика у просечној вредности LNPI ($p = 0,005$) у односу на степен експресије IL-33 у туморским ћелијама. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

Експресија IL-33 у туморским ћелијама				
ВАРИЈАБЛА		НИСКА	ВИСОКА	p
Her2	<i>Негативни</i>	12 (37,5%)	20 (62,5%)	0,809*
	<i>Позитивни</i>	4 (50,0%)	4 (50,0%)	
Хистолошки градус	<i>I+II</i>	6 (25,0%)	18 (75,0%)	0,041*
	<i>III</i>	10 (62,5%)	6 (37,5%)	
Нуклеарни градус	<i>I+II</i>	6 (26,1%)	17 (73,9%)	0,078*
	<i>III</i>	10 (58,8%)	7 (41,2%)	
Митотски индекс	<i>I+II</i>	12 (33,3%)	24 (67,7%)	0,041*
	<i>III</i>	4 (100%)	0 (0%)	
Инвазија крвних судова	<i>Негативни</i>	8 (30,8%)	18 (69,2%)	0,199*
	<i>Позитивни</i>	8 (57,1%)	6 (42,9%)	
Инвазија лимфних судова	<i>Негативни</i>	6 (37,5%)	10 (62,5%)	0,792*
	<i>Позитивни</i>	10 (41,7%)	14 (58,3%)	
Перинеурална инвазија	<i>Негативни</i>	0 (0%)	6 (100%)	0,086*
	<i>Позитивни</i>	16 (47,1%)	18 (52,9%)	
СМР	<i>I+II</i>	12 (35,3%)	22 (64,7%)	0,320*
	<i>III</i>	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
Статус аксиларних лимфних нодуса	<i>Негативни</i>	4 (20,0%)	16 (80,0%)	0,024*
	<i>Позитивни</i>	12 (60,0%)	8 (40,0%)	
Процент позитивних аксиларних лимфних нодуса		32,50 ± 12,12	17,58 ± 8,94	0,051**
<i>χ² тест*</i>				
<i>Mann Whitney-јев тест**</i>				

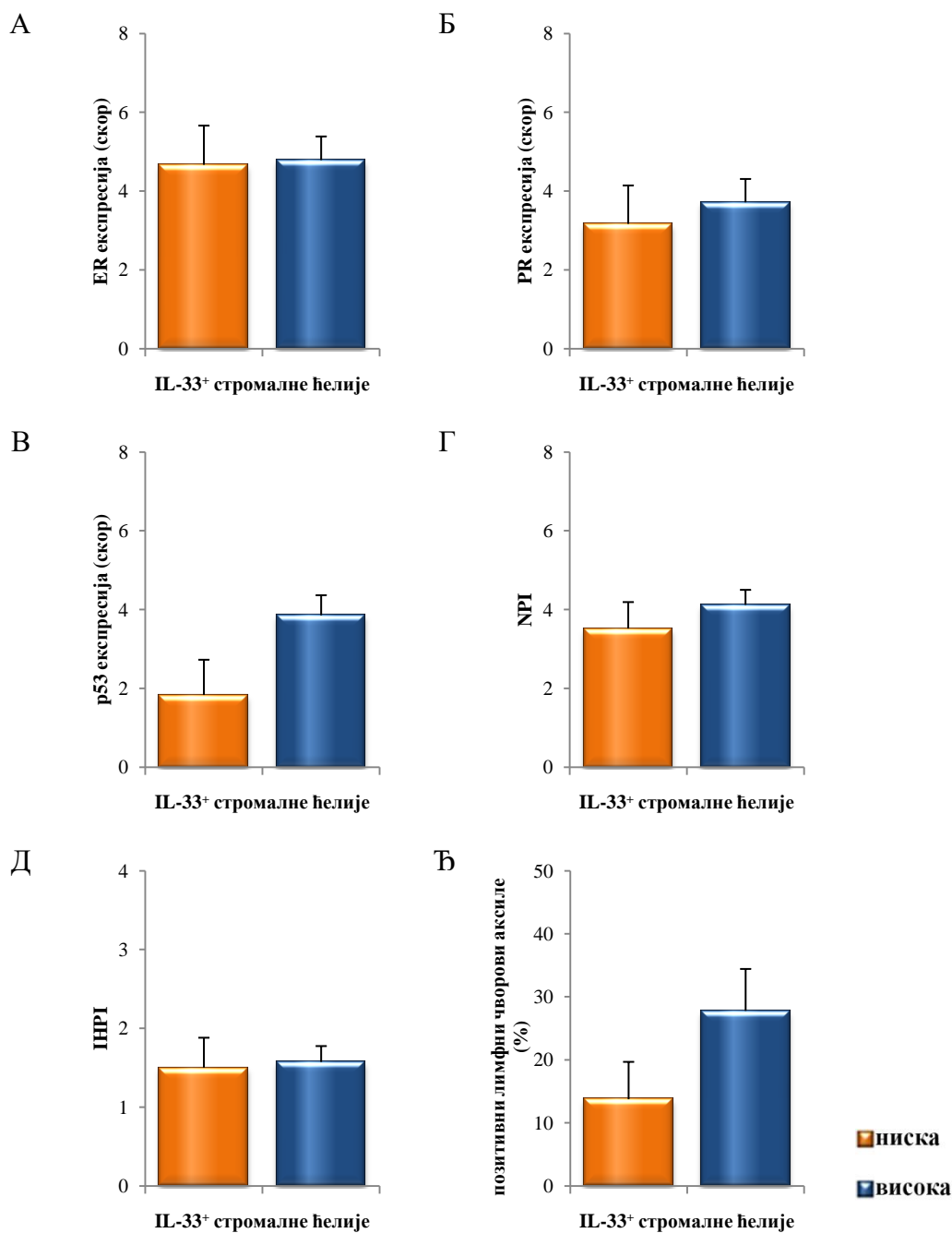
Табела 3. Однос експресије IL-33 у туморским ћелијама хуманог карцинома дојке са стандардним клиничкопатолошким параметрима. Студија обухвата 40 пацијенткиња са инвазивним дукталним карциномом дојке које су категорисане у групу са ниском (n=16) и високом експресијом (n=24) IL-33 у туморским ћелијама. Статистичка значајност је тестирана χ^2 и Mann Whitney-јевим тестом.

Експресија IL-33 у стромалним ћелијама и клиничкопатолошки параметри

Средње вредности скорова за експресију ER нису се статистички значајно разликовале између група са ниском ($4,66 \pm 0,99$) и повећаном експресијом стромалног IL-33 ($4,78 \pm 0,60$) (Mann Whitney-јев тест, $p > 0,05$) (Графикон 23А). Такође, разлика у средњој вредности скорова за експресију PR, иако већа у групи карцинома са високом експресијом IL-33, није се статистички значајно разликовала између ове две групе ($3,17 \pm 0,97$ vs. $3,71 \pm 0,59$) (Mann Whitney-јев тест, $p > 0,05$) (Графикон 23Б). Анализом експресије Her2, нисмо утврдили разлику у процентуалној заступљености позитивних карцинома у зависности од степена експресије IL-33 у стромалним ћелијама (χ^2 тест, $p > 0,05$) (Табела 4). У групи карцинома са високом експресијом IL-33 средња вредност Allred скорова за p53 била је статистички значајно већа ($3,86 \pm 0,51$) у односу на карциноме са ниском експресијом IL-33 у стромалним ћелијама ($1,83 \pm 0,89$) (Mann Whitney-јев тест, $p = 0,037$) (Графикон 23В).

Поређењем средњих вредности NPI нисмо забележили статистички значајну разлику између испитиваних група карцинома ($3,52 \pm 0,67$ vs. $4,12 \pm 0,38$) (Mann Whitney-јев тест, $p > 0,05$) (Графикон 23Г). Такође, средње вредности INPI се нису разликовале између група са ниском ($1,50 \pm 0,38$) и високом стромалном експресијом IL-33 ($1,57 \pm 0,20$) (Mann Whitney-јев тест, $p > 0,05$) (Графикон 23Д).

Повезаност експресије IL-33 у стромалним ћелијама са стандардним патохистолошким параметрима смо анализирали применом χ^2 и Mann Whitney-јевог теста и резултати су приказани у табели 4.



Графикон 23. Висока експресија IL-33 у ћелијама строме је повезана са високим вредностима експресије p53. А. Средње вредности скорова за експресију ER и Б. PR се не разликују између група карцинома са различитим степеном експресије IL-33 у ћелијама строме ($p > 0,05$). В. Тумори са високом експресијом IL-33 у ћелијама строме показују статистички значајну већу средњу вредност скорa за експресију p53 ($p = 0,037$). Г. Средње вредности за NPI и Д. INPI се не разликују у односу на степен експресије IL-33 у ћелијама строме ($p > 0,05$). Резултати су приказани као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

Експресија IL-33 у ћелијама строме				
ВАРИЈАБЛА		НИСКА	ВИСОКА	p
Her2	<i>Негативни</i>	8 (25,0%)	24 (75,0%)	0,343
	<i>Позитивни</i>	4 (50,0%)	4 (50,0%)	
Хистолошки градус	<i>I+II</i>	8 (33,3%)	16 (66,7%)	0,833
	<i>III</i>	4 (25,0%)	12 (75,0%)	
Нуклеарни градус	<i>I+II</i>	8 (34,8%)	15 (65,2%)	0,675
	<i>III</i>	4 (23,5%)	13 (76,5%)	
Митотски индекс	<i>I+II</i>	12 (33,3%)	24 (67,7%)	0,421
	<i>III</i>	0 (0%)	4 (100%)	
Инвазија крвних судова	<i>Негативни</i>	8 (30,8%)	18 (69,2%)	0,885
	<i>Позитивни</i>	4 (28,6%)	10 (71,4%)	
Инвазија лимфних судова	<i>Негативни</i>	4 (25,0%)	12 (75,0%)	0,833
	<i>Позитивни</i>	8 (33,3%)	16 (66,7%)	
Перинеурална инвазија	<i>Негативни</i>	4 (66,7%)	2 (33,3%)	0,100
	<i>Позитивни</i>	8 (23,5%)	26 (76,5%)	
СМР	<i>I+II</i>	12 (35,3%)	22 (64,7%)	0,209
	<i>III</i>	0 (0%)	6 (100%)	
Статус аксиларних лимфних нодуса	<i>Негативни</i>	8 (40,0%)	12 (60,0%)	0,301
	<i>Позитивни</i>	4 (20,0%)	16 (80,0%)	
Процент позитивних аксиларних лимфних нодуса		13,73 ± 5,93	27,76 ± 6,65	0,256
<i>χ² тест*</i>				
<i>Mann Whitney-јев тест**</i>				

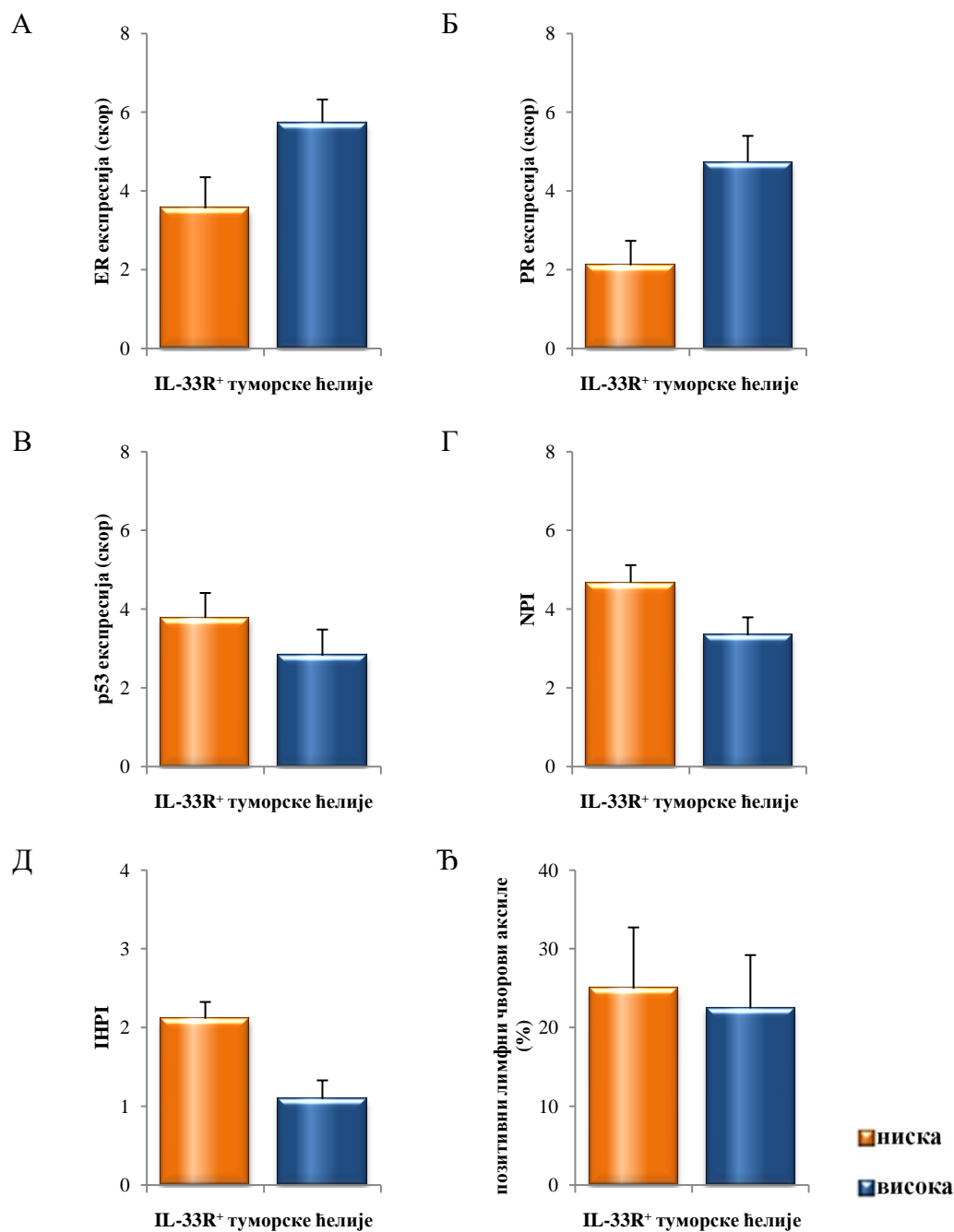
Табела 4. Однос експресије IL-33 у ћелијама строме хуманог карцинома дојке са стандардним клиничкопатолошким параметрима. Студија обухвата 40 пацијенткиња са инвазивним дукталним карциномом дојке које су категорисане у групу са ниском (n=12) и високом експресијом (n=28) IL-33 у ћелијама строме. Статистичка значајност је тестирана χ^2 и Mann Whitney-јевим тестом.

Експресија IL-33R у туморским ћелијама и клиничкопатолошки параметри

ER значајно је већа у групи карцинома са повећаном ($5,72 \pm 0,60$) у односу на карциноме са ниском експресијом IL-33R у туморским ћелијама ($3,56 \pm 0,79$) (Mann Whitney-јев тест, $p=0,014$) (Графикон 24А). Такође, експресија PR је значајно већа у групи карцинома са високом експресијом туморског IL-33R ($2,11 \pm 0,62$ vs. $4,73 \pm 0,67$) (Mann Whitney-јев тест, $p=0,006$) (Графикон 24Б). Као што се види у табели 5, анализом експресије Her2, нисмо утврдили статистички значајну разлику у процентуалној заступљености позитивних карцинома у зависности од степена експресије IL-33R (χ^2 тест, $p>0,05$). У групи карцинома са ниском експресијом IL-33R у туморским ћелијама, средња вредност Allred скорa за p53 није била статистички значајно већа ($3,77 \pm 0,63$) у односу на карциноме са повећаном експресијом IL-33R у туморским ћелијама ($2,82 \pm 0,66$) (Mann Whitney-јев тест, $p>0,05$) (Графикон 24В).

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

Повезаност експресије IL-33R у туморским ћелијама, са стандардним патохистолошким параметрима, смо анализирали применом χ^2 и Mann Whitney-јевог теста и резултати су приказани у табели 5.



Графикон 24. Висока експресија IL-33R у туморским ћелијама је повезана са високом експресијом ER и PR и ниским вредностима NPI и IHP1. А. Средње вредности скорова за експресију ER и **Б.** PR су значајно веће у групи карцинома са високом експресијом IL-33R у туморским ћелијама ($p=0,014$, $p=0,006$). **В.** Не постоји разлика у експресији p53 у односу на степен експресије IL-33R у туморским ћелијама ($p>0,05$). **Г.** Средње вредности за NPI и **Д.** IHP1 се значајно разликују у односу на степен експресије IL-33 у туморским ћелијама и веће су у групи тумора са ниском експресијом ($p=0,019$, $p=0,004$). Резултати су приказани као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

Експресија IL-33R у туморским ћелијама				
ВАРИЈАБЛА		НИСКА	ВИСОКА	p
Her2	<i>Негативни</i>	12 (37,5%)	20 (62,5%)	0,131
	<i>Позитивни</i>	6 (75,0%)	2 (25,0%)	
Хистолошки градус	<i>I+II</i>	6 (25,0%)	18 (75,0%)	0,005
	<i>III</i>	12 (75,0%)	4 (25,0%)	
Нуклеарни градус	<i>I+II</i>	5 (21,7%)	18 (78,3%)	0,002
	<i>III</i>	13 (76,5%)	4 (23,5%)	
Митотски индекс	<i>I+II</i>	16 (44,4%)	20 (55,6%)	0,832
	<i>III</i>	2 (50,0%)	2 (50,0%)	
Инвазија крвних судова	<i>Негативни</i>	12 (46,2%)	14 (53,8%)	0,842
	<i>Позитивни</i>	6 (42,9%)	8 (57,1%)	
Инвазија лимфних судова	<i>Негативни</i>	6 (37,5)	10 (62,5%)	0,650
	<i>Позитивни</i>	12 (50,0%)	12 (50,0%)	
Перинеурална инвазија	<i>Негативни</i>	0 (0%)	6 (100%)	0,050
	<i>Позитивни</i>	18 (52,9%)	6 (47,1%)	
СМР	<i>I+II</i>	16 (47,1%)	18 (52,9%)	0,859
	<i>III</i>	2 (33,3%)	4 (66,7%)	
Статус аксиларних лимфних нодуса	<i>Негативни</i>	8 (40,0%)	12 (60,0%)	0,751
	<i>Позитивни</i>	10 (50,0%)	10 (50,0%)	
Процент позитивних аксиларних лимфних нодуса		24,93 ± 7,77	22,42 ± 6,77	0,727
<i>χ² тест*</i>				
<i>Mann Whitney-јев тест**</i>				

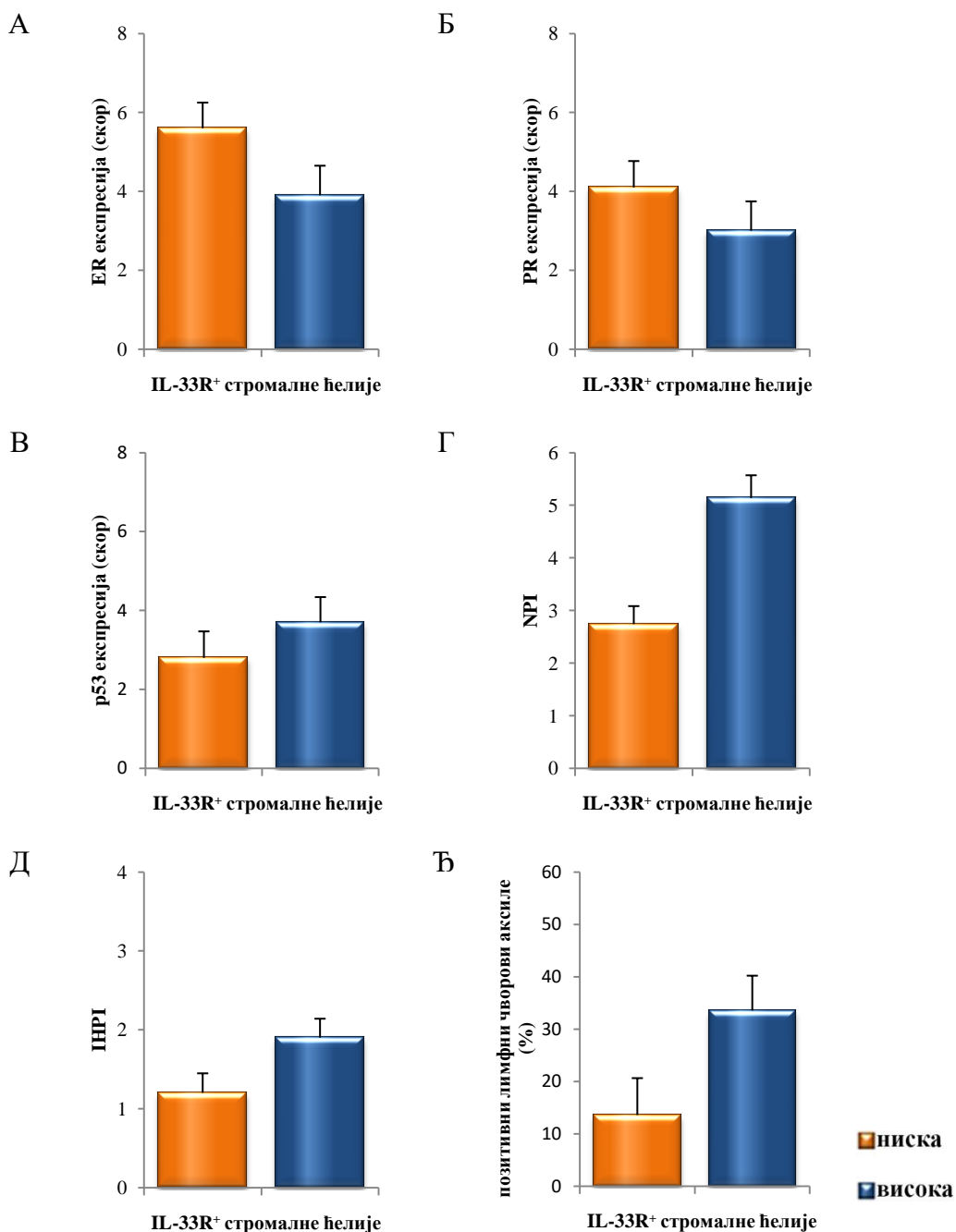
Табела 5. Однос експресије IL-33R у туморским ћелијама хуманог карцинома дојке са стандардним клиничкопатолошким параметрима. Студија обухвата 40 пацијенткиња са инвазивним дукталним карциномом дојке које су категорисане у групу са ниском (n=18) и високом експресијом (n=22) IL-33R у туморским ћелијама. Статистичка значајност је тестирана χ^2 и Mann Whitney-јевим тестом.

