

ODNOS EKSPRESIJE MATRIKS METALOPROTEINAZE-2 i p63 S PERITUMORSKIM PUKOTINAMA U DUKTALNOM INVAZIVNOM KARCINOMU DOJKE

CVJETKO LEŽ^{1,2} i BOŽO KRUSLIN^{3,4}

¹Opća bolnica Zabok, Odjel za patologiju i citologiju, Zabok, ²Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo, Osijek, ³Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb, Klinički zavod za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ i ⁴Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zavod za patologiju, Zagreb, Hrvatska

Cilj: Utvrditi postoji li povezanost pojave peritumorskih pukotina s ekspresijom matriks metaloproteinaze-2 (MMP-2) i p63 u duktalnim invazivnim karcinomima dojke bez posebnih obilježja. Također je analizirana korelacija pojave peritumorskih pukotina te ekspresije matriks-metaloproteinaze-2 i p63 s ostalim obilježjima tumora – uključujući dob bolesnica, histološki gradus, veličinu tumora, status pazušnih limfnih čvorova, TNM klasifikaciju, stadij bolesti, ekspresiju estrogenskih i progesteronskih receptora te proteina Her2/neu. **Metode:** U 50 uzoraka duktalnog invazivnog karcinoma dojke analizirani su postojanje peritumorskih pukotina te imunohistokemijska izraženost MMP-2 i p63. **Rezultati:** Peritumorske pukotine nađene su kod 94 % karcinoma. Statistički značajno češće pojavljuju se kod starijih bolesnica ($p=0,010$) i u većim tumorima ($p=0,018$). Pozitivna reakcija na MMP-2 nađena je kod 50 % karcinoma. Istraživanjem nije nađena povezanost ekspresije MMP-2 s peritumorskim pukotinama ni s ostalim promatranim obilježjima. Pozitivna ekspresija p63 nađena je u samo jednom karcinomu, histološkog gradusa III, s jako pozitivnom ekspresijom proteina Her2/neu. **Zaključak:** Nije nađena statistički značajna povezanost ekspresije matriks metaloproteinaze-2 s pojavom peritumorskih pukotina. Pozitivna ekspresija p63 u mioepitelnim stanicama okolnog zdravog tkiva dojke te izostanak imunoreaktivnosti u karcinomima s peritumorskim pukotinama upućuje na povezanost pojave peritumorskih pukotina s gubitkom mioepitelnih stanica. Češća pojava peritumorskih pukotina u većim tumorima upućuje na moguću povezanost peritumorskih pukotina s agresivnim biološkim ponašanjem, pa bi radi donošenja konačnog zaključka trebalo analizirati podatke dobivene daljnjim kliničkim praćenjem bolesnica.

Ključne riječi: karcinom dojke, peritumorske pukotine, matriks metaloproteinaza-2, p63

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. Božo Krušlin, dr. med.
Zavod za patologiju i citologiju Ljudevit Jurak
KBC Sestre milosrdnice
Vinogradska c. 29
10 000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: bozo.kruslin@kbcsm.hr

UVOD

Morfološke analize karcinoma različitih lokalizacija pokazale su da se u prisutnosti tumorskih stanica mijenja i stroma pa nastaju svijetli pukotinasti prostori tipičnog izgleda (retrakcijski artefakti, retrakcijske pukotine, peritumorske pukotine, peritumorske lakune, peritubularne pukotine i slično) koji djelomice ili u potpunosti okružuju nakupine tumorskih stanica (1-14). Uzroci nastanka i biološke posljedice ovog morfološkog fenomena, koji se jednostavno može uočiti pregledom standardno obojenih hemalaun-eozinskih (HE) preparata svjetlosnim mikroskopom, još uvijek

nisu u potpunosti poznati. Sve do nedavno promjene karakteristika strome u prisutnosti tumorskih stanica (promjene gustoće, raslojavanje, razdvajanje, promjene karakteristika obojenosti), vidljive na standardno obojenim HE histološkim preparatima, interpretirane su kao artefakti nastali tijekom laboratorijske obrade tkiva te ih se nastojalo izbjeći modifikacijama u postupku fiksacije tkiva. Prema novijim shvaćanjima nastanak peritumorskih pukotina povezuje se s biološkim značajkama tumora kao što su abnormalnosti bazalne membrane, gubitak adhezivnih čimbenika te izraženost kolagenaza ili drugih enzima ekstracelularnog matriksa odgovornih za invazivni rast tumo-

ra. Pojavu peritumorskih pukotina dovodi se u vezu s agresivnim biološkim ponašanjem tumora i lošim ishodom bolesti (3,10-12).

U duktalnim invazivnim karcinomima dojke peritumorske pukotine su čest histološki nalaz, a u tumorskom se tkivu pojavljuju znatno češće nego u okolnom zdravom tkivu. Proučavajući pojavnost retrakcijskih artefakata u tkivu karcinoma dojke Acs i sur. zaključuju da se ne radi o posljedicama loše fiksacije tkiva, nego o važnim biološkim promjenama u odnosu između tumorskih stanica i strome, a čija je prisutnost povezana sa širenjem tumora u limfatičke putove, presadnicama u limfne čvorove te upućuje na lošu prognozu bolesti (11,12).