Експресија IL-33R у стромалним ћелијама и клиничкопатолошки параметри

Експресија ER је била статистички значајно већа у групи карцинома са ниском ($5,6 \pm 3,9$) у односу на карциноме са високом експресијом IL-33R у ћелијама строме ($3,9 \pm 0,75$) (Mann Whitney-јев тест, $p=0,047$) (Графикон 25А). Разлика у средњој вредности скова за експресију PR није се статистички значајно разликовала између ове две групе ($3,0 \pm 0,75$ vs. $4,1 \pm 0,67$) (Mann Whitney-јев тест, $p>0,05$) (Графикон 25Б). Као што се види у табели 6, анализом експресије Her2, нисмо утврдили статистички значајну разлику у процентуалној заступљености позитивних карцинома, у зависности од степена експресије IL-33R у стромалним ћелијама (χ^2 тест, $p>0,05$). Средња вредност Allred скова за p53 није се значајно разликовала између карцинома са ниском ($2,8 \pm 0,67$) и високом експресијом IL-33R у стромалним ћелијама ($3,7 \pm 0,64$) (Mann Whitney-јев тест, $p>0,05$) (Графикон 25В).

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

Повезаност експресије IL-33R у ћелијама строме са стандардним патохистолошким параметрима смо анализирали применом χ^2 и Mann Whitney-јевог теста и резултати су приказани у табели 6.



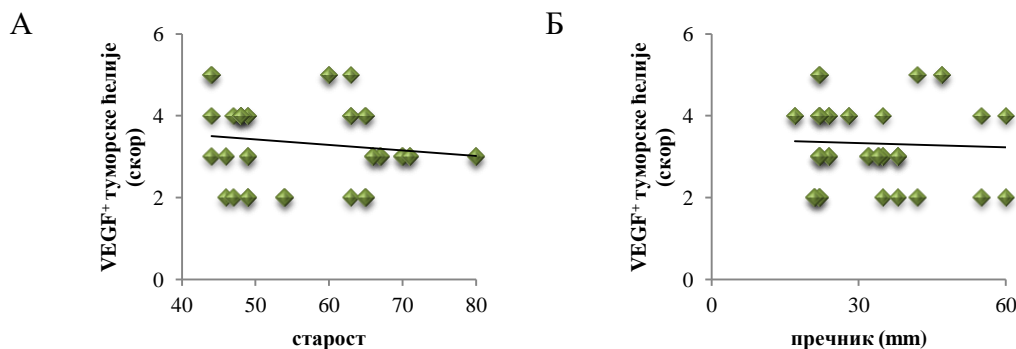
Графикон 25. Експресија IL-33R у ћелијама строме је повезана са високом експресијом ER, NPI и ИНPI. **А.** Средња вредност скора за експресију ER је статистички значајно већа у групи карцинома са ниском експресијом IL-33R у ћелијама строме ($p=0,047$) **Б.** Експресија PR и **В.** p53 се статистички значајно не разликује у односу на степен експресије IL-33R ($p>0,05$). **Г.** Средње вредности за NPI и **Д.** ИНPI се значајно разликују у односу на степен експресије IL-33R у ћелијама строме и веће су у групи тумора са високом експресијом ($p<0,0001$, $p=0,048$). Резултати су приказани као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

Експресија IL-33R у ћелијама строме				
ВАРИЈАБЛА		НИСКА	ВИСОКА	p
Her2	<i>Негативни</i>	18 (56,3%)	14 (43,8%)	0,236*
	<i>Позитивни</i>	2 (25,0%)	6 (75,0%)	
Хистолошки градус	<i>I+II</i>	16 (66,7%)	8 (33,3%)	0,024*
	<i>III</i>	4 (25,0%)	12 (75,0%)	
Нуклеарни градус	<i>I+II</i>	15 (65,2%)	8 (34,8%)	0,055*
	<i>III</i>	5 (29,4%)	12 (70,6%)	
Митотски индекс	<i>I+II</i>	20 (55,6%)	16 (44,4)	0,114*
	<i>III</i>	0 (0%)	4 (100%)	
Инвазија крвних судова	<i>Негативни</i>	16 (61,5%)	10 (38,5%)	0,097*
	<i>Позитивни</i>	4 (28,6%)	10 (71,4%)	
Инвазија лимфних судова	<i>Негативни</i>	12 (75,0%)	4 (25,0%)	0,024*
	<i>Позитивни</i>	8 (33,3%)	16 (66,7%)	
Перинеурална инвазија	<i>Негативни</i>	6 (100%)	0 (0%)	0,027*
	<i>Позитивни</i>	14 (41,2%)	20 (58,8%)	
СМР	<i>I+II</i>	20 (58,8%)	14 (41,2%)	0,027*
	<i>III</i>	0 (0%)	6 (100%)	
Статус аксиларних лимфних нодуса	<i>Негативни</i>	16 (80,0%)	4 (20,0%)	0,001*
	<i>Позитивни</i>	4 (20,0%)	16 (80,0%)	
Процент позитивних аксиларних лимфних нодуса		13,57 ± 7,05	33,53 ± 6,66	0,002**
<i>χ² тест*</i>				
<i>Mann Whitney-јев тест**</i>				

Табела 6. Однос експресије IL-33R у ћелијама строме хуманог карцинома дојке са стандардним клиничкопатолошким параметрима. Студија обухвата 40 пацијенткиња са инвазивним дукталним карциномом дојке које су категорисане у групу са ниском (n=20) и високом експресијом (n=20) IL-33R у ћелијама строме. Статистичка значајност је тестирана χ^2 и *Mann Whitney*-јевим тестом.

Експресија VEGF-а у туморским ћелијама и клиничкопатолошки параметри

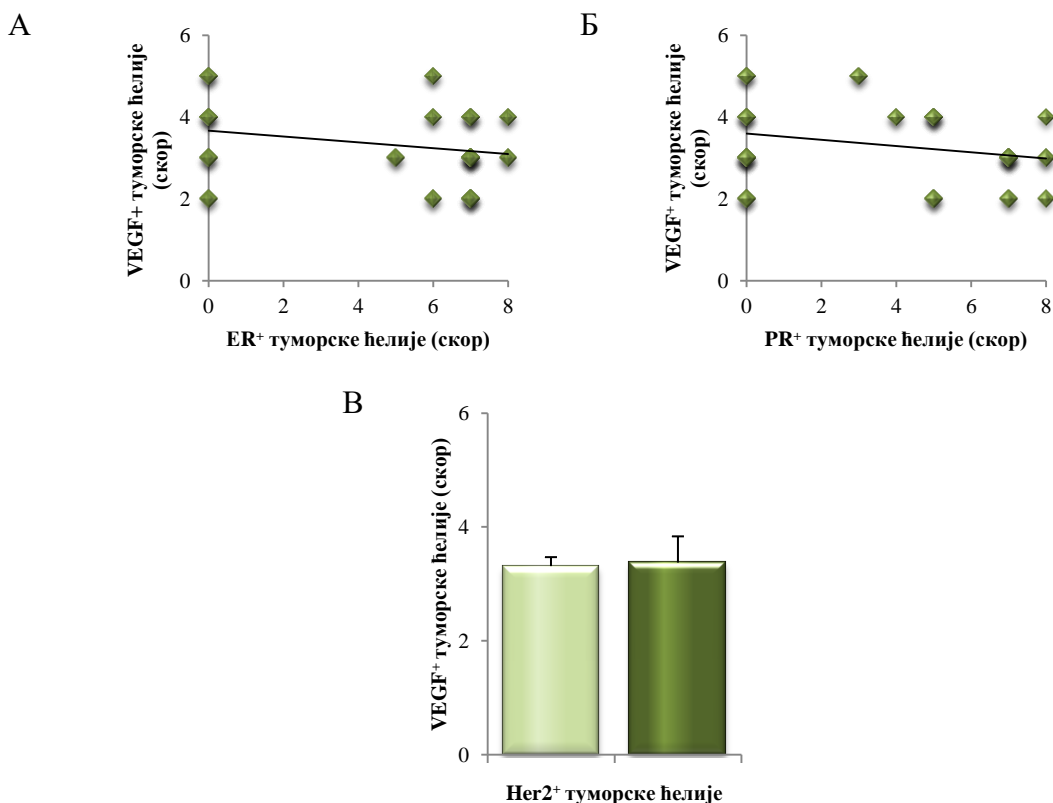
У следећем кораку анализирали смо однос експресије VEGF-а са стандардним имунохистохемијским и клиничкопатолошким параметрима. Експресија VEGF-а није показала значајну корелацију са старосном доби пацијенткиња оперисаних од карцинома дојке ($r=-0,227$; $p=0,158$) (Графикон 26А) као и са највећим пречником тумора ($r=-0,031$; $p=0,847$) (Графикон 26Б).



Графикон 26. Експресија VEGF-а није повезана са старосном доби и највећим пречником тумора. А. Не постоји статистички значајна корелација између експресија VEGF-а са годинама старости пацијенткиња оперисаних од инвазивног дукталног карцинома дојке ($r=-0,227$; $p=0,158$) и **Б.** са највећим пречником тумора ($r=-0,031$; $p=0,847$). Статистичка значајност је анализирана применом Spearman-овог коефицијента корелације.

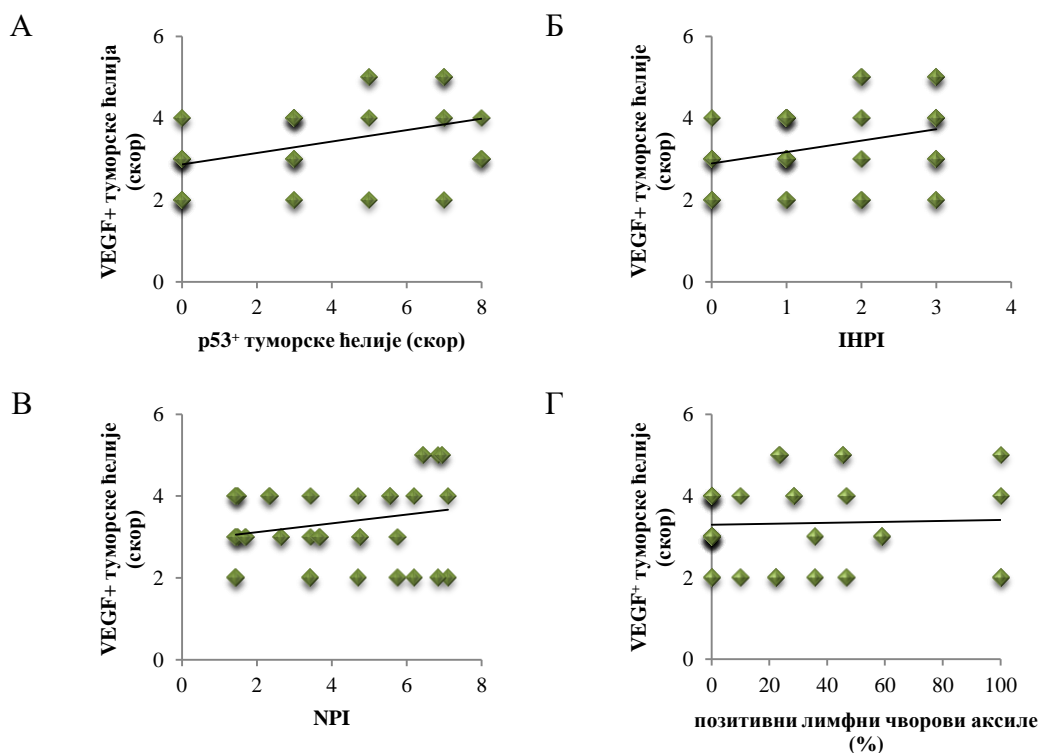
Израчунавањем Spearman-овог коефицијента корелације нисмо утврдили статистички значајну корелацију између скорова за експресију VEGF-а и ER ($r=-0,211$; $p=0,192$) (Графикон 27А). Аналогно овом резултату не постоји значајна корелација између VEGF-а и PR ($r=-0,259$; $p=0,107$) (Графикон 27Б). Све карциноме дојке смо даље класификовали у Her2 позитивне ($n=8$) и негативне ($n=32$). Није забележена значајна разлика у експресији VEGF-а у зависности од Her2 позитивности. Код Her2 позитивних тумора средња

вредност скова је износила $3,37 \pm 0,46$ у односу на Her2 негативну групу тумора где је била $3,31 \pm 0,16$ ($p=0,934$) (Графикон 27В).



Графикон 27. Експресија VEGF-а није повезана са експресијом ER, PR и Her2 у ћелијама карцинома дојке. **А.** Не постоји статистички значајна корелација између експресије VEGF-а са експресијом ER ($r=-0,211$; $p=0,192$) и **Б.** PR у ћелијама хуманог карцинома дојке ($r=-0,259$; $p=0,107$). Статистичка значајност је анализирана применом Spearman-овог коефицијента корелације. **В.** Средња вредност скова за експресију VEGF-а није статистички значајно већа у групи Her2 позитивних карцинома дојке ($p=0,934$). Резултат је приказан као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

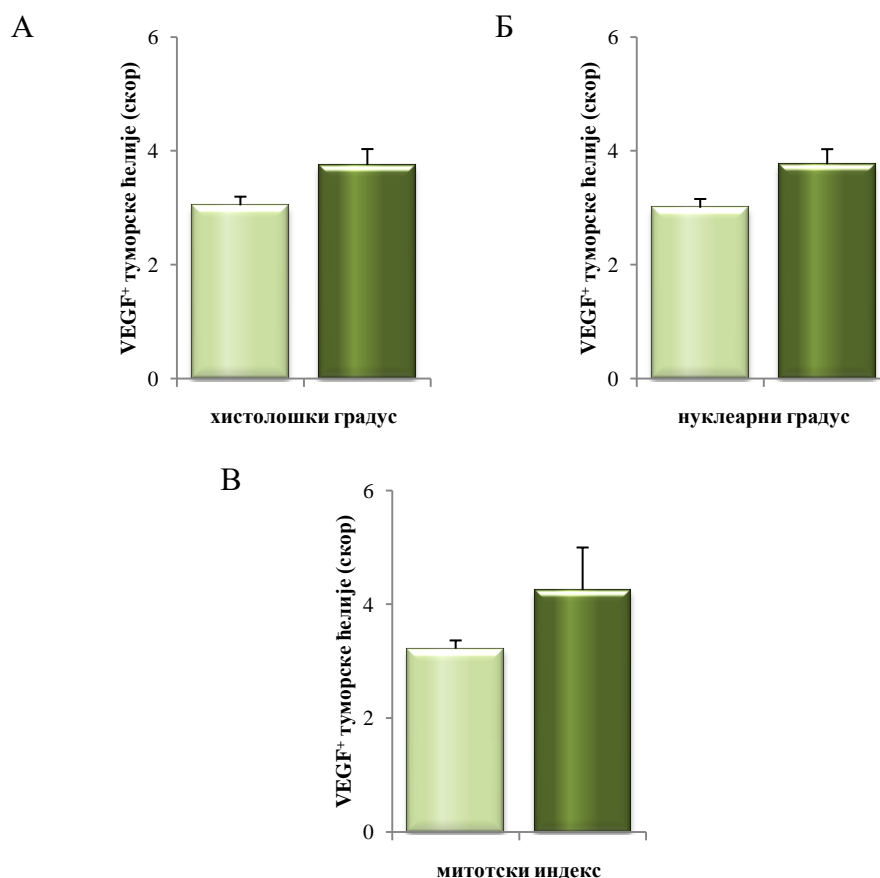
У нашој студији, даљом анализом смо утврдили статистички значајну корелацију између експресије VEGF-а са експресијом p53 у туморским ћелијама ($r=0,413$; $p=0,008$) (Графикон 28А) и ИНП1 ($r=0,315$; $p=0,048$) (Графикон 28Б), док је изостала са NPI ($r=0,212$; $p=0,189$) (Графикон 28В) и процентом метастаски измењених лимфних нодуса аксиле ($r=0,753$; $p=0,051$) (Графикон 28Г).



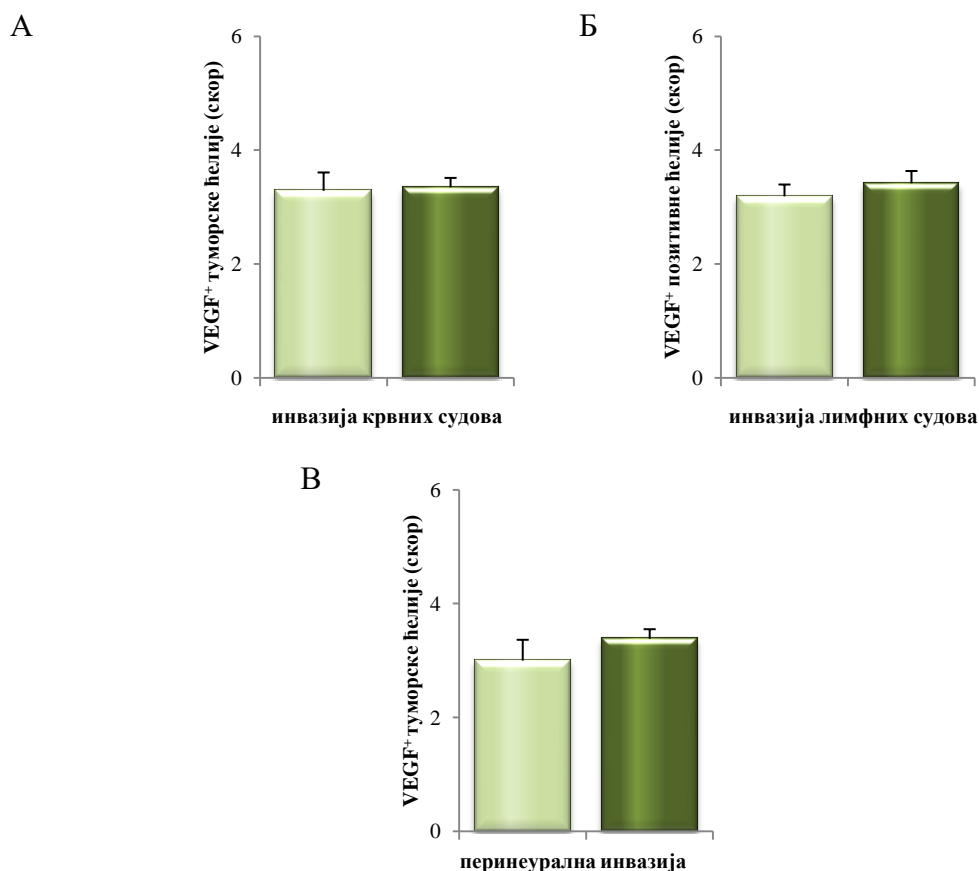
Графикон 28. Експресија VEGF-а позитивно корелира са експресијом p53 протеина као и вредностима IPI. **А.** Постоји позитивна корелација између скорова за VEGF и p53 протеин у туморским ћелијама ($r=0,413$; $p=0,008$). **Б.** Експресија VEGF-а у туморским ћелијама корелира са вредностима IPI ($r=0,315$; $p=0,048$). **В.** Не постоји статистички значајна корелација између експресије VEGF-а и NPI ($r=0,212$; $p=0,189$). **Г.** Процент позитивних лимфних чворова аксиле није у статистички значајној корелацији са експресијом VEGF-а ($r=0,753$; $p=0,051$). Статистичка значајност је анализирана применом Spearman-овог коефицијента корелације.