Djelovanjem produkata karcinomskih stanica, među kojima proteinaze zauzimaju važno mjesto, dolazi do degradacije izvanstaničnog matriksa, što omogućava lakše prodiranje i udaljeno širenje tumorskih stanica. U tom procesu vrlo je važna uloga matriks metaloproteinaza (MMP). U literaturi je opisano više od 20 tipova MMP-a od kojih su ponajviše istraživane MMP-2 i MMP-9 (15-18).

Matriks metaloproteinaza-2 (MMP-2) razgrađuje glavne komponente strukture bazalne membrane, kolagen tipa IV i gelatin. Razgradnja struktura bazalne membrane omogućava invazivni rast tumora. Nakopoulou i sur. našli su ekspresiju MMP-2 u citoplazmi tumorskih stanica kod 75,6 % bolesnica, dok je imunoreaktivnost i u tumorskim i u stromalnim stanicama bila prisutna kod 27,4 % bolesnica s karcinomom dojke (15).

Rezultati istraživanja imunohistokemijske distribucije MMP-2 u tkivu zdrave dojke, dojke s benignim promjenama i kod karcinoma dojke podupiru značenje uloge MMP-2 u remodeliranju bazalne membrane zdrave dojke te upućuju na važnost mioepitelnih stanica u tom procesu. Visok postotak pozitivnih tumorskih stanica u invazivnim karcinomima te snažna imunoreaktivnost metastaza u limfnim čvorovima podupiru bitnu ulogu ovog enzima u tumorskoj invaziji i metastaziranju, ukazujući na tumorske stanice kao važan izvor enzima (16). Jaka ekspresija MMP-2 u tumorskim i stromalnim stanicama korelira s visokim histološkim gradusom i uznapredovalim kliničkim stadijem bolesti te upućuje na lošu prognozu (15, 17, 18).

Mioepitelne stanice pokazuju jaku citoplazmatsku imunoreaktivnost na MMP-2. Identifikacija mioepitelnih stanica važan je dio patohistološke analize tkiva dojke, naročito kod razlikovanja karcinoma od promjena koje mu nalikuju, pri čemu se najčešće koristi imunohistokemijska metoda određivanja ekspresije p63. U tkivu zdrave dojke kod dobroćudnih promjena dojke te kod atipične duktalne hiperplazije p63-imunoreaktivne

stanice tvore kontinuiran jednorodan obrub oko dukalnog i žljezdanog epitela. Kod intraduktalnog karcinoma obrub p63-pozitivnih stanica je diskontinuiran, a kod dukalnog invazivnog karcinoma dojke ga se ne nalazi. Dosadašnjim istraživanjima nisu nađeni dokazi u prilog izravne uloge p63 u genezi tumora dojke (19).

CILJ RADA

Cilj rada bio je istražiti pojavu peritumorskih pukotina, ekspresiju MMP-2 i p63 te usporediti povezanost pojave peritumorskih pukotina s ekspresijom MMP-2 i p63 u duktalnom invazivnom karcinomu dojke (NOS).

METODE RADA

U istraživanju je korišten arhivski materijal uzoraka tkiva dobivenih nakon radikalne mastektomije i limfadenektomije, uz histološku potvrdu dijagnoze dukalnog invazivnog karcinoma dojke (NOS) Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Ljudevit Jurak Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu u razdoblju od 1. 1. 2007. do 31. 12. 2012. godine. Analizirano je ukupno 50 uzoraka dukalnog invazivnog karcinoma. Uzorci su odabrani na način da osim tkiva karcinoma sadrže i okolno tkivo dojke koje nije zahvaćeno tumorom, a koje je poslužilo kao unutarnja kontrola u analizi peritumorskih pukotina te analizi ekspresije MMP-2 i p63. U analizu su uključeni samo oni slučajevi kod kojih su postojali potrebni podatci o dobi, vrsti kirurškog zahvata, histološkom tipu tumora, histološkom gradusu, veličini tumora, broju analiziranih limfnih čvorova, statusu estrogenskih i progesteronskih receptora (ER, PR) te statusu proteina Her2/neu. Tumori s mikropapilarnom slikom nisu uključeni u studiju, jer su karakterizirani prominentnim peritumorskim pukotinama.

Dijagnoza je postavljena nakon operacije na materijalu obrađenom standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10 %-tnom puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove rezane na debljinu od 5 µm, deparafiniziranje i bojenje standardnom HE metodom. Stupanj diferenciranosti, odnosno graduiranje tumora, provedeno je u skladu s Nottinghamskom modifikacijom Scarff-Bloom-Richardsonove klasifikacije prema Elstonu i Ellisu (20). Dodatni rezovi debljine 5 µm korišteni su za imunohistokemijsku analizu.

Analiza peritumorskih pukotina provedena je na standardno obojenim HE histološkim preparatima. U dijelu preparata s karcinomom odabrane su 3 skupine od po 10 žljezda/nakupina tumorskih stanica, u kojima je anali-

zirano svojstvo peritumorskih pukotina. Na taj je način u svakom uzorku analizirano 30 žlijezda/nakupina tumorskih stanica koje su prema prethodno definiranim kriterijima uključene u sljedeće skupine: 1. peritumorske pukotine se ne nalaze (-), 2. peritumorske pukotine prisutne u do 50 % žlijezda/nakupina tumorskih stanica (+), 3. peritumorske pukotine prisutne u više od 50 % žlijezda/nakupina tumorskih stanica (++) (4,6,7).

Kontrolnu skupinu su u svakom preparatu predstavljali kanalići okolnog zdravog tkiva dojke oko kojih se peritumorske pukotine ne nalaze.

Na dodatnim rezovima tumorskog tkiva provedena je imunohistokemijska analiza ekspresije matriks metaloproteinaze-2 i p63, metodom LSAB (engl. *labeled streptavidin-biotin*) kao vizualizacijskim sustavom, na imunohistokemijskom automatskom farbaču TechMate Horizon, uz korištenje protokola MSIP (engl. *microwave streptavidin immunoperoxidase*). U analizi ekspresije MMP-2 korištena su primarna protutijela tvrtke Abcam (*Mouse monoclonal anti-MMP2 antibody* (CA-4001/CA719E3C) . (ab3158), razrjeđenje 1:100). U analizi ekspresije p63 su korištena primarna protutijela tvrtke Novocastra [*Lyophilized mouse monoclonal antibody p63 protein* (NCL-p63), razrjeđenje 1:50]. Jasno pozitivna citoplazmatska reakcija smatrana je pozitivnim nalazom u analizi ekspresije MMP-2, a za p63 pozitivna nuklearna reakcija. Za oba protutijela u interpretaciji je korištena semikvantitativna metoda, uz procjenu postotka stanica koje pokazuju pozitivnu reakciju. Na taj način formirane su sljedeće skupine : 1. negativna reakcija (-) – manje od 5 % tumorskih stanica pozitivno, 2. slabo pozitivna reakcija (+) – $\geq 5-10$ % tumorskih stanica pozitivno, 3. umjereno pozitivna reakcija (++) – $\geq 10-50$ % tumorskih stanica pozitivno, 4. jako pozitivna reakcija (+++) – > 50 % tumorskih stanica pozitivno.

U kontrolnoj skupini su u svakom uzorku analizirane mioepitelne stanice okolnog zdravog tkiva dojke, u kojima je ekspresija MMP-2 i p63 uvijek jako pozitivna.

S obzirom na raspodjelu podataka u statističkoj su analizi korišteni neparametrijski testovi s odgovarajućim prikazom mjera središnje raspodjele za kvantitativne varijable (medijan, minimalna vrijednost, maksimalna vrijednost i interkvartilni raspon). Kvalitativna obilježja prikazana su kao frekvencije u kontingencijskim tablicama i to u apsolutnom broju i postotku. Razlike u kvantitativnim varijablama između ispitivanih skupina analizirane su Mann-Whitneyevim U testom, odnosno Kruskal-Wallisovim testom. χ^2 -test razlika distribucije se koristio u analiziranju razlika između kategorijskih varijabli u odnosu na skupine peritumorskih pukotina i MMP-2. Izračunati su Spearmanovi korelacijski koeficijenti između veli-

čine tumora i dobi za pojedine ispitivane skupine, a za njihove međusobne razlike provedena je z-statistička analiza. Razlike na razini $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnima.

REZULTATI

Analizirano je 50 uzoraka dukalnog invazivnog karcinoma dojke. Peritumorske pukotine prisutne u više od 50 % žlijezda bile su vidljive kod 23 (46 %) pacijentice. Jako pozitivna reakcija na MMP-2 zabilježena je kod jedne (2 %) pacijentice. p63 je bio pozitivan kod samo jedne (2 %) pacijentice, koja je imala histološki gradus tumora G3 te jako pozitivnu ekspresiju proteina Her2/neu (tablica 1).

Tablica 1.

Kliničko-patološki podatci o pacijenticama s karcinomom dojke (n=50)

		N	Udio %
Dob: skupine	≤ 60 godina	19	38,0
	> 60 godina	31	62,0
TNM klasifikacija	T1N0MX	6	12,0
	T1N1MX	10	20,0
	T2N0MX	14	28,0
	T2N1MX	17	34,0
	T3N1MX	3	6,0
Veličina tumora (cm) skupine	≤ 2 cm	20	40,0
	2-5 cm	27	54,0
	> 5 cm	3	6,0
Status limfnih čvorova	Negativni	20	40,0
	1-3 pozitivna	13	26,0
	> 3 pozitivna	17	34,0
Stadij bolesti	I	0	0,0
	II	47	94,0
	III	3	6,0
Gradus tumora	G1	11	22,0
	G2	28	56,0
	G3	11	22,0
Her2/neu	Negativna reakcija (-)	24	48,0
	Slabo pozitivna reakcija (+)	9	18,0
	Umjereno pozitivna reakcija (++)	4	8,0
	Jako pozitivna reakcija (+++)	13	26,0
ER	Negativna reakcija (-)	16	32,0
	Slabo pozitivna reakcija (+)	1	2,0
	Umjereno pozitivna reakcija (++)	8	16,0
	Jako pozitivna reakcija (+++)	25	50,0
PR	Negativna reakcija (-)	15	30,0
	Slabo pozitivna reakcija (+)	3	6,0
	Umjereno pozitivna reakcija (++)	10	20,0
	Jako pozitivna reakcija (+++)	22	44,0
Peritumorske pukotine	Bez pukotina	3	6,0
	Prisutne u do 50% žlijezda	24	48,0
	Prisutne u više od 50% žlijezda	23	46,0
MMP-2	Negativna reakcija (-)	25	50,0
	Slabo pozitivna reakcija (+)	17	34,0
	Umjereno pozitivna reakcija (++)	7	14,0
	Jako pozitivna reakcija (+++)	1	2,0
p63	Negativan	49	98,0
	Pozitivan	1	2,0