Све карциноме дојке смо затим груписали на основу хистолошког градуса у групу карцинома са добром и средњом диференцијацијом ($n=24$) и на групу слабо диферентованих тумора ($n=16$). Утврдили смо значајну разлику између средњих вредности скорова за експресију VEGF-а у туморским ћелијама између испитиваних група. Експресија VEGF-а је значајно већа у групи слабо диферентованих тумора ($3,75\pm 0,28$) у односу на групу добро и средње диферентованих карцинома дојке ($3,04\pm 0,15$) ($p=0,041$) (Графикон 29А). На основу нуклеарног градуса тумори су класификовани на исти начин у две групе: групу карцинома са градусом I и II ($n=23$) и групу са градусом III ($n=17$). Експресија VEGF-а је значајно већа у групи тумора са нуклеарним градусом III ($3,76\pm 0,26$) у односу на групу са нуклеарним градусом I и II

($3,01 \pm 0,15$) ($p=0,022$) (Графикон 29Б). На основу митотског индекса карциноми дојке су подељени на две групе: групу са митотским индексом I и II ($n=33$) и групу са митотским индексом III ($n=7$). Између ове две групе не постоји статистички значајна разлика у експресији VEGF-а у туморским ћелијама. Тумори са митотским индексом III ($4,25 \pm 0,75$) нису показали значајно већу експресију VEGF-а у туморским ћелијама у односу на туморе са митотским индексом I и II ($3,22 \pm 0,14$) ($p=0,101$) (Графикон 29В).



Графикон 29. Степен диференцијације туморског ткива као и нуклеарне атипичности утиче на експресију VEGF-а у ћелијама карцинома дојке. А. Слабо диферентовани карциноми дојке показују јачу експресију VEGF-а у односу на добро и средње диферентоване туморе ($p=0,041$). **Б.** Карциноми дојке са великом ћелијском атипичношћу показују јачу експресију VEGF-а у односу на туморе саграђене од ћелија ниске и умерене целуларне атипичности ($p=0,022$). **В.** Експресија VEGF-а се не разликује у зависности од митотског индекса у туморском ткиву ($p=0,101$). Резултат је приказан као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

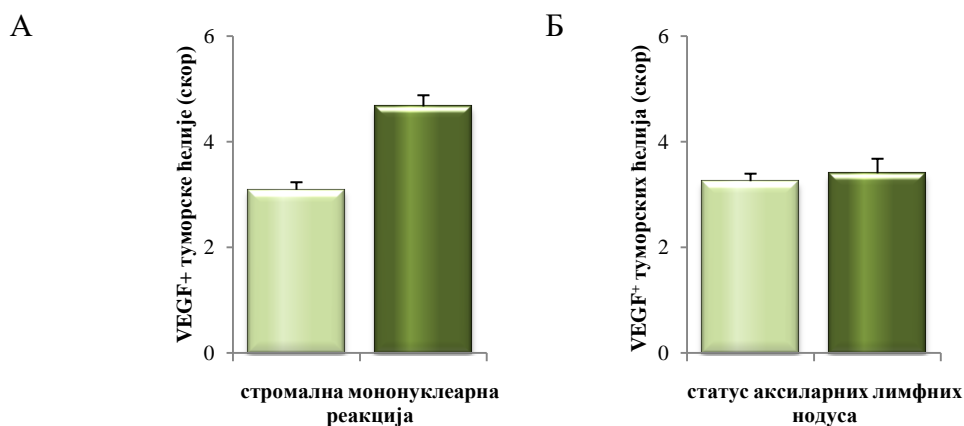


Графикон 30. Експресија VEGF-а у туморским ћелијама не зависи од инвазије крвних судова, лимфних судова и перинеуралне инвазије. А. Не постоји статистички значајна разлика у средњим вредностима скорова за VEGF у зависности од инвазије крвних (p=0,790), Б. лимфних (p=0,613) и од В. перинеуралне инвазије у ткиву карцинома дојке (p=0,447). Резултат је приказан као аритметичка средина ± SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

У следећем кораку анализирали смо разлику у експресији VEGF-а у односу на присуство инвазије крвних и лимфних судова у туморском ткиву. У првом кораку све туморе смо поделили на групу у којој су микроскопском анализом HE бојених ткивних пресека карцинома утврђени елементи инвазије крвних судова (n=14) и групу без инвазије (n=26). Између ове две групе није утврђена значајна разлика у VEGF скору иако је била већа у групи са присутном инвазијом (3,35±0,17) у односу на групу где инвазија није верификована (3,28±0,32) (p=0,790) (Графикон 30А). У наредном кораку и у зависности од инвазије лимфних судова тумори су категорисани на групу са (n=24) и без инвазије

лимфних судова (n=16). Као и код инвазије крвих судова, тумори са инвазијом ($3,42 \pm 0,22$) лимфних судова имали су већу вредност експресије VEGF-а у односу на групу без инвазије ($3,19 \pm 0,21$) иако разлика није статистички значајна ($p=0,613$) (Графикон 30Б). На исти начин тумори су груписани на групу са (n=34) и без перинеуралне инвазије (n=6). Не постоји разлика у експресији VEGF-а између групе са ($3,04 \pm 0,36$) и без перинеуралне инвазије ($3,38 \pm 0,17$) ($p=0,447$) (Графикон 30В).

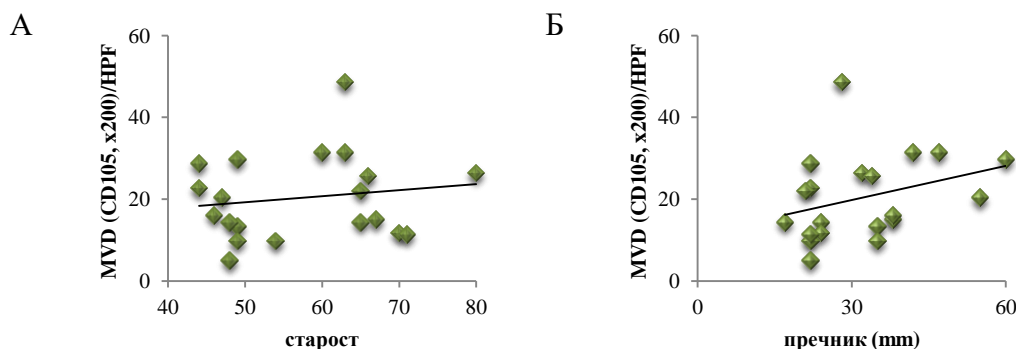
Стромална мононуклеарна реакција у ткиву карцинома дојке је оцењивана као слаба, умерена и јака. Тумори су слабом и умереном стромалном мононуклеарно реакцијом су анализирани као прва (n=34), док су тумори са јако израженом реакцијом груписани у другу групу тумора (n=6). Тумори са јаком реакцијом имали су у просеку већу вредност VEGF скорa ($4,67 \pm 0,21$) у односу на туморе са слабом и умереном стромалном мононуклеарном реакцијом ($3,09 \pm 0,14$). Разлика је статистички значајна ($p=0,001$) (Графикон 31А). На крају предили смо вредности експресије VEGF-а у зависности од статуса лимфних чворова аксиле. Пацијенти су подељени на групе са негативним (n=20) и позитивним лимфним чворовима аксиле (n=20). Нисмо утврдили разлику у експресији VEGF-а између групе пацијената са негативним и позитивним лимфним чворовима аксиле ($3,25 \pm 0,14$ vs. $3,4 \pm 0,27$) ($p=0,758$) (Графикон 31Б).



Графикон 31. Експресија VEGF-а зависи од степена стромалне мононуклеарне реакције. А. Постоји статистички значајна разлика у средњим вредностима скорова за VEGF у зависности од степена стромалне мононуклеарне реакције. Тумори са јаком стромалном реакцијом показују већу експресију у односу на туморе са слабо и умерено израженом стромалном мононуклеарном реакцијом ($p=0,001$). **Б.** Експресија VEGF-а се не разликује у зависности од статуса лимфних чворова аксиле ($p=0,758$). Резултат је приказан као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

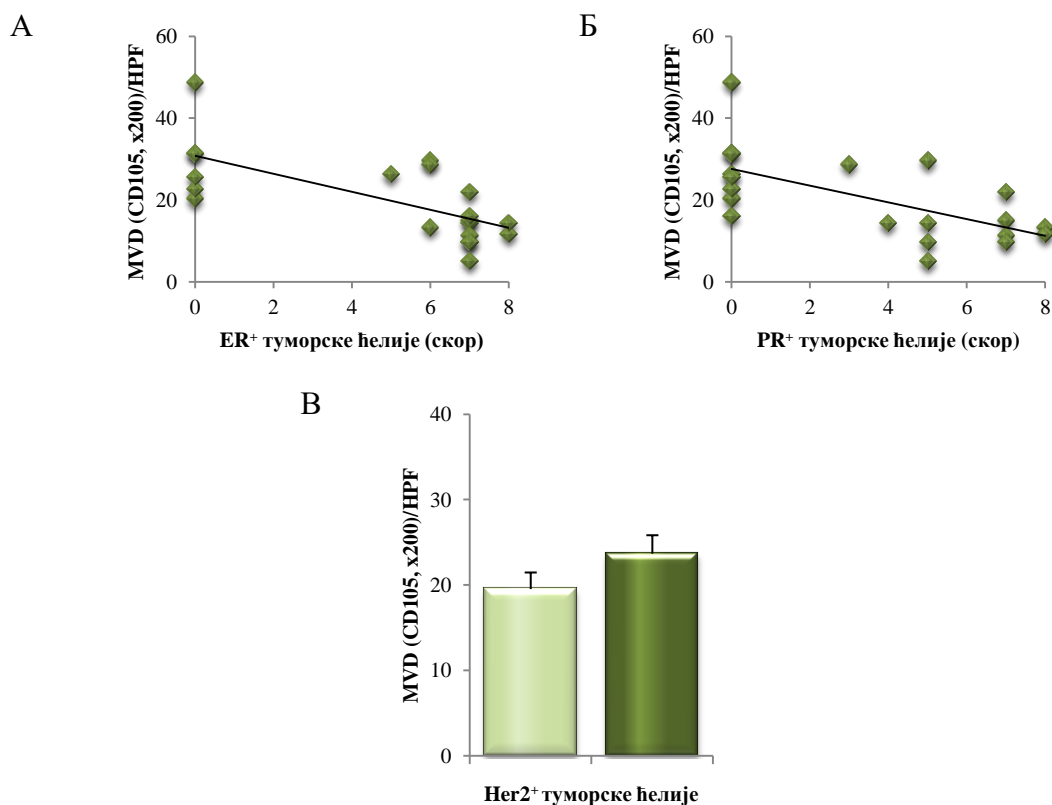
MVD и клиничкопатолошки параметри

Анализа повезаности између MVD у туморском ткиву и старости пацијенткиња оперисаних од карцинома дојке није показала значајну корелацију ($r=-0,002$; $p=0,991$) (Графикон 32А) док је статистички значајна корелација утврђена са највећим пречником тумора ($r=0,386$; $p=0,014$) (Графикон 32Б).

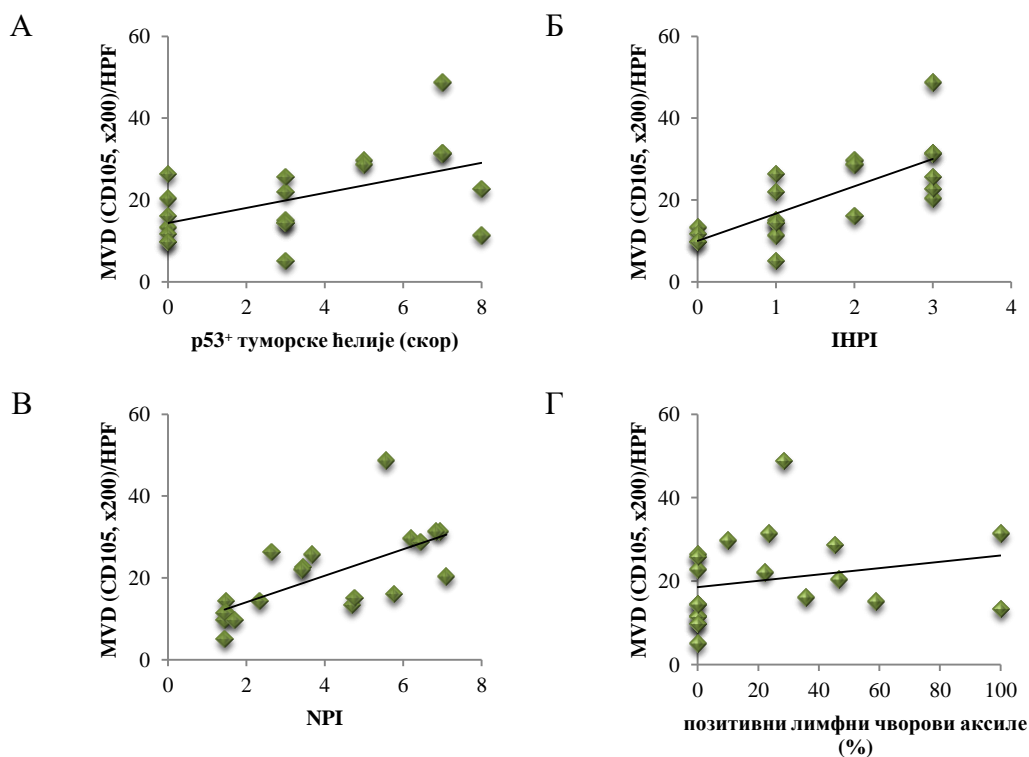


Графикон 32. MVD је повезана са највећим пречником тумора. А. Не постоји статистички значајна корелација између MVD са годинама старости пацијенткиња оперисаних од инвазивног дукталног карцинома дојке ($r=-0,002$; $p=0,991$) и **Б.** Пречник тумора је у позитивној корелацији са MVD ($r=0,386$; $p=0,014$). Статистичка значајност је анализирана применом Spearman-овог коефицијента корелације.

Израчунавањем Spearman-овог коефицијента корелације утврдили смо статистички значајни, јаку, негативну корелацију између MVD и скорa за експресију ER ($r=-0,742$; $p<0,0001$) (Графикон 33А). Аналогно овом резултату постоји и значајна јака негативна корелација између MVD и PR ($r=-0,671$; $p<0,0001$) (Графикон 33Б). Све карциноме дојке смо даље класификовали у Her2 позитивне ($n=8$) и негативне ($n=32$). Није забележена значајна разлика у MVD у зависности од Her2 позитивности. Код Her2 позитивних тумора средња вредност MVD је износила $23,67 \pm 2,16$ у односу на Her2 негативну групу тумора где је била $19,52 \pm 1,94$ ($p=0,109$) (Графикон 33В).



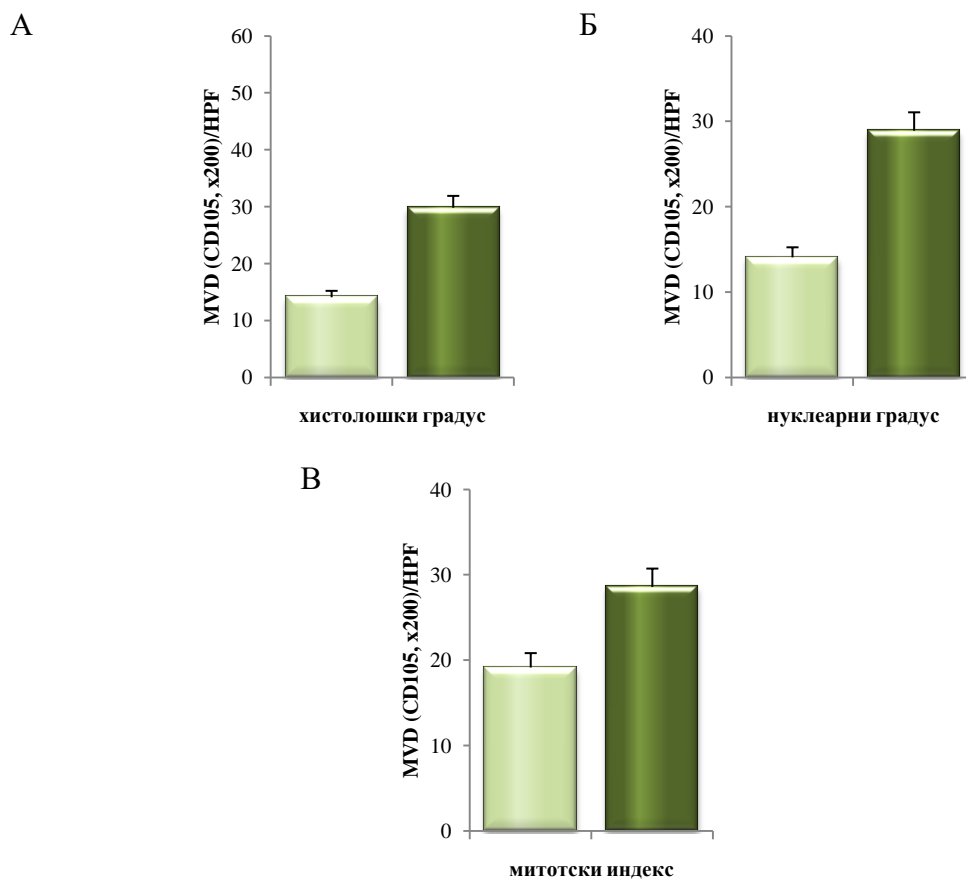
У нашој студији, даљом анализом смо утврдили статистички значајну корелацију између МВД са експресијом p53 у туморским ћелијама ($r=0,496$; $p=0,001$) (Графикон 34А), ИНРИ ($r=0,791$; $p<0,0001$) (Графикон 34Б), NPI ($r=0,774$; $p<0,0001$) (Графикон 34В) и процентом метастаски измењених лимфних нодуса аксиле ($r=0,443$; $p=0,004$) (Графикон 34Г).



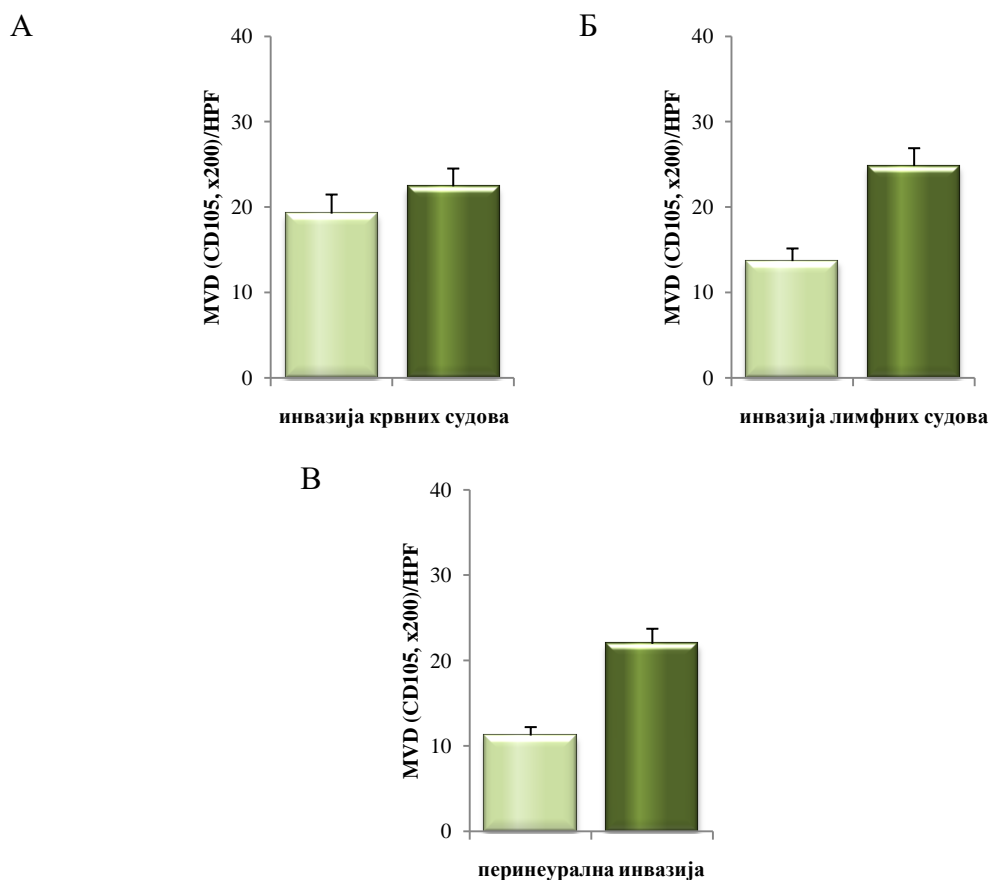
Графикон 34. MVD позитивно корелира са експресијом p53 протеина као и вредностима ИНPI, NPI и процентом метастатски измењених лимфних чворова аксиле. А. Постоји позитивна корелација између MVD и експресије p53 протеина у туморским ћелијама ($r=0,496$; $p=0,001$). Б. MVD корелира са вредностима ИНPI ($r=0,791$; $p<0,0001$), В. NPI ($r=0,774$; $p<0,0001$) и Г. са процентом позитивних лимфних чворова аксиле ($r=0,443$; $p=0,004$). Статистичка значајност је анализирана применом Sперман-овог коефицијента корелације.

Све карциноме дојке смо затим груписали на основу хистолошког градуса у групу карцинома са добром и средњом диференцијацијом ($n=24$) и на групу слабо диферентованих тумора ($n=16$). Утврдили смо значајну разлику између средњих вредности MVD између испитиваних група. MVD је значајно већа у групи слабо диферентованих тумора ($29,79\pm 2,08$) у односу на групу добро и средње диферентованих карцинома дојке ($14,06\pm 1,13$) ($p<0,0001$) (Графикон 35А). На основу нуклеарног градуса тумори су класификовани на исти начин у две групе: групу карцинома са градусом I и II ($n=23$) и групу са градусом III ($n=17$). MVD је значајно већа у групи тумора са нуклеарним градусом III ($28,89\pm 2,156$) у односу на групу са нуклеарним градусом I и II ($14,04\pm 1,18$) ($p<0,0001$) (Графикон 35Б).

На основу митотског индекса карциноми дојке су подељени на две групе: групу са митоским индексом I и II (n=33) и групу са митотским индексом III (n=7). Између ове две групе је такође утврђена статистички значајна разлика у MVD. Тумори са митотским индексом III ($28,56 \pm 2,15$) су показали значајно већу MVD у односу на туморе са митотским индексом I и II ($19,13 \pm 1,69$) ($p < 0,0001$) (Графикон 35B).



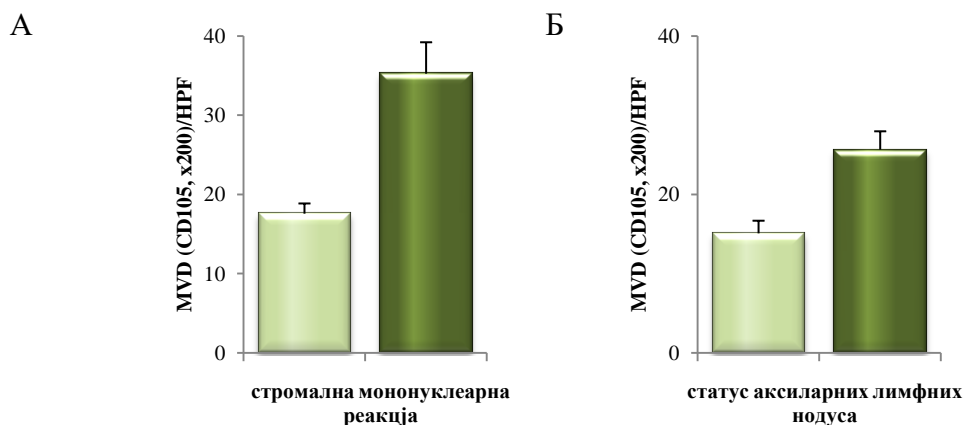
Графикон 35. Степен диференцијације туморског ткива као и ћелијске атипичности утиче на MVD у ткиву карцинома дојке. А. Слабо диферентовани карциноми дојке показују већу вредност MVD у односу на добро и средње диферентоване туморе ($p < 0,0001$). **Б.** Карциноми дојке са великом ћелијском атипичношћу показују већу вредност MVD у односу на туморе саграђене од ћелија ниске и умерене целуларне атипичности ($p < 0,0001$). **В.** MVD је статистички значајно већа у групи тумора која се карактерише већим бројем митоза у односу на туморе са митотским индексом I и II ($p < 0,0001$). Резултат је приказан као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.



Графикон 36. MVD је већа у туморима са присутном лимфном и перинеуралном али не и инвазијом крвних судова. А. Не постоји статистички значајна разлика у MVD у зависности од инвазије крвних судова ($p=0,063$). **Б.** MVD је статистички значајно већа у туморима са присутном лимфном ($p<0,0001$) и **В.** перинеуралном инвазијом ($p=0,002$). Резултат је приказан као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

У следећем кораку анализирали смо разлику MVD у односу на присуство инвазије крвних и лимфних судова у туморском ткиву. У првом кораку све туморе смо поделили на групу у којој су микроскопском анализом HE бојених ткивних пресека карцинома утврђени елементи инвазије крвних судова ($n=14$) и групу без инвазије ($n=26$). Између ове две групе није утврђена значајна разлика у MVD иако је била већа у групи са присутном инвазијом ($22,43 \pm 2,08$) у односу на групу где инвазија није верификована ($19,23 \pm 2,23$) ($p=0,063$) (Графикон 36А). У наредном кораку и у зависности од инвазије лимфних судова тумори су категорисани на групу са ($n=24$) и без инвазије лимфних судова ($n=16$). Тумори

са инвазијом ($24,81 \pm 2,09$) лимфних судова имали су већу вредност MVD у односу на групу без инвазије ($13,67 \pm 1,48$) и разлика је била статистички значајна ($p < 0,0001$) (Графикон 36Б). На исти начин тумори су груписани на групу са ($n=34$) и без перинеуралне инвазије ($n=6$). Постоји разлика у MVD између групе са ($21,96 \pm 1,77$) и без перинеуралне инвазије ($11,22 \pm 0,98$) ($p=0,002$) (Графикон 36В).



Графикон 37. MVD је већа у групи тумора са јако израженом стромалном мононуклеарном реакцијом и код пацијенткиња за позитивним лимфним чворовима аксиле. А. Постоји статистички значајна разлика у средњим вредностима MVD у зависности од степена стромалне мононуклеарне реакције. Тумори са јаком стромалном реакцијом показују већу MVD у односу на туморе са слабо и умерено израженом стромалном мононуклеарном реакцијом ($p=0,001$). **Б.** MVD је већа у туморима пацијенткиња са позитивним лимфним чворовима аксиле ($p < 0,0001$). Резултат је приказан као аритметичка средина \pm SEM. Статистичка значајност је анализирана применом Mann Whitney-јевог теста.

Стромална мононуклеарна реакција у ткиву карцинома дојке је оцењивана као слаба, умерена и јака. Тумори су слабом и умереном стромалном мононуклеарно реакцијом су анализирани као прва ($n=34$), док су тумори са јако израженом реакцијом груписани у другу групу тумора ($n=6$). Тумори са јаком реакцијом имали су у просеку већу вредност MVD ($35,22 \pm 3,96$) у односу на туморе са слабом и умереном стромалном мононуклеарном реакцијом ($17,55 \pm 1,29$) (Графикон 37А). Разлика је статистички значајна ($p=0,001$). На крају, поредили смо вредности MVD у зависности од статуса лимфних чворова аксиле. Пацијенти су подељени на групе са негативним ($n=20$) и позитивним лимфним чворовима

аксиле (n=20). Анализом смо утврдили значајну статистичку разлику у MVD између група пацијената са негативним и позитивним лимфним чворовима аксиле ($15,07 \pm 1,59$ vs. $25,63 \pm 2,32$) ($p < 0,0001$) (Графикон 37Б).

ДИСКУСИЈА

У до сада објављеној и нама доступној литератури није испитана улога и значај IL-33/IL-33R сигналног пута у развоју некрозе у примарном тумору дојке. Наша студија по први показује да делеција гена за IL-33R значајно поспешује некрозу у ткиву примарног карцинома дојке. Супротно овоме, присуство овог рецептора праћено је смањеном некрозом и убрзаним растом тумора. Уз то, наша студија је показала истовремено присуство и природу повезаности између IL-33 и IL-33R у туморским и ћелијама строме карцинома дојке.

Први део нашег истраживања базиран је на испитивање одсуства IL-33R у анималном моделу 4T1 индукованог карцинома дојке. У овом делу показали смо да је делеција гена за IL-33R повезана са споријим растом примарног тумора, промоцијом некрозе и смањеном експресијом проангиогених IL-33 и VEGF-а у туморским ћелијама.

Како бисмо податке добијене на мишевима корелирали са налазима у хуманој патологији, други део нашег истраживања је усмерен на анализу експресије IL-33 и IL-33R у туморским и ћелијама строме у зависности од присутва некрозе као и њихову повезаност са експресијом VEGF-а и MVD. Овај део истраживање је потврдио налазе на експерименталном моделу и показао инверзну корелацију између експресије IL-33 и IL-33R између туморских и ћелија строме у хуманом карциному дојке.

У трећем делу наше студије анализирали смо повезаност некрозе, експресије IL-33, IL-33R, VEGF-а и MVD са стандардним клиничкопатолошким параметрима у хуманом карциному дојке. Сви добијени подаци указују да инхибиција активности сигналног пута IL-33/IL-33R може имати потенцијални терапијски значај а његова смањена активност повезана је са повољнијим исходом болести.

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

Вишеструки патолошки фактори утичу на исход болести код оболелих од карцинома дојке, укључујући проангиогене и регулаторне медијаторе. У нашој студији, користећи мишеве дефицијентне за рецептор за имунорегулаторни IL-33 на BALB/c подлози, показали смо да делеција гена за овај рецептор промовише некрозу у туморском ткиву. Овакви налази указују на нов механизам којим IL-33 утиче на карциногенезу. Раније студије су показале да IL-33/IL-33R осовина супримира урођени антитуморски имунски одговор и на тај начин промовише неоангиогенезу (255,256). Наше истраживање показује појачану туморску некрозу у примарним туморима дојке IL-33R^{-/-} мишева што је повезано са смањеном експресијом проангиогених фактора попут IL-33 и VEGF-а. Поред тога, присуство некрозе у туморима дојке индукованим у нашим експериментима је повезано и са споријим растом тумора код IL-33R^{-/-} мишева. Значај некрозе у расту тумора и настанку метастаза је још увек предмет разматрања (257,258). Познато је да је појава некрозе у примарном тумору дојке саставни део биологије тумора и у већем броју истраживања најчешће је повезивана са неповољним исходом болести. Са друге стране, друге групе аутора су показале да некроза може настати и као резултат доброг терапијског одговора на примену различитих видова онколошког лечења [259-267]. У складу са овим истраживањима, наши резултати показују да атенуација IL-33 може имати терапијски потенцијал не само стимулацијом урођеног антитуморског имунског одговора већ и промовисањем некрозе која је повезана са смањеном експресијом VEGF-а као снажног

проангиогеног фактора [268, 269]. Додатно, присуство туморске некрозе појачава антитуморски имунски одговор [270, 271], тако што некротичне ћелије олакшавају сазревање ћелија које презентују антиген и Т ћелија, што последично индукује значајно јачи антитуморски имунски одговор [272].

Резултати добијени анализом туморског ткива узетог од пацијената показали су поклапање са подацима добијеним у експерименталном моделу 4T1 индукованог карцинома дојке. Анализирали смо укупно 40 пацијенткиња са карциномом дојке које су у зависности од присуства некрозе у туморском ткиву класификоване на две групе (са и без некрозе). У анализираним групама није било значајне разлике у старсној доби, величини тумора и стадијуму болести према AJCC критеријумима. Анализом смо утврдили да је појачана некроза у примарном тумору дојке негативно повезана са смањеном експресијом IL-33, IL-33R и VEGF-а у туморским ћелијама. Такође експресија IL-33 и IL-33R је позитивно повезана са експресијом VEGF-а у туморским ћелијама.

Слично VEGF-у, IL-33 олакшава пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија као и пропустљивост крвних судова у *in vitro* условима. Ову улогу IL-33 према досадашњим студијама вероватно обавља независно од VEGF-а [273]. Ипак, одсуство проангиогених фактора попут IL-33 и VEGF-а води у хроничну исхемију и хипоксију што последично може резултовати туморском некрозом [274-276]. Савремена истраживања до данас нису показала који од ова два проангиогена фактора има већи значај у развоју локалне туморске неоангиогенезе.

Експресија IL-33 и VEGF-а су у позитивној корелацији у туморским ћелијама хуманог и анималног карцинома дојке. Такође, у нашем истраживању смо показали да присуство IL-33R појачава експресију IL-33. На крају у примарним туморима добијеним у IL-33R^{-/-} мишева утврдили смо нижи степен експресије VEGF-а у туморским ћелијама што је указало на повезаност активације сигналног пута IL-33/IL-33R и експресије VEGF-а.

Иако је претходно показано да проангиогену улогу IL-33 остварује независно од VEGF-а [273], Theoharides и сарадници [275] су у својој студији показали да IL-33 директно олакшава секрецију и експресију VEGF-а у мастоцитима. Такође студија Stojkovic-а и сарадника је показала да IL-33 индукује пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија преко IL-33R који се експримира на ендотелним ћелијама. Овај ефекат је посредован појачавањем активности урокиназног активатора плазминогена.

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

Супротно очекивању, у туморима у којима је детектована некроза забележена је већа MVD. Ипак, приметили смо да је највећи број новонасталих крвних судова детектован у перинекротичном рубу туморског ткива. У нашој студији нисмо утврдили повезаност између IL-33, IL-33R и MVD, док је експресија VEGF-а у туморским ћелијама перинекротичног руба у позитивној корелацији са MVD. Од раније је познато да IL-33 ослобађају оштећене и ћелије захваћене некрозом [277, 278]. На основу ових закључака и сличних студија, сматрамо да IL-33 ослобођен из ћелија захваћених некрозом поспешује експресију VEGF-а у туморским ћелијама перинекротичног руба и појачава неоангиогенезу што се манифестује већим MVD у перинекротичној зони хуманог карцинома дојке. Ова студија показује додатни механизам којим је IL-33/IL-33R сигнални пут укључен у карциногенезу. Секретован из живих и/или ослобођен из некротичних ћелија, IL-33 се везује за свој рецептор на ендотелним ћелијама и промовише ангиогенезу и продукцију VEGF-а. Делеција гена за IL-33R или његова блокада супримира активност сигналног пута IL-33/IL-33R што може имати терапијски значај. Такође, наша студија зансована на експерименталним подацима не искључује механизам којим IL-33 своју проангиогену улогу оставарује независно од VEGF-а.

Потребно је напоменути да други чланови IL-1 породице цитокина имају значајну улогу у туморској ангиогенези [277, 279,280].

По својој функцији IL-33 је сличан IL-1 односно IL-1 β и IL-33 имају снажну проангиогену функцију и обављају контролу продукције VEGF-а. IL-1 β појачава експресију VEGF-а везујући се за његове рецепторе на ендотелним ћелијама а затим делујући заједно са VEGF-ом поспешује неоангиогенезу у туморском ткиву. У складу са овим, блокада IL-1 β успорава туморски раст и спречава неоангиогенезу [277, 279,280]. Попут IL-1, IL-33 се везује за IL-1R3 (IL-1RAcP), на основу чега претпостављамо да је блокадном овог рецептора применом анти-IL-1R3 антитела, могуће редуковати ангиогенезу и појачати смрт ћелија карцинома дојке некрозом тј губитком васкуларног снабдевања. Оваква претпоставка је у складу са студијама које су показале високу експресију IL-1R3 у акутној мијелоидној леукемији [278]. Наша студија је показала нов механизам којим је сигнални

пут IL-33/IL-33R укључен у карциногенезу и даје рационално објашњење за блокаду IL-33 као једног од потенцијалних видова лечења пацијената са карциномом дојке.

Раније студије су показале да IL-33 и IL-33R поред туморских експримирају и паренхимске, стромалне и запаљенске ћелије попут макрофага, дендритичних ћелија, мастоцита, епителних ћелија, глаткомишићних ћелија, фибробласта, ниофибробласта, ендотелних ћелија, глијалних ћелија, остеобласта и адипоцита. Из тог разлога испитивали смо улогу експресије IL-33 и IL-33R у стромланим ћелијама између различитих група тумора у зависности од присуства некрозе. Наше истраживање је показало да тумори у којима су детектована поља некрозе показују већу експресију испитиваних белега у ћелијама строме у односу на туморе у којима некроза није детектована. Овај налаз је у супротности са експресијом истих маркера у туморским ћелијама. У прилог овакве тезе иде раније описана функција IL-33 као „алармина“ чија је улога у међусобној комуникацији и обавештавању различитих популација ћелија о оштећењу или смрти ћелија. На овај начин скретован из живих ћелија или ослобођен некрозом, IL-33 стимулише инфилтрацију туморског ткива IL-33⁺ и IL-33R⁺

IL-33 је првобитно означен као лиганд за мембрански ST2 рецептор и цитокин који снажно потенцира Th2 имунски одговор и важан медијатор за репарацију епителног ткива (281). Новије студије су показале да IL-33/ST2 осовина може промовисати и Th1 имунски одговор у зависности од присуства IL-12 (282). Према томе, улога сигналног пута може бити протективна или патогена у различитим болестима јер показује двоструку улогу у запаљенским болестима (283, 284). IL-33 игра важну улогу у запљењу и повезана је са многим болестима укључујући темпорални артеритис (артеритис циновских ћелија) (285), билијрну атрезију (286) и хроничну обструктивну болест плућа (287). Међутим, у малом броју студија испитивана је улога IL-33/ST2 осовине у карциномима а посебно је мало позната улога IL-33 код пацијената са карциномом дојке.

Студија која се бавила испитивањем серумске концентрације IL-33 код пацијената са карциномом дојке показала је да је ниво IL-33 већи код пацијената са карциномом дојке у поређењу са пацијентима леченим од бенигнух промена дојке. Такође, иста студија је показала значајно већу имунохистохемијску експресију IL-33 у ћелијама карцинома и околног ткива у односу на здраво ткиво дојке узето од истих пацијената. Концентрација sST2 је повећана код пацијената са метастатским карциномом дојке док је смањена концентрација овог протеина повезана са смањењем ErbB2 индиковане ћелијске покретљивости у две ћелијске линије (288). Концентрација IL-33 у серуму је већа код ER позитивних пацијената што указује на могућу зависност IL-33/ST2 сигнализације од хормонских рецептора. Осим тога, експресија IL-33 је значајно већа у Her2 позитивним туморима што је у складу са подацима из студија које су показале да оверекспресија sST2 убрзава метастазирање карцинома дојке активацијом ErbB2 у ћелијским линијама карцинома дојке (288). У нашој студији на ST2 дефицијентним мишевима и применом 4T1 ћелијске линије тумора дојке показали смо да одсуство ST2 рецептора успорава прогресију и метастазирање карцинома дојке појачавањем цитотоксичности NK ћелија и системске концентрације Th1/Th17 цитокина. (289).