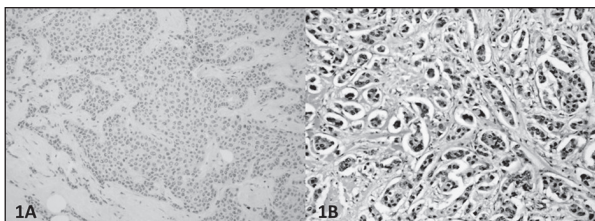
Prema kliničkoj važnosti, odnosno razini ekspresije, napravljena je binarna podjela s obzirom na kategorizaciju. U većini slučajeva kao negativna vrijednost je uzeta negativna reakcija (-), dok su kao pozitivna vrijednost uzete slabo pozitivna reakcija (+), umjereno pozitivna reakcija (++) i jako pozitivna reakcija (+++). Iznimka je ekspresija proteina Her2/neu gdje se kao pozitivan nalaz računala isključivo jako pozitivna reakcija (+++) (tablica 2).

Tablica 2.

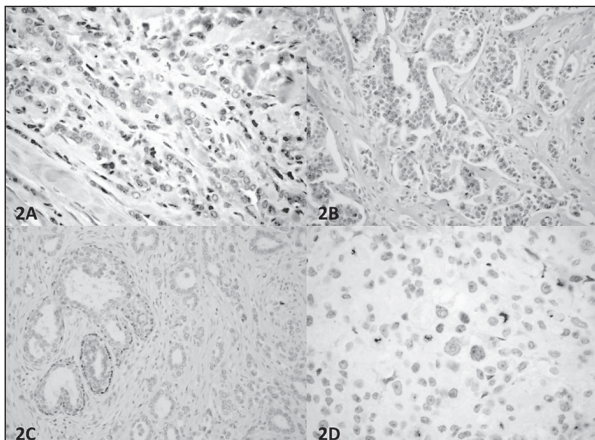
Prikaz ekspresije istraživanih biljega i prisutnosti peritumorskih pukotina

		N	Udio %
Her2/neu: skupine	Negativan	37	74,0
	Pozitivan	13	26,0
ER: skupine	Negativan	16	32,0
	Pozitivan	34	68,0
PR: skupine	Negativan	15	30,0
	Pozitivan	35	70,0
Peritumorske pukotine: skupine	< 50%	27	54,0
	> 50%	23	46,0
MMP-2: skupine	Negativan	25	50,0
	Pozitivan	25	50,5

Najveći broj tumora, 28 (56 %), bio je umjerenog histološkog gradusa, a po 11 (22 %) tumora bilo je visokog, odnosno niskog histološkog gradusa. U trenutku postavljanja dijagnoze 20 (40 %) bolesnica je imalo negativne limfne čvorove, a 30 (60 %) ih je imalo jedan ili više pozitivnih limfnih čvorova. Najveći broj tumora, 27 (54 %), je bio veličine od 2 do 5 cm. Najviše bolesnica, 17 (34 %), imao je stadij T2N1MX. Pozitivna ekspresija PR je nađena u 35 (70 %), a ER u 34 (68 %) uzoraka. Kod 24 (48 %) uzorka peritumorske pukotine bile su vidljive u do 50 % žlijezda, a u 23 (46 %) uzorka kod više od 50 % žlijezda (sl. 1). U samo 3 (6 %) uzorka peritumorske pukotine nisu nađene. Pozitivna ekspresija MMP-2 nađena je u 25 (50 %) uzoraka (sl. 2A). Dva uzorka pokazivala su ekspresiju MMP-2 u jezgrama tumorskih stanica (sl. 2B). Ispitanice koje imaju više od 50 % peritumorskih pukotina su značajno starije ($p=0,010$). U skupini s više od 50 % peritumorskih pukotina 18 pacijentica (78,3 %) je starije od 60 godina, a u skupini s manje od 50 % peritumorskih pukotina 13 (48,1%) ih je starije od 60 godina ($p=0,029$). Nisu nađene značajne razlike u raspodjeli statusa limfnih čvorova u odnosu na prisutnost peritumorskih pukotina ($p=0,203$). Peritumorske pukotine češće su nađene u bolesnica s tumorom promjera većeg od 2 cm ($p<0,05$).



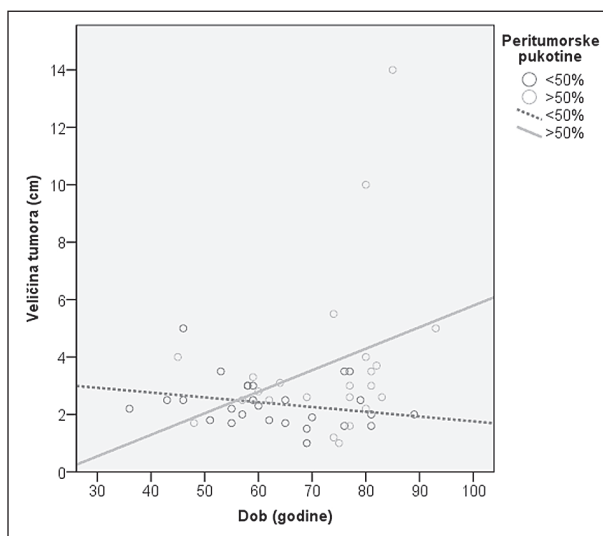
Sl. 1. A) tumorske žlijezde bez peritumorskih pukotina (HE, 200 x), B) peritumorske pukotine vidljive kod više od 50 % žlijezda (HE, 200 x)



Sl. 2. A) pozitivna MMP-2 reakcija u više od 50 % tumorskih stanica (IMH, 400 x), B) pozitivna MMP-2 reakcija u jezgrama tumorskih stanica (IMH, 200 x), C) pozitivna p63 reakcija u zdravom tkivu dojke te izostanak reakcije u tumorskom tkivu (IMH, 200 x), D) pozitivna p63 reakcija u jezgrama tumorskih stanica (IMH, 400 x)

Istraživanjem je nađena granično značajna razlika ($p=0,053$) u raspodjeli stadija bolesti u odnosu na skupine peritumorskih pukotina: u skupini s više od 50 % peritumorskih pukotina 3 pacijentice (13,0 %) imaju stadij bolesti III, dok su u skupini s manje od 50 % peritumorskih pukotina sve pacijentice u stadiju bolesti II. Nisu nađene značajne razlike u raspodjeli gradusa tumora u odnosu na prisutnost peritumorskih pukotina ($p=0,692$) kao ni u odnosu prisutnosti peritumorskih pukotina i ekspresije Her2/neu ($p=0,990$), ER ($p=0,318$) i PR ($p=0,055$). Nadalje, nisu utvrđene ni statistički značajne razlike u raspodjeli gradusa tumora u odnosu na prisutnost peritumorskih pukotina ($p=0,395$), dobnih skupina ($p=0,771$), raspodjelu TNM klasifikacije ($p=0,834$), veličinu tumora ($p=0,357$), raspodjelu statusa limfnih čvorova ($p=0,564$) i raspodjelu stadija bolesti ($p=0,552$) odnosno u raspodjeli MMP-2 skupina u odnosu na raspodjelu gradusa tumora ($p=0,850$), raspodjelu Her2/neu skupina ($p=0,747$), raspodjelu ER skupina ($p=0,544$) te raspodjelu PR skupina ($p=0,355$). S obzirom na samo jedan p63 pozitivan tumor daljnja statistička obrada na razini statističke značajnosti ne bi imala praktičnu vrijednost te nije ni učinjena (slike 2C, 2D). Za sku-

pine peritumorskih pukotina izračunati su Spearmanovi koeficijenti korelacije koji, iako nisu statistički značajni za pojedinu skupinu, s obzirom na značajnu međusobnu razliku (z-statistika, $p=0,028$) upućuju na drugačiju dinamiku korelacija između dobi i veličine tumora s obzirom na skupine peritumorskih pukotina. Dok je u skupini s peritumorskim pukotinama kod više od 50 % žlijezda izražena pozitivna korelacija dobi i veličine tumora (granična značajnost, $\rho=0,354$, $p=0,098$), u skupini s peritumorskim pukotinama kod manje od 50 % žlijezda ta korelacija je negativna ($\rho=-0,284$, $p=0,151$), što se također vidi iz nagiba regresijskih pravaca (sl. 3).



Sl. 3. Korelacija i regresijski pravci između dobi i veličine tumora s obzirom na peritumorske skupine: Spearmanov koeficijent korelacije (za skupinu <50 %: $\rho = -0,284$, $p=0,151$; za skupinu >50 %: $\rho=0,354$, $p=0,098$)

RASPRAVA

U ovom je istraživanju analizirana skupina od 50 žena kod kojih je primijenjen radikalni kirurški zahvat odstranjenja cijele dojke i pazušnih limfnih čvorova, a patohistološkom analizom potvrđena je dijagnoza duktalnog invazivnog karcinoma. Analizirani su svi dosad prihvaćeni parametri i prognostički čimbenici bitni za kliničko praćenje oboljelih od karcinoma dojke: dob bolesnica, histološki gradus, veličina tumora, zahvaćenost pazušnih limfnih čvorova, TNM stadij bolesti, status ER i PR te status proteina Her2/neu. Podatci dobiveni analizom rezultata istraživanja ne odstupaju bitnije od podataka iz literature.

Osim navedenih parametara istražena je i prisutnost peritumorskih pukotina te analiza ekspresije MMP-2 i p63.

Iako točni mehanizmi nastanka i širenja karcinoma još uvijek nisu u potpunosti poznati, neka istraživanja

pokazala su da se u prisutnosti tumorskih stanica, pod utjecajem proteolitičkih enzima i citokina, mijenja i stroma, odnosno da je u biologiji tumora, osim epitelne, bitna i stromalna komponenta koja tumorskim stanicama olakšava lokalno i udaljeno širenje (21-24). Istražujući maligne tumore kože Simpson je još 1950. postavio hipotezu da mukolitički enzimi koje stvaraju nediferencirane epitelne stanice, putem degradacije okolne strome, mogu biti u vezi sa sposobnošću invazivnog tumorskog rasta (25). Opisane su varijacije metakromatskog odgovora dermisa u prisustvu različitih tumora kože (26), a proučavanjem karcinoma bazalnih i pločastih stanica autori opisuju promjenu strome koja se očituje odvajanjem strome od žlijezda (26,27). Merot i sur. zaključuju kako se ne radi o artefaktima, već o dinamičnim promjenama strome u prisutnosti tumora (1). Neki autori pojavu retrakcijskih artefakata razmatraju kao rani stadij limfokapilarne invazije u vrijeme dok još nije dovršena pretvorba mezenhimskih stanica u endotelne stanice (28). Peritumorske su pukotine bile predmet istraživanja kod karcinoma različitih lokalizacija i morfologija, poput karcinoma rektuma, jednjaka, mokraćnog mjehura, prostate i drugih lokalizacija (2-10).