Концентрација IL-33 у серуму је нижа у групи тумора који у значајно мањој мери експримирају Ki-67 што указује на негативну повезаност између серумског IL-33 и пролиферације ћелија карцинома дојке. Након анализе цитокина повезаних са IL-33, ова студија је показала да је једино концентрација IL-12 смањена код пацијената са карциномом дојке што имплицира да системски IL-33 не игра важну улогу у имунском

систему оболелих од карцинома дојке. Наша студија на експерименталном моделу карцинома дојке је показала да активација IL-33/ST2 сигналног пута појачава интратуморску акумулацију имуносупресивних у урођених лимфоидних ћелија и на тај начин промовише туморски раст и метастазирање у карциному дојке (290). Слично овоме, код скамоцелуларног карцинома у регији главе и врата примена IL-33 промовише миграцију ћелија и инвазивност индукцијом епително-мезенхималне транзиције. Поред наведеног, IL-33 је доказан и као потенцијални прогностички маркер али и као потенцијална мета за нове видове терапијског приступа (291). Последња истраживања сугеришу да тумор инфилтришући Т (TILs) лимфоцити ослобађају IL-17A који активира MAPK сигнални пут и последично промовишу ћелијски пролиферацију у туморском ткиву и резистенцију на конвенционалне хемиотерапеутске агенсе (292). Елевација концентрације IL-33 у серуму као и његове локалне, имунохистохемијске, експресије може убрзати прогресију и метастазирање карцинома дојке регулацијом сигналног пута IL-12. Локална експресија IL-33 може бити важан маркер у диференцијацији малигног од бенигног ткива. Имунохистохемијска експресија IL-33 у околном ткиву карцинома које није захваћено малигним тумором је значајно већа него у здравом ткиву дојке што указује да околно нетуморско ткиво може имати значајну улогу у антитуморској имуности. Другим речима, локална експресија IL-33 може да повећа интратуморску акумулацију имуносупресивних лимфоидних ћелија код пацијената са карциномом дојке. Међутим, тумори високог хистолошког градуса показују значајно мању експресију IL-33 у поређењу са туморима ниског градуса што потенцира значај овог цитокина посебно код Her2 позитивне групе тумора и тумора који експримирају друге цитокине повезане са укрштеном регулацијом. Посебно је интересантан резултат који показује обрнуту повезаност између серумске концентрације и локалне експресије IL-33 са експресијом ER и HER2 у ћелијама карцинома дојке. У доступној литератури су врло оскудне студије које су проучавале однос и повезаност IL-33 са ER и HER2. На основу ове студије намеће се закључак да системска концентрација и локална експресија IL-33 могу имати различите улоге у зависности од различитог хормонског статуса. На основу ових резултата претпостављамо да IL-33 може бити један од важних фактора који учествују у резистенцији тумора на хормонску и терапију Херцептином у групи Eg^+ /Her2⁺ позитивних карцинома.

Потврђено је да IL-33 може да активира Th1, NK, NKT и CD8 цитотоксичне Т ћелије под одређеним околностима (293). У другу руку, IL-33 има дојаку, анти- и проинфламаторну улогу.

Истакли смо могућу улогу експресије IL-33 као биомаркера за разликовање хуманог карцинома дојке у коме су присутна некротична поља и показали да смањена експресија IL-33 указује на присуство некрозе у тумору. Анализом и поређењем десетогодишњег преживљавања између група тумора са и без некрозе потврдили смо значај некрозе као параметра који значајно утиче на преживљавање код пацијенткиња са карциномом дојке. Иако значајно указује на постојање некрозе у туморима дојке, степен експресије IL-33 значајно не утиче на укупно преживљавање оболелих. Експресија IL-33 у ћелијама туморске строме не представља поуздан маркер за постојање некрозе у туморском ткиву и не утиче значајно на десетогодишње преживљавање.

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

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

Висока густина новонасталих крвних судова не мора нужно да буде повезана са појачаним приливом крви унутар тумора јер су новонастали крвни судови незрели или још чешће оштећеног структурног интегритета (294) Овакви крвни судови пуцају и нису у стању да одрже артеријски притисак унутар тумора што за последицу има појаву локализованог крварења унутар туморске масе. Анастомозе које настају између ових новонасталих крвних судова доводе до маневрисања у протоку крви али ни ове анастомозе услед ослобљаног протока нису у стању да обаве адекватно снабдевање туморске масе крвљу

(295) Познато је да ја секреција одређених проангиогених фактора, попут VEGF-а, регулисана хипоксијом у тумору (296, 297). Туморске ћелије изложене хипоксији ослобађају VEGF и на тај начин стимулишу туморску неоангиогенезу. У прилог овој тврдњи иду резултати неких студија у којима је показано да је експресија проангиогених фактора појачана у зони тумора око некрозе (298).

У даљем истраживању испитивали смо повезаност некрозе са стандардним патохистолошким и имунохистохемијским параметрима (експресија ER, PR, HER2, p53, NPI, ИПИ, хистолошки и нуклеарни градус, митотски индекс, инвазија крвних и лимфних судова, перинеурална инвазија, стромална моноклеарна реакција, статус као и проценат метастатски измењених лимфних чворова аксиле). У зависности од присуства некрозе у примарном тумору, сви испитаници су подељени на групу пацијената у чијим туморима су микроскопским прегледом детектована поља некрозе и групу без некрозе.

Ген за p53, тумор-супресорски ген, се налази на кратком краку хромозома 17 (17p). У нормалној ћелији контролише репликацију DNA. Описује се као „чувар генома” који препознаје оштећење DNA, зауставља ћелијски циклус, дајући ћелији довољно времена да обави поправку оштећене DNA, а ако је ово оштећење превелико за поправку, индукује апоптозу односно програмирану ћелијску смрт (299). Губитак функције гена p53 за последицу може имати даље дељење ћелије са генетским оштећењем (300, 301). Analize na celikupnom genomu su pokazale prisustvo p53 mutacija u 12% luminalnih A i 32% luminalnih B karcinoma dojke što je drastično ređe u odnosu na basal like karcinome dojke kod kojih je zastupljenost ove mutacije 84% i kod Her2 tipa tumora sa učestalošću od 75% (302). Mutirani p53 se imunohistohemisk detektuje u jedru tumorske ćelije i služi kao surogat marker za detekciju p53 mutacija. Ranije imunohistohemiskje studije su pokazale da je prisustvo ovih mutacija u grupi ER pozitivnih tumora, oko 20% i da prisustvo ove mutacije ima značaj u oređikciji rezistencije na endokrinu terapiju i skraćenje ukupnog preživljavanja nakon relapsa bolesti kod metastatskog karcinoma dojke (303, 304).

Тумори са присутном некрозом су показали статистички значајну нижу експресију ER и PR док је нуклеарна експресија p53 протеина била већа. Ови подаци су у складу са подацима из литературе који показују да пацијенти са смањеном експресијом ER и PR као и појачаном експресијом p53 протеина спадају у прогностички неповољну групу пацијената и показују статистички значајно краће петогодишње и десетогодишње преживљавање. Са друге стране, некроза која је традиционално посматрана као прогностички неповољан параметар у нашој студији поред овакве везе са експресијом ових белега показала је статистички значајно краће десетогодишње преживљавање у групи пацијената у чијим туморима дојке су детектована поља некрозе. У складу са овим анализима вредности NPI и ИПИ су такође били већи у групи тумора са присутном

некрозом. Веће вредности оба прогностичка индекса су повезане са лошом прогнозом болести. Од стандардних патохистолошких параметара некроза је чешће заступљена у групама тумора са високим хистолошким и нуклеарним градусом, са перинеуралном и инвазијом лимфних судова, са стромланом моноклеарном реакцијом јаког степена и у групи пацијената код којих су након операције детектовани позитивни лимфни чворови аксиле. Статус HER2 рецептора, митотски индекс, инвазија крвних судова као и проценат позитивних лимфних чворова нису били повезани и нису се разликовали између групе тумора класификованих на основу присуства тј одсуства некрозе.

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

Средња вредност скорова за експресију ER и PR је била већа у групи тумора са високом експресијом IL-33 у туморским ћелијама иако разлика није статистички значајна. Овај налаз је у складу са студијом Lee и сарадника. Насупрот оваквом резултату, експресија p53 протеина као и NPI је била већа код тумора са ниском експресијом IL-33. Овакав резултат иде у прилог ранијим студијама које су показале да је мутација p53 протеина у карциному дојке праћена бржим растом тумора и присуством некрозе у туморском ткиву. Претпостављамо да смањена експресија IL-33 у туморским ћелијама настаје као последица некрозе и његовог ослобађања из живих ћелија са циљем поспешивања ангиогенезе и смањења исхемије а последично и некрозе унутар туморског ткива. Повећана експресија IL-33 је утврђена у групама тумора ниског градуса, смањене митотске активности као и код тумора без метастатски измењених аксиларних лимфних чворова. Наша студија у којој је на анималном моделу карцинома дојке мерена пролиферативна активност туморских ћелија применом Ki67 показала је да примена рекомбинантног IL-33 повећава процентуалну заступљеност Ki67 позитивних туморских ћелија. IL-33 не поспешује пролиферацију 4T1 туморских ћелија у *In vitro* условима, чиме је искључен

директни ефекат IL-33 на туморске ћелије. На основу ове студије и наших претходних резултата, интрацелуларни IL-33 значајно смањује пролиферативну активност туморских ћелија док је његова системска улога апсолутно супротна. Сумирајући наше резултате може се рећи да је прогресија карцинома дојке повезана са смањеном експресијом IL-33 у туморским ћелијама и да туморске ћелије представљају значајан извор овог цитокина. Поред наведеног, експресија IL-33 у туморским ћелијама није показала повезаност са експресијом Her2 у ћелијама тумора, нуклеарним градусом, инвазијом крвних и лимфних судова, перинеуралном инвазијом, стромалном мононуклеарном реакцијом као и процентом метастатски измењених аксиларних лимфних чворова.

Обзиром да поред туморских IL-33 могу да експримирају и друге ћелије попут Т лимфоцита, НК ћелија, дендритичних ћелија, макрофага, мастоцита, миофибробласта, фибробласта, адипоцита, глијалних ћелија, остеобласта, ендотелних и епителних ћелија испитивали смо повезаност експресије IL-33 у ћелијама туморске строме са стандардним патохистолошким и имунохистохемијским параметрима. Испитанице су класификовани на групу са ниском ($\leq 10\%$ позитивних ћелија) и високом ($> 10\%$ позитивних ћелија) експресијом IL-33 у ћелијама туморске строме. Укупно је анализирано 40 ткивних узорака карцинома код којих је у 12 (30%) утврђена ниска а код 28 (70%) висока експресија IL-33 у ћелијама строме.

Choi и сарадници су показали да IL-33 може да функционише у аутокриним маниру у ендотелним и епителним ћелијама које представљају значајан извор IL-33. Поред тога IL-33 промовише ангиогенезу појачавањем пролиферације и миграције ендотелних ћелија као и васкуларне пропустљивости (273). Такође ендотелне ћелије секретују медијаторе запаљена у одговору на стимулацију IL-33 (305) што је такође и одлика епителних ћелија (305). Током запаљенске реакције, епителне ћелије гастроинтестиналног тракта продукују IL-25, IL-33 и TSLP. Овај процес захтева присуство мастоцита (306). У ConA индукованом хепатитису NKT ћелије активирају хепатоците и преко TRAIL рецептора стимулишу продукцију IL-33. (307, 308). Према овој студији IL-33 има значајну протективну улогу у анималном моделу хепатитиса. У складу са овом експерименталном студијом, *in vivo* експерименти уз апликацију IL-33 показали су да овај цитокин има улогу у смањењу исхемије јетре и спречавању некрозе хепатоцита без продукције проинфламаторних медијатора из Купферових ћелија и/или хепатоцита (309).

Од свих испитиваних параметара тумори у којима је забележен висок степен експресије IL-33 у ћелијама строме показивали су значајно већу експресију p53 протеина у туморским ћелијама. На основу овог резултата сматрамо да је смањени апоптотски потенцијал туморских ћелија карцинома дојке праћен појачаном локалном секрецијом IL-33 у стромалним ћелијама карцинома дојке. Иста група тумора показује значајно већи степен некрозе у туморском ткиву. Могуће објашњење овог феномена је да смањена апоптоза и појачана некроза стимулишу ћелије строме да секретују проангогени IL-33 и на тај начин смање исхемију и спрече даљи тазвој некрозе у туморском ткиву. Поред тога, на основу података из литературе IL-33 потенцира Th2 имунски одговор и повећава заступљеност IL-10 продукујућих ћелија чијом продукцијом се ативирају регулаторни Т лимфоцити, индукујући имуносупресију. Поред овога, код пацијената са III стадијумом колоректалног карцинома утврђен је нижи степен IL-33 mRNA код којих је детектована p53 мутација у односу на оне код којих је присутна wilde форма p53 (310). Анализом степена експресије IL-33 у ћелијама строме тумора дојке нисмо утврдили повезаност са другим стандардним имунохистохемијским и патохистолошким параметрима.

Досадашње студије су се бавиле проучавањем повезаности серумске концентрације ST2 са стандардним патохистолошким и имунохистохемијским параметрима. Досадашње анализе су показале да је серумска концентрације sST2 већа код ER позитивних пацијената у односу на контролну групу коју су чиниле здраве испитанице (311, 312). Иста студија је показала да је серумска концентрација код пацијенткиња са ER позитивним карциномом дојке значајно већа у односу на пацијенткиње са DCIS и да значајно корелира са старосном доби, величином тумора и стадијумом болести. Ове студије нису показале повезаност sST2 са експресијом Her2 у ћелијама карцинома дојке (313, 314). У групи ER позитивних карцинома дојке забележена је и значајно већа концентрација серумског sST2 у групи тумора са високим индексом пролиферације који је процењиван експресијом Ki67 (315). Sahin и сарадници су претходно показали да проценат позитивних ћелија на Ki67 корелира са нуклеарним градуом, старосном доби и митотским индексом у карциномима дојке (Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis (316).

Како до сада није испитиван значај локалне експресије ST2 у карциному дојке испитивали смо повезаност експресије овог белега са осталим параметрима. Испитанице су

класификовани на групу са ниском ($\leq 22,5\%$ позитивних ћелија) и високом ($> 22,5\%$ позитивних ћелија) експресијом ST2 у туморским ћелијама карцинома дојке. Укупно је анализирано 40 ткивних узорака карцинома код којих је у 18 (45%) утврђена ниска а код 22 (55%) висока експресија ST2 у ћелијама карцинома.

Наша студија је показала да је експресија ER и PR значајно већа у групи тумора у којој је детектована висока експресија ST2 у туморским ћелијама, док се експресија p53 протеина није значајно разликовала. Такође, у складу са поменутиим студијама није забележена ни разлика у експресији HER2 у зависности од степена експресије ST2. Узевши у обзир резултате студија у којима је повезаност испитивана са серумским ST2 сматрамо да је експресија ST2 рецептора на туморским ћелијама повезана са хормонском сигнализацијом у ћелијама карцинома дојке. Вредности NPI и INPI су биле значајно ниже у групи карцинома са високим степеном експресије ST2 у ћелијама карцинома дојке што имплицира да је повећана експресија овог рецептора у туморским ћелијама повезана са повољнијом прогнозом болести. Такође тумори ниског хистолошког и нуклеарног градуса показују виши степен експресије ST2 у туморским ћелијама, што потврђује значај експресије ST2 у туморским ћелијама као повољног прогностичког фактора. Иако је на граници статистичке значајности, интересантан је податак да је у групи тумора ниске експресије ST2 забележена процентуално већа заступљеност перинеуралне инвазије у односу на туморе који у већој мери експримирају ST2. У нашој студији нисмо утврдили значајну повезаност између степена експресије ST2 са митотским индексом, инвазијом крвних и лимфних судова, стромалном моноклеарном реакцијом, као и статусом и процентом метастатски измењених лимфних чворова аксиле.

Поред туморских, експресија ST2 је присутна и на ћелијама туморске строме укључујући и запаљенске ћелије попут: Th2 лимфоцита, мастоцита, еозинофила, базофила, неутрофила, дендритичних челија, макрофага, NK ћелија, фибробласта, миофибробласта, глаткомишићних као и ендотелних и епителних ћелија. Раније студије које су се бавиле значајом активације IL33/ST2 сигналног пута у карциному дојке претежно су биле усмерене на ћелије имунског система и модулацију имунског одговора. Из тог разлога желели смо да испитмамо улогу експресије ST2 рецептора у ћелијама строме укључујући и друге популације ћелија. Испитанице смо поделили на групу са ниском ($\leq 13,75\%$ позитивних ћелија) и високом ($> 13,75\%$ позитивних ћелија) експресијом ST2 у ћелијама

строме карцинома дојке. Укупно је анализирано 40 ткивних узорака карцинома код којих је у 20 (50%) утврђена ниска а код 20 (50%) висока експресија ST2 у ћелијама туморске строме.

Тумори са високом експресијом ST2 рецептора у ћелијама туморске строме показивали су значајно нижу вредност ER скорa али не и скорa за експресију PR у туморским ћелијама. Могуће објашњење је да IL-33 ослобођен из ћелија ER негативних тумора појачава инфилтрацију туморске строме са ST2 позитивним ћелијама што је у складу са ранијим експерименталним студијама. Обзиром да је наша студија показала да је негативност на ER повезана са некрозом у туморском ткиву, активација IL-33/ST2 сигналног пута у ћелијама строме поспешује ослобађање проангиогених фактора и на тај начин спречава даље настајање исхемије и некрозе у туморском ткиву. Овакав налаз упућује на изузетан прогностички значај експресије ST2 рецептора у ER негативним туморима као и потенцијалну мету у онколошком лечењу ове групе пацијената. Са друге стране експресије HER2 и p53 се нису значајно разликовала у зависности од степена експресије ST2 рецептора у ћелијама туморске строме. Вредности NPI и INPI су биле значајно веће у групама појачане експресије ST2 рецептора потврђујући експресију ST2 рецептора у ћелијама строме као лош прогностички фактор. Пред овога код тумора са појачаном експресијом ST2 рецептора у ћелијама строме забележен је већи удео тумора високог хистолошког градуса. У истој групи тумора у значајно већој мери је била присутна инвазија лимфних судова и перинеурална инвазија као и статус и проценат метастатски измењених лимфних чворова аксиле. Јака стромална моноклеарна реакција је била одсутна код свих тумора са ниском а забележена је код 6 тумора са високом експресијом ST2 рецептора у ћелијама туморске строме. Овај налаз је потврдио резултате претходних студија које су показале да активација IL33/ST2 сигналног пута у ћелијама строме убрзава метастатско ширење примарног тумора дојке. Такође значајна разлика у стромалној моноклеаној реакцији иде у прилог тврдњама да активација IL-33/ST2 сигналног пута убрзава инфилтрацију туморског ткива запаљенским ћелијама и поларише имунски одговор у Th2 и M2 правцу. Нашом анализом, нисмо утврдили повезаност између степена експресије ST2 рецептора у ћелијама туморске строме са нуклеарним градусом, митотским индексом и инвазијом крвних судова у туморском ткиву карцинома дојке.

Ангиогенеза игра кључну улогу у настанку, развоју и метастазирању тумора. VEGF, је један од најмоћнијих медијатора ангиогенезе и стимулише пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија [317, 318]. Поред туморских, VEGF продукују и ћелије попут активираних макрофага, неутрофила, фибробласта и епителних ћелија. Повећана експресија VEGF-а настаје као последица хипоксије али и под утицајем различитих цитокина попут IL-1 и IL-6 (319, 320).

У солидним туморима, експресија VEGF указује на лошу прогнозу и повезана је са повећаним метастатским потенцијалом примарних тумора. (321, 322.) Велики број студија показује да експресија VEGF-а у туморском ткиву корелира са MVD и лошом прогнозом укључујући и карцином дојке (323, 324).

Сигнализација путем VEGF-а у ћелијама карцинома је одговорна за резистенцију ћелија на апоптозу и њихову миграцију и инвазивност. [325, 326, 327]. Експресија VEGF-а је појачана у односу на нормално ткиво као и бенигне промене дојке [328]. Приближно 72–98% карцинома дојке је показује имунохистохемијску позитивност на VEGF. [329..... 330..... 331..... 332]. Према подацима из литературе експресија VEGF је повезана са већим тумором, високим хистолошким градусом, негативношћу на ER и PR, оверекспресијом HER2 и метастазама у лимфним нодусима. [333..... 334..... 335]. У анмиланом моделу болести, примена анти-VEGF терапије инхибира туморски раст, редукује микровакуларну густину и смањује инфилтрацију тумор асоцираним макрофагима. [336.]. Анти-VEGF терапија са бевацизумабом, хуанизиваним антителима за VEGF у комбинацији са хемотерапијским протоколима, показала је успоравање даље прогресије болести код пацијенткиња са метастатским карцинома [337]. *In vitro*, повећана експресија VEGF-а је повезана са резистенцијом на примену анти-ER терапије. (338)

Wild type p53 негативно регулише експресију VEGF и на тај начин инхибира ангиогенезу, у различитим туморима (339, 340). У складу са тим мутирани облици p53 у позитивној су корелацији са експресијом VEGF код неколико различитих тумора (341, 342).