Istraživanja peritumorskih pukotina u karcinomu dojke nešto su brojnija posljednjih godina. Analizirajući pojavnost peritumorskih retrakcijskih artefakata kod neinvazivnog i invazivnog duktalnog karcinoma dojke, Irie i sur. nalaze peritumorske pukotine kod 16 % neinvazivnih i 84,4 % invazivnih karcinoma. Smatraju da se ne radi o artefaktu, već o prelimfatičkim prostorima (13). Acs i sur. su proučavanjem retrakcijskih artefakata u tkivu karcinoma dojke zaključili da se ne radi o posljedicama loše fiksacije tkiva, nego o važnim biološkim promjenama u odnosu između tumorskih stanica i strome, a koje mogu doprinijeti lakšem širenju do limfatičkih putova i tumorskoj progresiji (11). Daljnjim istraživanjima, provedenim na malim uzorcima tkiva dobivenim iglenom biopsijom, došli su do zaključka da prisutnost mikropapilarne slike tumora, odnosno prisutnost ekstenzivnih retrakcijskih artefakata može upućivati na pojavu presadnica u limfnim čvorovima pazuha te na samom početku biti znak loše prognoze i kliničkog tijeka bolesti (12). Peritumorske pukotine statistički su značajno češće prisutne kod karcinoma koji pokazuju smanjenu/aberrantnu ekspresiju adhezijskih molekula E-kadherina i β -katenina (14).

Rezultati našega istraživanja prisutnosti peritumorskih pukotina u uzorcima tkiva karcinoma dojke pokazuju prisutnost peritumorskih pukotina kod 47 (94 %) uzoraka, što je u skladu s podacima iz literature (11-13). U skupini s više od 50 % peritumorskih pukotina bolesnice su bile značajno starije, a tumori veći. Budući da između veličine tumora i preživljavanja po-

stoji linearan odnos, češća pojava peritumorskih pukotina u većim tumorima upućuje na moguću povezanost peritumorskih pukotina s agresivnim biološkim ponašanjem.

Među produktima tumorskih stanica u biologiji tumora vrlo značajno mjesto ima MMP-2. Ovaj enzim razgrađuje glavne komponente strukture bazalne membrane, kolagen tipa IV i gelatin. Osim toga, MMP-2 je uključena u proces angiogeneze, limfangiogeneze te proteolitičku aktivaciju TGF- β koji promovira epitelno-mezenhimalnu transformaciju, ključni proces u metastaziranju karcinoma (29). Razgradnja struktura bazalne membrane omogućava prodor zloćudnih stanica kroz bazalnu membranu i početni invazivni rast tumora.

Prema podacima iz literature tumorske stanice pozitivne na MMP-2 se u uzorcima tkiva karcinoma dojke nalaze kod 52-80 % bolesnica (15,30,31). Ekspresija MMP-2 pojačana je kod bolesnica u čijim su limfnim čvorovima nađene presadnice te u tumorima s jačom ekspresijom ER. Kod bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima također je utvrđena slabija ekspresija tkivnog inhibitora MMP-2 (32). Opisana je statistički značajna povezanost ekspresije MMP-2 s veličinom tumora, histološkim gradusom tumora i pojavom metastaza uz zaključak da ekspresija MMP-2 može odražavati invazivni potencijal karcinoma dojke (33). Istražujući ekspresiju MMP-2 u tumorskim stanicama i stromi tumora bolesnica s rakom dojke Pellikainen i sur. ne nalaze korelaciju ekspresije MMP-2 s Her2/neu, a Zhang i sur. nalaze da jača ekspresija MMP-2 korelira s veličinom tumora i PR (31,34).

U našem istraživanju je pozitivna ekspresija MMP-2 nađena u 25 (50 %) uzoraka karcinoma što je u skladu s literaturnim podacima. Kod 17 (34 %) uzoraka reakcija je bila slabo pozitivna, kod 7 (14 %) uzoraka umjereno, a samo 1 (2 %) uzorak je pokazivao jako pozitivnu reakciju. Istraživanjem nije nađena povezanost ekspresije MMP-2 s peritumorskim pukotinama ni s ostalim promatranim obilježjima.

Među uzorcima u kojima je bila negativna reakcija dva su pokazivala ekspresiju MMP-2 u jezgrama tumorskih stanica. MMP-2 u staničnoj jezgri sudjeluje u procesima razgradnje matriksa jezgre, apoptoze i regulacije staničnog ciklusa, a važna je i njezina uloga u razgradnji poli (ADP-riboza) polimeraze (PARP) koja, kao enzim matriksa stanične jezgre, sudjeluje u reparaciji oštećene DNA (35). Pregledom literature nisu nađeni podaci o ekspresiji MMP-2 u jezgrama stanica karcinoma dojke, pa se istraživanjem dobivene podatke može razmatrati u kontekstu dosadašnjih spoznaja o ulozi ovoga enzima u biološkim procesima u staničnoj jezgri.