Експресија VEGF-а није показала значајну повезаност са старосном доби и величином тумора у нашем истраживању. Разлог оваквом резултату је начин одабира пацијената који су укључени у наше истраживање и који је подрасумевао да се групе испитиваних пацијенткиња међусобно не разликују у величини тумора, стадијуму болести и старосној доби. Поред тога, експресија VEGF-а није у статистички значајној корелацији са

експресијом ER у ћелијама карцинома. Иако наша анализа није достигла статистичку значајност запазили смо тренд да је повећана експресија VEGF-а праћена смањеном експресијом ER што је у складу са подацима из литературе. Идентичне резултате смо добили анализирајући повезаност између експресије VEGF-а са експресијом PR и Her2. Једарна експресија p53 протеина била је у јаког позитивној корелацији са скором за експресију VEGF-а у туморским ћелијама што је у складу са подацима из литературе. Позитивна корелација VEGF експресије са већим NPI у потпуности потврђује значај експресије VEGF као лошег прогностичког параметра за оболеле од карцинома дојке. ИNPI и експресија VEGF-а у туморским ћелијама у нашој студији нису у корелацији. Поред тога, иако на ивици статистичке значајности, постоји јака позитивна корелација између процентулане заступљености метастатски измењених лимфних чворова аксиле и експресије VEGF-а у туморским ћелијама, чиме смо потврдили досадашње резултате да је експресија VEGF-а у ћелијама карцинома повезана са појачаним метастатским потенцијалом примарног тумора дојке. У складу тврдњама да биолошки агресивнији карциноми дојке показују већи степен експресије VEGF-а, у нашој студији смо забележили већу експресију код тумора високог хистолошког и нуклеарног градуса али не и код оних са високим митотским индексом, инвазијом крвних и лимфних судова као и перинеуралном инвазијом. Стромална моноклеарна реакција је значајно већа у туморима са јаком експресијом VEGF-а што је у складу са експериментланим подацима из литературе, добијеним на анималном моделу карцинома дојке. Са друге стране статус тј присуство метастатски измењених аксиларних лимфних чворова није повезан са експресијом VEGF-а у туморским ћелијама.

Ендоглин (CD105) је описан крајем прошлог века и класификован као помоћни протеин за TGF- β , плејотропни цитокин и маркер који се снажно експримира на ендотелним ћелијама (343). Појачана експресија овог белега је карактеристична за пролиферативну фазу у ендотелним ћелијама (344-346). Управо из овог разлога, ендоглин представља одличан маркер за детекцију туморске ангиогенезе и неоваскуларизације. Велики број студија се бавио значајем његове експресије са циљем прогнозе, дијагнозе и терпијског приступа код онколошких пацијената. (347-350). Ендотелне ћелије у туморском ткиву показују већу

пролиферацију у односу на ендотелне ћелије нормалног ткива а самим тим и појачану експресију CD105 (351, 352).

Према томе, терапија ендоглином заснива се на циљању високе популације ендотелних ћелија у туморском ткиву у циљу инхибиције метастаза и смањења туморске масе спречавањем испоруке нутритијената и размене штетних материја у туморским ћелијама.

У нашој студији није забележена значајна корелација између старосне добе и MVD одређиване применом CD105 антитела. Величина тумора је била у јакој позитивној корелацији са бројем новонасталих крвних судова у ткиву карцинома дојке.

Као и у другим студијама које су се бавиле односом MVD и експресије ER и PR, утврдили смо значајну негативну корелацију између броја новонасталих крвних судова и експресије ER и PR у ћелијама карцинома дојке. Овакав налаз је у складу и са експерименталним подацима који су *In vivo* и *In vitro* показали да је ER овеекспресија повезана са смањеном васкуларизацијом тумора и споријим растом (353)

Код Her2 позитивних карцинома дојке забележили смо већу MVD у односу на негативне туморе али разлика није досегла статистичку значајност (354). Експресија p53 у ћелијама карцинома дојке је у јакој позитивној корелацији са бројем новонасталих крвних судова, указујући на смањену апоптозу и високу пролиферативну активност тумора са повећаним бројем новонасталих крвних судова (355). С обзиром на експресију хормонских рецептора, Her2 и експресију p53 протеина савим је очекивана јака позитивна корелација са NPI и INPI. Овим резултатом смо у потпуности потврдили значај повећане микроваскуларне густине као лошег прогностичког параметра код оболелих од карцинома дојке. Dhakal и сарадници су у својој студији приказали и повезаност MVD са другим хистолошким параметрима који су у потпуности у складу са резултатима наше студије (356). MVD у ткиву хуманог карцинома дојке је знатно већа у туморима високог хистолошког и нуклераног градуса, јако изражене митотске активности, присутне инвазије лимфних судова, перинеуралне инвазије, стромалне моноклеарне реакције и статуса и процентуалне заступљености метастатски измењених лимфних нодуса аксиле. Оваквим резултатима смо у потпуности потврдили значај повећане микроваскуларне густине као једног од најпоузданијих параметара лоше прогнозе болести оболелих од карцинома дојке.

ЗАКЉУЧЦИ

Делеција гена за IL-33R појачава некрозу у мишијем моделу карцинома дојке изазваном 4T1 ћелијском линијом и хуманом инвазивном дукталном карциному дојке. Делеција гена за IL-33R значајно смањује и експресију VEGF-а у туморским ћелијама како у анималном моделу тако и у хуманом карциному дојке.

Закључак је изведен на основу следећих резултата добијених током експеримента:

1. Делеција гена за IL-33R појачава некрозу у тунору и успорава раст тумора у мишева.
2. Експресија IL-33 у туморским ћелијама карцинома дојке корелира са растом тумора у IL-33R^{+/+} мишева.
3. Присуство некрозе у хуманом карциному дојке је праћено смањеном цитоплазматском експресијом IL-33, IL-33R и VEGF у туморским ћелијама.
4. Експресија VEGF-а позитивно корелира са микроваскуларном густином у перинекротичном рубу у хуманом карциному дојке.
5. Експресија IL-33 се значајно повећава и значајно је већа у IL-33R^{+/+} мишева током периода праћења у поређењу са IL-33R^{-/-}.
6. Експресија IL-33 и IL-33R у туморским ћелијама је у негативној корелацији са експресијом истих белега у ћелијама туморске строме.

СКРАЋЕНИЦЕ

AJCC – енгл. American Joint Committee on Cancer

AMP – аденозин монофосфат

APC – енгл. Antigen presenting cells MVD

ATP – аденозин трифосфат

Bcl-2 – енгл. B-cell lymphoma

BRCA – енгл. Breast Cancer 1

CCL17 – енгл. C-C motif chemokine ligand 17

CCL24 – енгл. C-C motif chemokine ligand 24

DCIS – Ductal carcinoma in situ

EGFR – енгл. epidermal growth factor receptor

ER – енгл. Estrogene Receptore

GM-CSF – енгл. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HMGB1 – енгл. High Mobility Group Box 1 Protein

IDC – енгл. Invasive Breast Carcinoma

IFN – интерферон

IL – интерлеукин

IL-1R – рецептор за интерлеукин 1

IRAK-1/4 – енгл. IL-1R associated kinase 1/4

Jak – енгл. Janus kinase

МАРК – протеин киназа активирана митогеном (енгл. Mitogen Activated Protein Kinase)

mRNA – информациона рибонуклеинска киселина

mTOR – енгл. Mammalian target of rapamycin

MyD88 – енгл. Myeloid differentiation primary response gene 88

NET – енгл. Neuroendocrine Tumors

NF-HEV - енгл. Nuclear factor of high endothelial venules

NF- κ B – транскрипциони фактор

NK ћелије – урођене убилачке ћелије (енгл. Natural Killer Cells)

NOS – енгл. Not Otherwise Specified

NST – енгл. No Special Type

PBS – енгл. Phosphate-buffered saline

PDGF – енгл. Platelet Derived Growth Factor

PR – енгл. Progesterone Receptore

ROI – енгл. Region of Interest

ROS – енгл. Reactive oxygen species

sST2 – solubilni ST2

ST2L – membranski ST2

ST2V – varijabilni ST2

STAT – engl. Signal Transducer and Activator of Transcription

TAM – тумор асоцирани макрофаги (енгл. Tumour Associated Macrophages)

TDLU – енгл. Terminal duct lobular unit

TGF- β – трансформишући фактор раста бета (енгл. Transforming growth factor beta)

TIL – тумор инфилтришући лимфоцити (енгл. Tumour Infiltrating Lymphocytes)

TLR – енгл. Toll like receptor

TNF – енгл. Tumor necrosis factor

TRAIL – енгл. TNF-related apoptosis-inducing ligand

UICC – енгл. Union for International Cancer Control

VEGF – енгл. Vascular Endothelial Growth Factor

WHO – енгл. World Health Organization

ЛИТЕРАТУРА

1. Vinay K, Abul KA, Jon CA, Nelson F. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Eight ed. Elsevier, Lyon, France; 2010.).
2. Ehemann CR, Shaw KM, Ryerson AB, Miller JW, Ajani UA, White MC. The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(6):1763–9.
3. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, Van de Vijver MJ, eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. Fourth ed. IARC, Lyon; 2012. ISBN.13
4. (Farid M. Essentials of Diagnostic Breast Pathology, Practical Approach. 1st ed. Berlin: Springer; 2007. ISBN 978-3-540-45117-4.)
5. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Tenth ed. Elsevier, Lyon, France; 2011.
6. Armes JE, Venter DJ. The pathology of inherited breast cancer. *Pathology.* 2002;34:309–14.
7. Rosen PP. Rosen's Breast Pathology. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Lyon, France; 2009
8. Yerushalmi R, Hayes MM, Gelmon KA. Breast carcinoma – rare types: review of the literature. *Ann Oncol.* 2009;20:1763–70.
9. Farid M. Essentials of Diagnostic Breast Pathology, Practical Approach. 1st ed. Berlin: Springer; 2007. ISBN 978-3-540-45117-4.
10. Fattaneh AT, Peter D. WHO Classification Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press, Lyon, France; 2003.
11. Colome MI, Ro JY, Ayala AG. Adenoid cystic carcinoma of the breast metastatic to the kidney. *J Pathol Bacteriol.* 1996;4:69–78.
12. 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
13. Elston CW, Ellis IO. The Breast. Churchill-Livingstone: Edinburgh, 1998, pp 367–378
14. Patey DH, Scarff RW. The position of histology in the prognosis of carcinoma of the breast. *Lancet* 1928;1:801–804

15. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957;11: 359–377
16. Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, et al. Invasive breast carcinoma. In: Tavassoli FA, Devilee P, eds. *WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon, France: IARC Press, 2003:13–59.
17. Bergers E, Baak JP, van Diest PJ, et al. Prognostic implications of different cell cycle analysis models of flow cytometric DNA histograms of 1301 breast cancer patients: results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project (MMMCP). *Int J Cancer* 1997; 74: 260–269
18. Baak JP. Mitosis counting in tumors. *Hum Pathol* 1990;21(7):683-5.
19. L.H. Sobin and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours, UICC*, Wiley-Liss, New York, 2002..... Singletary SA, Allred C, Ashley P et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging system for breast cancer staging. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3628–36.
20. L.H. Sobin and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours, UICC*, Wiley-Liss, New York, 2002.
21. Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, Brawley OW. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the surveillance, epidemiology, and results database. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 76: 27–36.
22. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J. Clin. Oncol.* 1988; 6; 1076–1087
23. Anderson WF, Chu KC, Chatterjee N, Brawley O, Brinton LA. Tumor variants by hormone receptor expression in white patients with node -negative breast cancer from the surveillance, epidemiology, and end results database. *J Clin Oncol* 2001; 19:18–27.
24. Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2007; 9; R6
25. Choi KC, Kang SK, Tai CJ, Auersperg N, Leung PC. Estradiol up-regulates antiapoptotic bcl-2 messenger ribonucleic acid and protein in tumorigenic ovarian surface epithelium cells. *Endocrinology* 2001; 142:2351–2360

26. Hyder SM, Huang JC, Nawaz Z, Boettger-Tong H, Makela S, Chiappetta C, Stancel GM. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by estrogens and progestins. *Environ Health Perspect* 2000; 108:785–790
27. Osborne CK, Schiff R, Arpino G, Lee AS, Hilsenbeck VG. Endocrine responsiveness: understanding how progesterone receptor can be used to select endocrine therapy. *Breast* 2005; 14(6):458–465
28. Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 72(2):163–172
29. Abdel-Hafiz H, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB. The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression. *J Biol Chem* 2002; 277(37):33950–33956
30. Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG, Cui Y, Allred DC, Horwitz KB, Fuqua SA. Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res* 2004; 10(8):2751–2760
31. NCBI: PubMed. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db_gene& cmd_Retrieve & dopt_full_report & list_uids_2064
32. Hanna W, Kahn HJ, Trudeau M. Evaluation of HER-2 / neu (erbB-2) status in breast cancer: from bench to bedside. *Mod. Pathol.* 1999; 12; 827–834
33. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al: Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987 ; 235:177–182
34. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al: Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244:707–712.
35. Ellis C.M., Dyson M.J., Stephenson T.J. and Maltby E.L. HER2 amplification status in breast cancer: a comparison between immunohistochemical staining and fluorescence in situ hybridization using manual and automated quantitative image analysis scoring techniques. *J Clin Pathol* 2005; 58: 710-714.
36. Schmidt M., Lewark B., Kohlschmidt N., Glawatz C., Steiner E., Tanner B., Pilch H., Weikel W., Kolbl H. and Lehr H.A. (2005). Long-term prognostic significance of HER-2/neu in untreated node-negative breast cancer depends on the method of testing. *Breast Cancer Res.* 7, 256-266.

37. Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind I, Felber M, Wang HJ, Beryt M, Seshadri R, Hepp H, Slamon DJ. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(2):142–153
38. Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF: When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:2334–2356.
39. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al: Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987 ; 235:177–182
40. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al: Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244:707–712.
41. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD et al. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 2005;16:1569-1583.
42. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al, American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *JCO* 2007;25:1
43. Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, et al, 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369:29-36.
44. Piccart-Gebhart, MJ, Martine J. Piccart-Gebhart, M.D., Ph.D., Marion Procter, M.Sci., Brian Leyland-Jones, M.D., Ph.D., Aron Goldhirsch, M.D., Michael Untch, M.D., Ian Smith, M.D., et al, Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer *N Eng J Med* 2005; 353:1659-72.
45. Barbareschi M. Prognostic value of the immunohistochemical expression of p53 in breast carcinomas: a review of the literature involving over 9,000 patients. *Appl Immunohistochem* 2002; 4:106–116.
46. Blaszyk H, Hartmann A, Cunningham JM, Schaid D, Wold LE, Kovach JS, Sommer SS. A prospective trial of Midwest breast cancer patients: a p53 gene mutation is the most important predictor of adverse outcome. *Int J Cancer* 2000; 89:32–38.

47. Borresen AL, Andersen TI, Eyfjord JE, Cornelis RS, Thorlacius S, Borg A, Johansson U, Theillet C, Scherneck S, Hartman S. TP53 mutations and breast cancer prognosis: particularly poor survival rates for cases with mutations in the zincbinding domains. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 14:71–75.
48. Bergh J, Norberg T, Sjogren S, Lindgren A, Holmberg L. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* 1995; 1:1029–1034.
49. Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, Lillehaug JR, Akslen LA, Borresen-Dale AL. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61:2505–2512.
50. Norberg T, Lennerstrand J, Inganas M, Bergh J. Comparison between p53 protein measurements using the luminometric immunoassay and immunohistochemistry with detection of p53 gene mutations using cDNA sequencing in human breast tumors. *Int J Cancer* 1998; 79:376–383.
51. Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, Wenzel C, Schlagbauer-Wadl H, Mittlbock M, Gnant M, Steger G, Jakesz R. TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 50–56.
52. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 2003; 283(1): 1-16.
53. Boujrad H, Gubkina O, Robert N, Krantic S, Susin SA. AIFmediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. *Cell Cycle* 2007; 6(21): 2612-9.
54. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a wellorchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757(9-10): 1371-87.
55. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007; 32(1): 37-43.
56. Steinbach JP, Klumpp A, Wolburg H, Weller M. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling protects human malignant glioma cells from hypoxia-induced cell death. *Cancer Res* 2004; 64(5): 1575-8.

57. Carretero J, Medina PP, Blanco R, Smit L, Tang M, Roncador G, et al. Dysfunctional AMPK activity, signalling through mTOR and survival in response to energetic stress in LKB1-deficient lung cancer. *Oncogene* 2007; 26(11): 1616-25.
58. Ginouves A, Ilc K, Macias N, Pouyssegur J, Berra E. PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIFalpha and protects cells from necrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(12): 4745-50.
59. Bras M, Yuste VJ, Roue G, Barbier S, Sancho P, Virely C, et al. Drp1 Mediates Caspase-Independent Type III Cell Death in Normal and Leukemic Cells. *Mol Cell Biol* 2007; 27(20): 7073-88.
60. Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev* 2004; 18(11): 1272-82.
61. Scholz C, Wieder T, Starck L, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Dorken B, et al. Arsenic trioxide triggers a regulated form of caspase-independent necrotic cell death via the mitochondrial death pathway. *Oncogene* 2005; 24(11): 1904-13.
62. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1776(1): 86-107.
63. Kallio A, Zheng A, Dahllund J, Heiskanen KM, Harkonen P. Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis* 2005; 10(6): 1395-410.
64. Zheng A, Kallio A, Harkonen P. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signalregulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. *Endocrinology* 2007; 148(6): 2764-77.
65. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R. Role of noncanonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ* 2008; 15(8): 1318-29.
66. Li L, Han W, Gu Y, Qiu S, Lu Q, Jin J, et al. Honokiol induces a necrotic cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Cancer Res* 2007; 67(10): 4894-903.
67. Han W, Li L, Qiu S, Lu Q, Pan Q, Gu Y, et al. Shikonin circumvents cancer drug resistance by induction of a necroptotic death. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(5): 1641-9.

68. Seluanov A, Gorbunova V, Falcovitz A, Sigal A, Milyavsky M, Zurer I, et al. Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Mol Cell Biol* 2001; 21(5): 1552-64.
69. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.
70. Dinnen RD, Drew L, Petrylak DP, Mao Y, Cassai N, Szmulewicz J, et al. Activation of targeted necrosis by a p53 peptide: a novel death pathway that circumvents apoptotic resistance. *J Biol Chem* 2007; 282(37): 26675-86.
71. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006; 10(1): 51-64.
72. Gurova KV, Gudkov AV. Paradoxical role of apoptosis in tumor progression. *J Cell Biochem* 2003; 88(1): 128-37.
73. Gurova KV, Kwek SS, Koman IE, Komarov AP, Kandel E, Nikiforov MA, et al. Apoptosis inhibitor as a suppressor of tumor progression: expression of Bcl-2 eliminates selective advantages for p53-deficient cells in the tumor. *Cancer Biol Ther* 2002; 1(1): 39-44.
74. Jin S, DiPaola RS, Mathew R, White E. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 3): 379-83.
75. Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy* 2007; 3(1): 28-31.
76. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006; 10(1): 51-64.
77. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 2007; 21(13): 1621-35.
78. Vakkila J, Lotze MT. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(8): 641-8.
79. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 2007; 117(5): 1175-83.

80. Ullrich E, Bonmort M, Mignot G, Kroemer G, Zitvogel L. Tumor stress, cell death and the ensuing immune response. *Cell Death Differ* 2008; 15(1): 21-8.
81. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, Lidereau R, et al. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 2007; 220(1): 47-59.
82. Zitvogel L, Kroemer G. Death, danger, and immunity: an infernal trio. *Immunol Rev* 2007; 220(1): 5-7.
83. Ullrich E, Bonmort M, Mignot G, Kroemer G, Zitvogel L. Tumor stress, cell death and the ensuing immune response. *Cell Death Differ* 2008; 15(1): 21-8.
84. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, Lidereau R, et al. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 2007; 220(1): 47-59.
85. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007; 13(9): 1050-9.
86. Amaravadi RK, Thompson CB. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2007; 13(24): 7271-9.
87. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*.1995;1:27–31.
88. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86:353–364
89. Skobe M, Rockwell P, Goldstein N, Vosseler S, Fusenig NE. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat Med*. 1997;3:1222–1227.
90. Brem SS, Jensen HM, Gullino PM. Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. *Cancer*. 1978;41:239–244.
91. ensen HM, Chen I, De VM, Lewis AE. Angiogenesis induced by 'normal' human breast tissue: a probable marker for precancer. *Science*. 1982;218:293–295.
92. Lichtenbeld HC, Barendsz-Janson AF, van Essen H, Struijker Boudier H, Griffioen AW, Hillen HF. Angiogenic potential of malignant and non-malignant human breast tissues in an in vivo angiogenesis model. *Int J Cancer*. 1998;77:455–459.

93. Deng G, Lu Y, Zlotnikov G, Thor A, Smith HS. Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science*. 1996;274:2057–2059.
94. Engels K, Fox SB, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Distinct angiogenic patterns are associated with high-grade in situ ductal carcinomas of the breast. *J Pathol*. 1997;181:207–212.
95. Guidi A, Fischer L, Harris J, Schnitt S. Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86:614–619.
96. Marson LP, Kurian KM, Miller WR, Dixon JM. The effect of tamoxifen on breast tumour vascularity. *Breast Cancer Res Treat*. 2001;66:9–15.
97. Gasparini G, Fox SB, Verderio P, Bonoldi E, Bevilacqua P, Boracchi P, Dante S, Marubini E, Harris AL. Determination of angiogenesis adds information to estrogen receptor status in predicting the efficacy of adjuvant tamoxifen in node-positive breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 1996;2:1191–1198.
98. Macaulay V, Fox SB, Zhang H, Whitehouse RM, Leek RD, Gatter K, Bicknell R, Harris AL. Breast cancer angiogenesis and tamoxifen resistance. *Endocr Rel Cancer*. 1995;2:1–8.
99. Gasparini G, Toi M, Verderio P, Ranieri G, Dante S, Bonoldi E, Boracchi P, Fanelli M, Tominaga T. Prognostic significance of p53, angiogenesis, and other conventional features in operable breast cancer: subanalysis in node-positive and node-negative patients. *Int J Oncol*. 1998;12:1117–1125.
100. Gasparini G, Biganzoli E, Bonoldi E, Morabito A, Fanelli M, Boracchi P. Angiogenesis sustains tumor dormancy in patients with breast cancer treated with adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2001;65:71–75.
101. Fox SB, Leek RD, Bliss J, Mansi JL, Gusterson B, Gatter KC, Harris AL. Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:1044–1049.
102. Fox SB. Quantitative angiogenesis in breast cancer. *Methods Mol Med*. 2006;120:161–187.
103. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res*. 2004;64:2941–2955.

104. Arbiser JL, Moses MA, Fernandez CA, Ghiso N, Cao Y, Klauber N, Frank D, Brownlee M, Flynn E, Parangi S, Byers HR, Folkman J. Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:861–866.
105. Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:3609–3614.
106. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994;59:483–489.
107. Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J, Iruela-Arispe ML. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:12485–12490.
108. Vaupel P, Mayer A, Briest S, Hockel M. Hypoxia in breast cancer: role of blood flow, oxygen diffusion distances, and anemia in the development of oxygen depletion. *Adv Exp Med Biol*. 2005;566:333–342.
109. Harris AL. Hypoxia: a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:38–47.
110. Maxwell PH. The HIF pathway in cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16:523–530.
111. Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer*. 2003;97:1573–1581.
112. Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M, Jakesz R, Kubista E, Birner P, Oberhuber G, Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an

- unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.*2002;8:1831–1837.
113. Trastour C, Benizri E, Ettore F, Ramaioli A, Chamorey E, Pouysségur J, Berra E. HIF-1alpha and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome. *Int J Cancer.* 2007;120:1451–1458.
114. Dales JP, Garcia S, Meunier-Carpentier S, Andrac-Meyer L, Haddad O, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha predicts early relapse in breast cancer: retrospective study in a series of 745 patients. *Int J Cancer.* 2005;116:734–739.
115. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.*2003;17:271–273.
116. Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EH, Kondo Y, Hara S, Conaway RC, Conaway JW, Ohh M. Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem.* 2003;278:11032–11040.
117. Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol.*2005;25:5675–5686.
118. Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest.*2007;117:862–865.
119. Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. Hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) induces angiogenesis in breast carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006;14:78–82.
120. Leek RD, Talks KL, Pezzella F, Turley H, Campo L, Brown NS, Bicknell R, Taylor M, Gatter KC, Harris AL. Relation of hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) expression in tumor-infiltrative macrophages to tumor angiogenesis and the oxidative thymidine phosphorylase pathway in Human breast cancer. *Cancer Res.*2002;62:1326–1329.

121. Fox SB. Quantitative angiogenesis in breast cancer. *Methods Mol Med.*2006;120:161–187.
122. Hlatky L, Hahnfeltd P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:883–893.
123. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen consumption and tissue oxygenation of human tumors. *Adv Exp Med Biol.* 1990;277:895–905.
124. Fox SB, Gatter KC, Bicknell R, Going JJ, Stanton P, Cooke TG, Harris AL. Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. *Cancer Res.* 1993;53:4161–4163.
125. Kakolyris S, Giatromanolaki A, Koukourakis M, Leigh IM, Georgoulas V, Kanavaros P, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL. Assessment of vascular maturation in non-small cell lung cancer using a novel basement membrane component, LH39: correlation with p53 and angiogenic factor expression. *Cancer Res.* 1999;59:5602–5607.
126. Kakolyris S, Fox SB, Koukourakis M, Giatromanolaki A, Brown N, Leek RD, Taylor M, Leigh IM, Gatter KC, Harris AL. Relationship of vascular maturation in breast cancer blood vessels to vascular density and metastasis, assessed by expression of a novel basement membrane component, LH39. *Br J Cancer.* 2000;82:844–851-50.
127. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science.* 1999;284:1994–1998.
128. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene.* 1999;18:5356–5362.
129. Patan S, Munn LL, Jain RK. Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc Res.*1996;51:260–272.
130. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol.* 2000;50:1–15.
131. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Wagner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for

- postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.*1999;85:221–228.
132. Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL, Kähler CM, Grünewald K, Stockhammer G, Gabl C, Dirnhofer S, Clausen J, Gastl G. Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet.*2000;355:1688–1691.
133. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest.*2000;105:17–19.
134. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999;18:3964–3972.
135. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, Antin JH, Myerson D, Hamilton SR, Vogelstein B, et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med.* 2005;11:261–262.
136. Young PP, Vaughan DE, Hatzopoulos AK. Biologic properties of endothelial progenitor cells and their potential for cell therapy. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007;49:421–429.
137. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.*2001;7:1194–1201.
138. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, Schaper W. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res.* 2004;94:230–238.
139. Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, Jaggi JS, Bambino K, Gupta S, Heikamp E, McDevitt MR, Scheinberg DA, Benezra R, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev.* 2007;21:1546–1558.
140. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell.* 2006;124:175–189.

141. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.* 2004;10:858–864.
142. Shirakawa K, Wakasugi H, Heike Y, Watanabe I, Yamada S, Saito K, Konishi F. Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Int J Cancer.* 2002;99:821–828.
143. Brat DJ, Van Meir EG. Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research. *Am J Pathol.* 2001;158:789–796.
144. Straume O, Chappuis PO, Salvesen HB, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Goffin JR, Bégin LR, Foulkes WD, Akslen LA. Prognostic importance of glomeruloid microvascular proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers. *Cancer Res.* 2002;62:6808–6811.
145. Sundberg C, Nagy JA, Brown LF, Feng D, Eckelhoefer IA, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery. *Am J Pathol.* 2001;158:1145–1160.
146. Zhang HT, Scott PA, Morbidelli L, Peak S, Moore J, Turley H, Harris AL, Ziche M, Bicknell R. The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. *Br J Cancer.* 2000;83:63–68.
147. Dome B, Hendrix MJ, Paku S, Tovari J, Timar J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol.* 2007;170:1–15.
148. Sood AK, Seftor EA, Fletcher MS, Gardner LM, Heidger PM, Buller RE, Seftor RE, Hendrix MJ. Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol.* 2001;158:1279–1288.
149. Shirakawa K, Wakasugi H, Heike Y, Watanabe I, Yamada S, Saito K, Konishi F. Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Int J Cancer.* 2002;99:821–828.
150. Warren B. The vascular morphology of tumors. In: Peterson H, editor. *Tumor Blood Circulation.* Boca Raton, FL: CRC Press; 1979. pp. 1–47.

151. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:14608–14613.
152. Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol*. 2000;156:361–381.
153. McDonald DM, Munn L, Jain RK. Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant? *Am J Pathol*. 2000;156:383–388.
154. Greenblatt M, Shubik P. Tumour angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst*. 1968;41:111–124.
155. Ehrmann RL, Knoth M. Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *J Natl Cancer Inst*. 1968;41:1329–1341.
156. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*. 1971;133:275–288.
157. Neufeld G, Kessler O. Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25:373–385.
158. Roskoski R., Jr Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;62:179–213.
159. Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res*. 1997;57:963–969.
160. Fox SB, Gasparini G, Harris AL. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol*. 2001;2:278–289. doi: 10.1016/S1470-2045(00)00323-5.
161. Nikitenko LL, Fox SB, Kehoe S, Rees MC, Bicknell R. Adrenomedullin and tumour angiogenesis. *Br J Cancer*. 2006;94:1–7.

162. Engels K, Fox SB, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Up-regulation of thymidine phosphorylase expression is associated with a discrete pattern of angiogenesis in ductal carcinomas in situ of the breast. *J Pathol.* 1997;182:414–420.
163. Fox SB, Westwood M, Moghaddam A, Comley M, Turley H, Whitehouse RM, Bicknell R, Gatter KC, Harris AL. The angiogenic factor platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase is up-regulated in breast cancer epithelium and endothelium. *Br J Cancer.* 1996;73:275–280.
164. Roskoski R., Jr Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007;62:179–213.
165. Bielenberg DR, Pettaway CA, Takashima S, Klagsbrun M. Neuropilins in neoplasms: expression, regulation, and function. *Exp Cell Res.* 2006;312:584–593.
166. Roskoski R., Jr Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007;62:179–213.
167. Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, Mikami Y, Tanaka K, Yamamoto S, Sonoo H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. *Jpn J Cancer Res.* 1999;90:977–981.
168. Okada K, Osaki M, Araki K, Ishiguro K, Ito H, Ohgi S. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha), VEGF-C and VEGF-D in non-invasive and invasive breast ductal carcinomas. *Anticancer Res.* 2005;25:3003–3009.
169. Gunningham SP, Currie MJ, Han C, Robinson BA, Scott PA, Harris AL, Fox SB. The short form of the alternatively spliced flt-4 but not its ligand VEGF-C is related to lymph node metastasis in human breast cancers. *Clin Cancer Res.* 2000;6:4278–4286.
170. Currie MJ, Hanrahan V, Gunningham SP, Morrin HR, Frampton C, Han C, Robinson BA, Fox SB. Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with hypoxia inducible factor (HIF-1alpha) and the HIF-1alpha target gene DEC1, but not lymph node metastasis in primary human breast carcinomas. *J Clin Pathol.* 2004;57:829–834.
171. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yang Q, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up. *Clin Cancer Res.* 2003;9:716–721.

172. Kinoshita J, Kitamura K, Kabashima A, Saeki H, Tanaka S, Sugimachi K. Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2001;66:159–164.
173. Yang W, Klos K, Yang Y, Smith TL, Shi D, Yu D. ErbB2 overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial growth factors A, C, and D in human breast carcinoma. *Cancer.* 2002;94:2855–2861.
174. Mylona E, Alexandrou P, Giannopoulou I, Liapis G, Sofia M, Keramopoulos A, Nakopoulou L. The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2007;104:557–563.
175. Griffioen AW and Molema G: Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 52: 237-268, 2000.
176. Folkman J, Watson K, Ingber D and Hanahan D: Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339: 58-61, 1989.
177. Endoglin (CD105): A Review of its Role in Angiogenesis and Tumor Diagnosis, Progression and Therapy. *ANTICANCER RESEARCH* 31: 2283-2290 (2011)).
178. Wong SH, Hamel L, Chevalier S and Philip A: Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF-beta signalling receptors. *Eur J Biochem* 267: 5550-5560, 2000.
179. Blobel GC, Schiemann WP and Lodish HF: Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342: 1350- 1358, 2000.
180. Govinden R and Bhoola KD: Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 98: 257-265, 2003.
181. Zhu HJ and Burgess AW: Regulation of transforming growth factor-beta signaling. *Mol Cell Biol Res Commun* 4: 321-330, 2001.
182. Hata A, Shi Y and Massague J: TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today* 4: 257-262, 1998.
183. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J and Letarte M: Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267: 19027-19030, 1992.

184. Barbara NP, Wrana JL and Letarte M: Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 274: 584-594, 1999.
185. Massague J and Wotton D: Transcriptional control by the TGFbeta/ Smad signaling system. *EMBO J* 19: 1745-1754, 2000.
186. Bellon T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S, Cheifetz S, Massague J, Letarte M and Bernabeu C: Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* 23: 2340-2345, 1993.
187. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J and Letarte M: Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267: 19027-19030, 1992.
188. Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A and Bernabeu C: Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 277: 29197-29209, 2002.
189. Lastres P, Martin-Perez J, Langa C and Bernabeu C: Phosphorylation of the human-transforming growth factorbeta- binding protein endoglin. *Biochem J* 301(Pt 3): 765-768, 1994.
190. Wang JM, Kumar S, Pye D, Haboubi N and al-Nakib L: Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 86: 386-388, 1994.
191. Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S, Natali PG and Maio M: Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol* 188: 1-7, 2001.
192. Li C, Guo B, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N and Kumar S: Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer* 89: 122- 126, 2000.
193. Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB and Wendel DP: Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284: 1534-1537, 1999.

194. Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, Sedlacek HH, Muller R and Adamkiewicz J: Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer* 81: 568-572, 1999.
195. Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C and Kumar S: CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* 14: 55-64, 2000.
196. Choi KS, Bae MK, Jeong JW, Moon HE and Kim KW: Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol* 36: 120-127, 2003.
197. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C and Bernabeu C: Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* 277: 43799-43808, 2002.
198. Tian F, Zhou AX, Smits AM, Larsson E, Goumans MJ, Heldin CH, Boren J and Akyurek LM: Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 392: 283-288, 2010.
199. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES and Thorpe PE: Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1: 1623-1634, 1995.
200. Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, Sedlacek HH, Muller R and Adamkiewicz J: Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer* 81: 568-572, 1999.
201. Wang JM, Kumar S, Pye D, Haboubi N and al-Nakib L: Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 86: 386-388, 1994.
202. Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ and Ellis LM: Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res* 14: 1931-1937, 2008.

203. Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniewska K and Harris AL: Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 340: 1120-1124, 1992.
204. Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K and Hughes LE: The prognostic significance of tumor vascularity in intermediatethickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am J Pathol* 133: 419-423, 1988.
205. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M and Shimomatsuya T: Association of tumour vasculature with tumour progression and overall survival of patients with non-early gastric carcinomas. *Br J Cancer* 75: 566-571, 1997.
206. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S and Gasparini G: Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 84: 1875-1887, 1992.
207. Page DL and Jensen RA: Angiogenesis in human breast carcinoma: What is the question? *Hum Pathol* 26: 1173-1174, 1995.
208. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL and Dirix LY: Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 32A: 2474-2484, 1996.
209. Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, Kimura Y, Kinoshita J, Miyazaki M and Abe T: Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery* 131(1 Suppl): S109-S113, 2002.
210. Behrem S, Zarkovic K, Eskinja N and Jonjic N: Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma. *Croat Med J* 46: 417-422, 2005.
211. Yao Y, Kubota T, Takeuchi H and Sato K: Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody. *Neuropathology* 25: 201-206, 2005.
212. Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM and Bundred N: Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res* 59: 856-861, 1999.

213. Tabata M, Kondo M, Haruta Y and Seon BK: Antiangiogenicradioimmunotherapy of human solid tumors in SCID mice using (125)I-labeled anti-endoglin monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 82: 737-742, 1999.
214. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yamada T, Hanaoka N, Inui K and Wada H: Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res* 7: 3410-3415, 2001.
215. Yao Y, Pan Y, Chen J, Sun X, Qiu Y and Ding Y: Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of primary hepatocellular carcinomas: analysis using tissue microarrays and comparisons with CD34 and VEGF. *Ann Clin Lab Sci* 37: 39-48, 2007.
216. Yao Y, Kubota T, Takeuchi H and Sato K: Prognostic significance of microvessel density determined by an anti- CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody. *Neuropathology* 25: 201-206, 2005.
217. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yamada T, Hanaoka N, Inui K and Wada H: Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res* 7: 3410-3415, 2001.
218. Wikstrom P, Lissbrant IF, Stattin P, Egevad L and Bergh A: Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate* 51: 268-275, 2002.
219. Schimming R and Marme D: Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 24: 151- 156, 2002.
220. Brewer CA, Setterdahl JJ, Li MJ, Johnston JM, Mann JL and McAsey ME: Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. *Obstet Gynecol* 96: 224-228, 2000.
221. Behrem S, Zarkovic K, Eskinja N and Jonjic N: Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma. *Croat Med J* 46: 417-422, 2005.
222. Pizarro CB, Oliveira MC, Pereira-Lima JF, Leaes CG, Kramer CK, Schuch T, Barbosa-Coutinho LM and Ferreira NP: Evaluation of angiogenesis in 77 pituitary adenomas using endoglin as a marker. *Neuropathology* 29: 40-44, 2009.

223. Ho JW, Poon RT, Sun CK, Xue WC and Fan ST: Clinicopathological and prognostic implications of endoglin (CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver. *World J Gastroenterol* 11: 176-181, 2005.
224. Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C and Kumar S: CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* 14: 55-64, 2000.
225. Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y, Tsai H and Seon BK: Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res* 7: 524-532, 2001.
226. Mysliwiec P, Pawlak K, Kuklinski A and Kedra B: Combined perioperative plasma endoglin and VEGF – a assessment in colorectal cancer patients. *Folia Histochem Cytobiol* 47: 231- 236, 2009.
227. Marioni G, D’Alessandro E, Giacomelli L and Staffieri A: CD105 is a marker of tumour vasculature and a potential target for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 39: 361-367, 2010.
228. Miller FR, Miller BE, Heppner GH: Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion Metastasis* 1983, 3(1):22-31.
229. Miller FR: Tumor subpopulation interactions in metastasis. *Invasion Metastasis* 1983, 3(4):234-242.
230. Yoneda T, Michigami T, Yi B, Williams PJ, Niewolna M, Hiraga T: Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. *Cancer* 2000, 88(12 Suppl):2979-2988.
231. Aslakson CJ, Miller FR: Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* 1992, 52(6):1399-1405.
232. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S: Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. *Cancer Res* 1998, 58(7):1486-1493

233. Eckhardt BL, Parker BS, van Laar RK, Restall CM, Natoli AL, Tavarria MD, Stanley KL, Sloan EK, Moseley JM, Anderson RL: Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix. *Mol Cancer Res* 2005, 3(1):1-13.
234. Tao K, Li J, Warner J, MacLeod K, Miller FR, Sahagian GG: Multiple lysosomal trafficking phenotypes in metastatic mouse mammary tumor cell lines. *Int J Oncol* 2001, 19(6):1333-1339.
235. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer Kai Tao†1, Min Fang†1, Joseph Alroy2 and G Gary Sahagian. *BMC Cancer* 2008, 8:228 doi:10.1186/1471-2407-8-228.
236. Yoneda T, Michigami T, Yi B, Williams PJ, Niewolna M, Hiraga T: Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. *Cancer* 2000, 88(12 Suppl):2979-2988.
237. Lelekakis M, Moseley JM, Martin TJ, Hards D, Williams E, Ho P, Lowen D, Javni J, Miller FR, Slavin J, Anderson RL: A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis* 1999, 17(2):163-170.
238. Alberts B, Johnson A, Lewis J. Chapter 8: Manipulating proteins, DNA and RNA. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J. *Molecular Biology of the Cell*. Fifth edition Science Taylor & Francis Group 2007; 501-578.
239. Alberts B, Johnson A, Lewis J. Chapter 5: DNA replication, repair and recombination. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J. *Molecular Biology of the Cell*. Fifth edition Science Taylor & Francis Group 2007; 263-328.
240. Smith CM. Technical Knockout: Gene-targeting strategies provide an avenue for studying gene function. *The Scientist* 2000; 14: 32.
241. Rutherford A. The life history of the mouse in genetics. *Nature* 2002; 420: 510
242. Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Jolin HE, McKenzie AN. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* 2000; 191: 1069-1076.
243. Tago K, Noda T, Hayakawa M, Iwahana H, Yanagisawa K, Yashiro T, Tominaga S. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 3;285(5):1377-83.