Mioepitelne stanice koje okružuju vodove i acinuse žlijezdanih organa odjeljuju epitelne stanice od bazalne membrane i podležeće strome, a sadrže i brojne inhibitore proteinaza. Ove su stanice prirodni parakrini supresori invazivnog rasta i metastaziranja te mogu specifično inhibirati progresiju prekanceroznih stanja u invazivni karcinom (36).

Tumorske stanice pozitivne na p63 vidljive su kod malog broja duktalnih invazivnih karcinoma gradusa III. Ribeiro-Silva i sur. nalaze p63-pozitivne tumorske stanice kod 11,8 % duktalnih invazivnih karcinoma pri čemu je ekspresija korelirala s veličinom tumora, histološkim gradusom, presadnicama u limfne čvorove i negativnim ER (19). U studiji iz 2005. nalaze pozitivitet kod 15,7 % karcinoma, uz negativnu korelaciju s ER i PR (37). Slične rezultate pokazuju i drugi autori (38).

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s podacima iz literature. Pozitivna ekspresija p63 nađena je u zloćudnim stanicama jednog (2 %) duktalnog invazivnog karcinoma dojke, histološkog gradusa III.

Pozitivna ekspresija p63 u mioepitelnim stanicama okolnog zdravog tkiva dojke te izostanak takve imunoreaktivnosti u karcinomima s peritumorskim pukotinama upućuje na povezanost pojave peritumorskih pukotina s gubitkom mioepitelnih stanica. Zbog toga se negativna reakcija na p63 u tumoru koristi u dijagnostici duktalnog invazivnog karcinoma dojke, odnosno u razlikovanju malignih od nemalignih promjena što je bila i namjera ovog rada kako bismo pouzdano mogli razlučiti karcinomske žlijezde od drugih promjena koje mogu oponašati tumor. Naposljetku, potrebno je većim studijama utvrditi jesu li slabo diferencirani karcinomi češće povezani s pozitivnom reakcijom na p63.

ZAKLJUČAK

Pozitivna ekspresija p63 u mioepitelnim stanicama okolnog zdravog tkiva dojke te izostanak imunoreaktivnosti u karcinomima s peritumorskim pukotinama upućuje na povezanost pojave peritumorskih pukotina s gubitkom mioepitelnih stanica. Nije nađena statistički značajna povezanost ekspresije matriks metaloproteinaze-2 s pojavom peritumorskih pukotina što je najvjerojatnije posljedica malog broja uzoraka uključenih u ovu probnu studiju. Češća pojava peritumorskih pukotina u većim tumorima upućuje na moguću povezanost peritumorskih pukotina s agresivnim biološkim ponašanjem, pa bi radi donošenja konačnog zaključka trebalo analizirati ekspresiju i drugih MMP-a, poglavito MMP-9 i podatke dobivene na većoj skupini bolesnica što će biti sljedeći korak u ovom projektu.