244. Carlsson G, Ekelund L, Stigsson L, Hafström L. Vascularization and tumour volume estimations of solitary liver tumours in rats. *Ann Chir Gynaecol.* 1983;72(4):187-91.
245. Milosavljevic MZ, Jovanovic IP, Pejnovic NN, Mitrovic SL, Arsenijevic NN, Simovic Markovic BJ, Lukic ML. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. *Oncotarget.* 2016 Feb 23. doi: 10.18632/oncotarget.7635.
246. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, Lukic ML, Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells, *Int. J. Cancer* 134 (2014) 1669–1682.
247. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Juranic VL, McKenzie AN, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol.* 2011 Jul;41(7):1902-12.
248. Rydén L, Jirström K, Haglund M, Stål O, Fernö M. Epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor 2 are specific biomarkers in triple-negative breast cancer. Results from a controlled randomized trial with long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 120: 491-8.
249. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991; 324: 1-8.
250. Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW et al. A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1982; 45; 361-6.
251. Galea MH, Blamey RW, Elston CE et al. The Nottingham prognostic index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 22:207-19.
252. Sjögren S, Inganas M, Lindgren L et al. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol* 1998; 16: 462-9.
253. Liu J, Shen JX, Hu JL, Huang WH, Zhang GJ. Significance of interleukin-33 and its related cytokines in patients with breast cancers. *Front Immunol.* 2014 Apr 7;5:141.

254. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer*. 1999; 79: 991-5.
255. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Juranic VL, McKenzie AN, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol*. 2011; 41: 1902-12.
256. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, Lukic ML. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int. J. Cancer*. 2014; 134: 1669-82.
257. Richards CH, Mohammed Z, Qayyum T, Horgan PG, McMillan DC. The prognostic value of histological tumor necrosis in solid organ malignant disease: a systematic review. *Future Oncol*. 2011; 7: 1223-35.
258. Gkogkou C, Frangia K, Saif MW, Trigidou R, Syrigos K. Necrosis and apoptotic index as prognostic factors in non-small cell lung carcinoma: a review. *Springerplus*. 2014; 3: 120.
259. Proskuryakov SY, Gabai VL. Mechanisms of Tumor Cell Necrosis. *Curr Pharm Des*. 2010; 16: 56-68.
260. Jin S, DiPaola RS, Mathew R, White E. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci*. 2007; 120: 379-83.
261. Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy*. 2007; 3: 28-31.
262. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1776: 86-107.
263. Kallio A, Zheng A, Dahllund J, Heiskanen KM, Härkönen P. Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis*. 2005; 10: 1395-410.
264. Zheng A, Kallio A, Härkönen P. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signalregulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. *Endocrinology*. 2007; 148: 2764-77.
265. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R. Role of noncanonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ*. 2008; 15: 1318-29.
266. Li L, Han W, Gu Y, Qiu S, Lu Q, Jin J, Luo J, Hu X. Honokiol induces a necrotic cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Cancer Res*. 2007; 67: 4894-903.
267. Han W, Li L, Qiu S, Lu Q, Pan Q, Gu Y, Luo J, Hu X. Shikonin circumvents cancer drug resistance by induction of a necroptotic death. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6: 1641-9.
268. Prewett M, Huber J, Li Y, Santiago A, O'Connor W, King K, Overholser J, Hooper A, Pytowski B, Witte L, Bohlen P, Hicklin DJ. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res*. 1999; 59: 5209-18.
269. Benjamin LE, Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 8761-6.
270. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer*. 1999; 79: 991-5.

271. Vakkila J, Lotze MT. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 641-8.
272. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med.* 2000; 191: 423-34.
273. Choi YS, Choi HJ, Min JK, Pyun BJ, Maeng YS, Park H, Kim J, Kim YM, Kwon YG. Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. *Blood.* 2009; 114: 3117-26.
274. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer.* 1999; 79: 991-5.
275. Theoharides TC, Zhang B, Kempuraj D, Tagen M, Vasiadi M, Angelidou A, Alysandratos KD, Kalogeromitros D, Asadi S, Stavrianeas N, Peterson E, Leeman S, Conti P. IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 4448-53.
276. Stojkovic S, Kaun C, Heinz M, Krychtiuk KA, Rauscher S, Lemberger CE, de Martin R, Gröger M, Petzelbauer P, Huk I, Huber K, Wojta J, Demyanets S. Interleukin-33 induces urokinase in human endothelial cells--possible impact on angiogenesis. *J Thromb Haemost.* 2014; 12: 948-57.
277. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello CA, Apte RN. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 2645-50.
278. Ågerstam H, Karlsson C, Hansen N, Sandén C, Askmyr M, von Palffy S, Högberg C, Rissler M, Wunderlich M, Juliusson G, Richter J, Sjöström K, Bhatia R et al. Antibodies targeting human IL1RAP (IL1R3) show therapeutic effects in xenograft models of acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112: 10786-91.

279. Carmi Y, Dotan S, Rider P, Kaplanov I, White MR, Baron R, Abutbul S, Huszar M, Dinarello CA, Apte RN, Voronov E. The role of IL-1beta in the early tumor cell-induced angiogenic response. *J Immunol.* 2013; 190: 3500-9.
280. Carmi Y, Voronov E, Dotan S, Lahat N, Rahat MA, Fogel M, Huszar M, White MR, Dinarello CA, Apte RN. The role of macrophage-derived IL-1 in induction and maintenance of angiogenesis. *J Immunol.* 2009; 183: 4705-14.
281. Lopetuso LR, Scaldaferrri F, Pizarro TT. Emerging role of the interleukin (IL)-33/ST2 axis in gut mucosal wound healing and fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* (2012) 5(1):18.doi:10.1186/1755-1536-5-18.
282. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *NatRevImmunol* (2010) 10(2):103–10.doi:10.1038/nri2692.
283. Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, et al. Protective role of IL-33/ST2 axis in ConA - induced hepatitis. *J Hepatol* (2012) 56(1):26–33.doi:10.1016/j.jhep.2011.03.022.
284. Kamijo S, Takeda H, Tokura T, Suzuki M, Inui K, Hara M. IL-33-mediated innate response and adaptive immune cells contribute to maximum responses of protease allergen-induced allergic airway inflammation. *J Immunol* (2013) 190(9):4489–99. doi:10.4049/jimmunol.1201212.
285. Ciccia F, Alessandro R, Rizzo A, Raimondo S, Giardina A, Raiata F, et al. IL-33 is overexpressed in the inflamed arteries of patients with giant cell arteritis. *Ann RheumDis* (2013) 72(2):258–64.doi:10.1136/annrheumdis-2012-201309.
286. Dong R, Dong K, Wang X, Chen G, Shen C, Zheng S. Interleukin-33 overexpression is associated with gamma-glutamyl transferase in biliary atresia. *Cytokine* (2013) 61(2):433–7.doi:10.1016/j.cyto.2012.10.035.
287. Byers DE, Alexander-Brett J, Patel AC, Agapov E, Dang-VuG, JinX, et al. Long-term IL-33-producing epithelial progenitor cells in chronic obstructive lung disease. *J ClinInvest* (2013) 123(12):5410.doi:10.1172/JCI65570
288. Gillibert-Duplantier J, Duthey B, Sisirak V, Salaun D, Gargi T, Tredan O, et al. Gene expression profiling identifies ST2 as an effector of ErbB2-driven breast carcinoma cell motility, associated with metastasis. *Oncogene* (2012) 31(30):3516–24.doi:10.1038/onc.2011.525.

289. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Juranic VL, McKenzie AN, Arsenijevic N, et al. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *EurJImmunol* (2011) 41(7):1902–12. doi:10.1002/eji. 201141417.
290. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, et al. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer* (2013) 134(7):1669–82. doi:10.1002/ijc.28481.
291. Chen SF, Nieh S, Jao SW, Wu MZ, Liu CL, Chang YC, et al. The paracrine effect of cancer-associated fibroblast-induced interleukin-33 regulates the invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* (2013) 231(2):180–9. doi:10.1002/path.4226.
292. Cochaud S, Giustiniani J, Thomas C, Laprevotte E, Garbar C, Savoye AM, et al. IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2. *SciRep* (2013) 3:3456. doi:10.1038/srep03456.
293. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, et al. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer* (2013) 134(7):1669–82. doi:10.1002/ijc.28481.
294. Blood CH and Zetter BR (1990) Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1032: 89–118.
295. Helmlinger G, Yuar F, Dellian M and Jain RK (1997) Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature Med* 3: 177–182.
296. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD and Semenza GL (1996) Activation of vascular endothelial growth-factor gene-transcription by hypoxia-inducible factor-1. *Mol Cell Biol* 16: 4604–4613.
297. Dachs GU and Stratford IJ (1996) The molecular response of mammalian-cells to hypoxia and the potential for exploitation in cancer therapy. *Br J Cancer* 74: S126–S132.
298. Plate KH and Warnke PC (1997) Vascular endothelial growth factor. *J Neurooncol* 35: 365–372.

299. p53 and breast cancer, an update. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Jun; 13(2):293-325.
300. Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, De Vita F, Castellano P et al. Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 3490–3499.
301. Elsaleh H, Powell B, McCaul K, Grieu F, Grant R, Joseph D, Iacopetta B. p53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2001; 7: 1343–1349.
302. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Cancer Genome Atlas Network Nature*. 2012 Oct 4; 490(7418):61-70.
303. Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Zhang Z, Kobayashi S, Iwase H *Breast Cancer Res*. 2004; 6(1):R24-30.
304. p53 protein accumulation predicts resistance to endocrine therapy and decreased post-relapse survival in metastatic breast cancer. Yamashita H, Toyama T, Nishio M, Ando Y, Hamaguchi M, Zhang Z, Kobayashi S, Fujii Y, Iwase H *Breast Cancer Res*. 2006; 8(4):R48.
305. Yagami A., Orihara K., Morita H., Futamura K., Hashimoto N., Matsumoto K., et al. (2010). IL-33 mediates inflammatory responses in human lung tissue cells. *J. Immunol.*185, 5743–575010.
306. Hepworth MR, Hartmann S. Worming our way closer to the clinic. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2012 Jul 15;2:187-90.
307. Arshad MI, Piquet-Pellorce C, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Patrat-Delon S, Ezan F, Lucas-Clerc C, Nabti S, Lehuen A, Cubero FJ, Girard JP, Trautwein C, Samson M. TRAIL but not FasL and TNF α , regulates IL-33 expression in murine hepatocytes during acute hepatitis. *Hepatology*. 2012 Dec;56(6):2353-62
308. Arshad MI, Rauch M, L'helgoualc'h A, Julia V, Leite-de-Moraes MC, Lucas-Clerc C, Piquet-Pellorce C, Samson M. NKT cells are required to induce high IL-33 expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. *Eur J Immunol*. 2011 Aug;41(8):2341-8.
309. Sakai N, Van Sweringen HL, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, Tevar AD, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-33 is hepatoprotective during liver ischemia/reperfusion in mice. *Hepatology*. 2012 Oct;56(4):1468-78.

310. Katkoori VR, Shanmugam C, Jia X et al (2012) Prognostic significance and gene expression profiles of p53 mutations in microsatellite-stable stage III colorectal adenocarcinomas. *PLoS One* 7, e30020.
311. Serum soluble ST2 is associated with ER-positive breast cancer. Da-peng Lu, Xiang-yu Zhou, Lu-tian Yao, Cai-gang Liu, Wei Ma, Feng Jin, and Yun-fei Wu. *BMC Cancer*. 2014; 14: 198.
312. The Association of Serum IL-33 and sST2 with Breast Cancer. Zhi-Ping Yang, Dan-Yan Ling, Yong-Hong Xie, Wan-Xin Wu, Jin-Rui Li, Jin Jiang, Jia-Lian Zheng, Yao-Hua Fan, and Ye Zhang. *olume 2015 (2015)*, Article ID 516895, 6 pages.
313. Serum soluble ST2 is associated with ER-positive breast cancer. Da-peng Lu, Xiang-yu Zhou, Lu-tian Yao, Cai-gang Liu, Wei Ma, Feng Jin, and Yun-fei Wu. *BMC Cancer*. 2014; 14: 198.
314. Gene expression profiling identifies sST2 as an effector of ErbB2-driven breast carcinoma cell motility, associated with metastasis. Gillibert-Duplantier J, Duthey B, Sisirak V, Salaün D, Gargi T, Trédan O, Finetti P, Bertucci F, Birnbaum D, Bendriss-Vermare N, Badache A *Oncogene*. 2012 Jul 26; 31(30):3516-24.
315. Serum soluble ST2 is associated with ER-positive breast cancer. Da-peng Lu, Xiang-yu Zhou, Lu-tian Yao, Cai-gang Liu, Wei Ma, Feng Jin, and Yun-fei Wu. *BMC Cancer*. 2014; 14: 198.
316. (Sahin AA, Ro J, Ro JY, Blick MB, el-Naggar AK, Ordonez NG, Fritsche HA, Smith TL, Hortobagyi GN, Ayala AG. *Cancer*. 1991 Aug 1; 68(3):549-57).
317. H. F. Dvorak, "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 20, no. 21, pp. 4368–4380, 2002.
318. N. Ferrara, K. Houck, L. Jakeman, and D. W. Leung, "Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins," *Endocrine Reviews*, vol. 13, no. 1, pp. 18–32, 1992.
319. Beck PL, Podolsky DK. Growth factors in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5: 44–60.
320. Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669–676.

321. M. Mareel, M. J. Oliveira, and I. Madani, "Cancer invasion and metastasis: interacting ecosystems," *Virchows Archiv*, vol. 454, no. 6, pp. 599–622, 2009.
322. D. J. Hicklin and L. M. Ellis, "Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 5, pp. 1011–1027, 2005.
323. N. Ferrara, H.-P. Gerber, and J. LeCouter, "The biology of VEGF and its receptors," *Nature Medicine*, vol. 9, no. 6, pp. 669–676, 2003.
324. M. Toi, T. Matsumoto, and H. Bando, "Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications," *The Lancet Oncology*, vol. 2, no. 11, pp. 667–673, 2001.
325. Mercurio AM, Lipscomb EA, Bachelder RE. Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005;10:283–290.
326. Barr MP, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JJ. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for breast tumour cells under hypoxia. *Int J Oncol*. 2008;32:41–48.
327. Liang Y, Brekken RA, Hyder SM. Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13:905–919.
328. Rice A, Quinn CM. Angiogenesis, thrombospondin, and ductal carcinoma in situ of the breast. *J Clin Pathol*. 2002;55:569–574.
329. De Paola F, Granato AM, Scarpi E, Monti F, Medri L, Bianchi S, Amadori D, Volpi A. Vascular endothelial growth factor and prognosis in patients with node-negative breast cancer. *Int J Cancer*. 2002;98:228–233.
330. Fuckar D, Dekanic A, Stifter S, Mustac E, Krstulja M, Dobrila F, Jonjic N. VEGF expression is associated with negative estrogen receptor status in patients with breast cancer. *Int J Surg Pathol*. 2006;14:49–55.
331. Kostopoulos I, Arapantoni-Dadioti P, Gogas H, Papadopoulos S, Malamou-Mitsi V, Scopa CD, Markaki S, Karagianni E, Kyriakou V, Margariti A, Kyrkou E, Pavlakis K, Zamboukas T, Skordalaki A, Bourli A, Markopoulos C, Pectasides D, Dimopoulos MA, Skarlos D, Fountzilias G. Evaluation of the prognostic value of HER-2 and VEGF in

- breast cancer patients participating in a randomized study with dose-dense sequential adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;96:251–261.
332. Vogl G, Bartel H, Dietze O, Hauser-Kronberger C. HER2 is unlikely to be involved in directly regulating angiogenesis in human breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006;14:138–145.
333. Kostopoulos I, Arapantoni-Dadioti P, Gogas H, Papadopoulos S, Malamou-Mitsi V, Scopa CD, Markaki S, Karagianni E, Kyriakou V, Margariti A, Kyrkou E, Pavlakis K, Zaramboukas T, Skordalaki A, Bourli A, Markopoulos C, Pectasides D, Dimopoulos MA, Skarlos D, Fountzilas G. Evaluation of the prognostic value of HER-2 and VEGF in breast cancer patients participating in a randomized study with dose-dense sequential adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;96:251–261.
334. Manders P, Beex LV, Tjan-Heijnen VC, Geurts-Moespot J, Van Tienoven TH, Foekens JA, Sweep CG. The prognostic value of vascular endothelial growth factor in 574 node-negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic therapy. *Br J Cancer.* 2002;87:772–778.
335. Ribeiro-Silva A, Ribeiro do Vale F, Zucoloto S. Vascular endothelial growth factor expression in the basal subtype of breast carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2006;125:512–518.
336. Roland CL, Dineen SP, Lynn KD, Sullivan LA, Dellinger MT, Sadegh L, Sullivan JP, Shames DS, Brekken RA. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces angiogenesis and modulates immune cell infiltration of orthotopic breast cancer xenografts. *Mol Cancer Ther.* 2009;8:1761–1771.
337. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D, Davidson NE. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2007;357:2666–2676.
338. Kim MR, Choi HS, Yang JW, Park BC, Kim JA, Kang KW. Enhancement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in tamoxifen-resistant breast cancer cells: role of Pin1 overexpression. *Mol Cancer Ther.* 2009;8:2163–2171.
339. Mukhopadhyay D, Tsiokas L and Sukhatme VP. Wild-type p53 and v-Src exertopposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 1995; 55: 6161–6165.

340. Bouvet M, Ellis LM, Nishizaki M, Fujiwara T, Liu W, Bucana CD et al. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 2288–2292.
341. Fontanini G, Boldrini L, Vignati S, Chine S, Basolo F, Silvestri V et al. Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer* 1998; 34: 718–723.
342. Crew JP, O'Brien T, Bradburn M, Fuggle S, Bicknell R, Cranston D et al. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 5281–5285.
343. Wong SH, Hamel L, Chevalier S, Philip A: Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF-beta signalling receptors. *Eur J Biochem* 267: 5550-5560, 2000.
344. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES, Thorpe PE: Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1: 1623-1634, 1995.
345. Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, Sedlacek H H, Muller R, Adamkiewicz J: Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer* 81: 568-572, 1999.
346. Wikstrom P, Lissbrant IF, Stattin P, Egevad L, Bergh A: Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate* 51: 268-275, 2002.
347. Wikstrom P, Lissbrant IF, Stattin P, Egevad L, Bergh A: Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate* 51: 268-275, 2002.
348. Fonsatti E, Jekunen AP, Kairemo KJ, Coral S, Snellman M, Nicotra MR, Natali P G, Altomonte M, Maio M: Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin Cancer Res* 6: 2037-2043, 2000.

349. Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N: Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res* 59: 856-861, 1999
350. Wang JM, Kumar S, Pye D, Haboubi N, al-Nakib L: Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 86: 386-388, 1994.
351. Denekamp J: Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 9: 267-282, 1990.
352. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M: Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene* 22: 6557-6563, 2003.
353. Ali S. H., O'Donnell A. L., Balu D., Pohl M. B., Seyler M. J., Mohamed S., Mousa S., Dandona P. Estrogen receptor α in the inhibition of cancer growth and angiogenesis. *Cancer Res.*, 60: 7094-7098, 2000.
354. Neovascularization evaluated by CD105 correlates well with prognostic factors in breast cancers. Kun-Ming Rau, Chao-Cheng Huang, Tai-Jan Chiu, Yen-Yang Chen. Chien-Chang Lu Chien-Ting Liu. Sung-Nan Pei Yu-Ching Wei. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE* 4: 231-236, 2012.
355. Vascularization in Primary Breast Carcinomas: Its Prognostic Significance and Relationship with Tumor Cell Dissemination Hari Prasad Dhakal¹, Bjørn aume², Marit Synnestvedt², Elin Borgen¹, Rolf Kaaresen⁴, Ellen Schlichting⁴, Gro iedswang⁴, Assia Bassarova¹, Karl-Erik Giercksky³ and Jahn M. Nesland¹ *Clin Cancer Res* April 15, 2008 14;2341.
356. Vascularization in Primary Breast Carcinomas: Its Prognostic Significance and Relationship with Tumor Cell Dissemination Hari Prasad Dhakal¹, Bjørn aume², Marit Synnestvedt², Elin Borgen¹, Rolf Kaaresen⁴, Ellen Schlichting⁴, Gro iedswang⁴, Assia Bassarova¹, Karl-Erik Giercksky³ and Jahn M. Nesland¹ *Clin Cancer Res* April 15, 2008 14;2341