L I T E R A T U R A

1. Merot Y, Faucher F, Didierjean L, Saurat JH. Loss of bulous pemphigoid antigen in peritumoral lacunas of basal cell carcinomas. *Acta Derm Venereol* 1984; 64 (3): 209-13.
2. Bouvet M, Milas M, Giacco GG i sur. Predictors of recurrence after local excision and postoperative chemoradiation therapy of adenocarcinoma of the rectum. *Ann Surg Oncol* 1999; 6 (1): 26-32.
3. Bujas T, Pavić I, Leniček T i sur. Peritumoral retraction clefting correlates with advanced stage squamous cell carcinoma of the esophagus. *Pathol Oncol Res* 2008; 14 (4): 443-7.
4. Krušlin B, Tomas D, Rogatsch H i sur. Periacinar retraction clefting in the prostatic needle core biopsies: an important diagnostic criterion or a simple artifact? *Virchows Arch* 2003; 443 (4): 524-7.
5. Džombeta T, Krušlin B. High grade T1 papillary urothelial bladder cancer shows prominent peritumoral retraction clefting. *Pathol Oncol Res* 2018;24:567-74. DOI10.1007/s12253-017-0279-2
6. Leniček T, Kos M. Povezanost pojave peritumoralnih pukotina u duktalnom invazivnom karcinomu dojke s miofibroblastičnom reakcijom strome. *Lijec Vjesn* 2018; 40: 190-9. doi.org/10.26800/LV-140-7-8-25
7. Krušlin B, Tomas D, Cviko A i sur. Periacinar clefting and p63 immunostaining in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2006; 12 (6): 205-9.
8. Tomas D, Ulamec M, Hudolin T i sur. Myofibroblastic stromal reaction and expression of tenascin C and laminin in prostate adenocarcinoma. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2006; 9 (4): 414-9.
9. Ulamec M, Tomas D, Ensinger C i sur. Periacinar retraction clefting in proliferative prostatic atrophy and prostatic adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2007; 60 (10): 1098-101.
10. Tomas D, Spajić B, Milošević M i sur. Extensive retraction artefact predicts biochemical recurrence-free survival in prostatic carcinoma. *Histopathology* 2011; 58 (3): 447-54.
11. Acs G, Dumoff KL, Solin LJ i sur. Extensive retraction artifact correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis and predicts poor outcome in early stage breast carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2007; 31 (1): 129-40.
12. Acs G, Paragh G, Chuang ST, Laronga C, Zhang PJ. The presence of micropapillary features and retraction artifact in core needle biopsy material predict lymph node metastasis in breast carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2009; 33 (2): 202-10.
13. Irie J, Manucha V, Ioffe B, Silverberg SG. Artefact as the pathologist's friend: peritumoral retraction in in situ and infiltrating duct carcinoma of the breast. *Int J Surg Pathol* 2007; 15 (1): 53-9.
14. Fáváro WJ, Hetzl AC, Reis LO i sur. Periacinar retraction clefting in nonneoplastic and neoplastic prostatic gland: artifact or molecular involvement. *Pathol Oncol Res* 2012; 18 (2): 285-92.
15. Nakopoulou L, Tsirmpa I, Alexandrou P i sur. MMP-2 protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77 (2): 145-55.
16. Monteagudo C, Merino MJ, San-Juan J, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign and malignant breast tissue. *Am J Pathol* 1990; 136 (3): 585-92.
17. Chen Y, Wang X, Chen G, Dong C, Zhang D. The Impact of Matrix Metalloproteinase 2 on Prognosis and Clinicopathology of Breast Cancer Patients: A Systematic Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;27;10(3):e0121404. doi: 10.1371/journal.pone.0121404
18. Abbas NF, Shabana ME, Habib FM, Soliman AA. Histopathological and immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in breast carcinoma. *J Arab Soc Med Res* 2017; 12 (1): 6-12.
19. Riberio-Silva A, Zambelli Ramalho LN, Garcia SB, Zucoloto S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127 (3): 336-40.
20. Elston CW, Ellis IO. Pathologic prognostic factors in breast cancer. I. The value of histologic grade in breast cancer.: Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19 (5): 403-10.
21. Krušlin B, Ulamec M, Tomas D. Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression. *Bosn J Basic Med Sci* 2015;15(2):1-7. doi: 10.17305/bjbms.2015.449.
22. Kratochwil K. The stroma and the control of cell growth. *J Pathol* 1986;149: 23-4.
23. Nakamura T, Matsumoto K, Kiritoshi A, Tano Y, Nakamura T. Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: *in vitro* analysis of tumor-stromal interactions. *Cancer Res* 1997; 57 (15): 3305-13.
24. Kleinman HK, Graf J, Iwamoto Y i sur. Role of basement membranes in cell differentiation. *Ann NY Acad Sci* 1987; 513: 134-45.
25. Simpson WL. Mucolytic enzymes and invasion by carcinomas. *Ann NY Acad Sci* 1950; 52: 1125-32.
26. Fanger H, Baker BE. Histochemical studies of some keratotic and proliferating skin lesions. I. Metachromasia. *AMA Arch Pathol* 1957; 64: 143-7.
27. Moore RD, Stevenson J, Schoenberg MD. The response of connective tissue associated with tumors of the skin. *Am J Clin Pathol* 1960; 34 (2): 125-30.
28. Barsky SH, Ye Y, Karlin NJ. "Separation artifact" v lymphovascular invasion: are mimics only mimics? *Mod Pathol* 2006; 19(Suppl.1): 289.
29. Gialeli C, Theocaris AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2011; 278 (1): 16-27.
30. Ranogajec I, Jakić-Razumović J, Puzović V, Gabrilovac J. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2),

matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and aminopeptidase N/CD13 in breast cancer patients. *Med Oncol* 2012; 29 (2): 561-9.

31. Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV i sur. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2 and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (22): 7621-8.

32. Jinga DC, Blidaru A, Condrea I i sur. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlation with prognostic factors. *J Cell Mol Med* 2006; 10 (2): 499-510.

33. Liu SC, Yang SF, Yeh KT i sur. Relationships between the level of matrix metalloproteinase-2 and tumor size of breast cancer. *Clin Chim Acta* 2006; 371 (1-2): 92-6.

34. Zhang YG, Du J, Tian XX, Zhong YF, Fang WG. Expression of E-cadherin, beta-catenin, cathepsin D, gelatinases and their inhibitors in invasive ductal breast carcinomas. *Chin Med*

J (Engl.) 2007; 120 (18): 1597-605.

35. Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovas Res* 2010; 85 (3): 413-23.

36. Sternlicht MD, Kadashian P, Shao ZM, Safarians S, Barsky SH. The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1949-58.

37. Ribeiro-Silva A, Ramalho LNZ, Garcia SB i sur. p63 correlates with both BRCA 1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: Further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. *Histopathology* 2005; 47 (5): 458-66.

38. Shamloula MM, El-Shorbagy SH, Saied EM. p63 and cytokeratin 8/18 expression in breast, atypical ductal hyperplasia, ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst* 2007; 19 (3): 202-10.

SUMMARY

RELATIONSHIP OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 AND p63 EXPRESSION WITH PERITUMORAL CLEFTS IN INVASIVE DUCTAL CARCINOMA OF THE BREAST

C. LEŽ^{1,2} and B. KRUŠLIN^{3,4}

¹Zabok General Hospital, Department of Pathology and Cytology, Zabok, ²Josip Juraj Strossmayxer University of Osijek, Faculty of Dental Medicine and Health, Osijek, ³Sestre milosrdnice University Hospital Centre, Ljudevit Jurak Department of Pathology and Cytology, Zagreb and ⁴University of Zagreb, School of Medicine, Department of Pathology, Zagreb, Croatia

Aim: To assess whether there is a relationship between the appearance of peritumoral clefts and the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and p63 in invasive ductal carcinoma of the breast. Furthermore, correlations between peritumoral clefts and expression of matrix metalloproteinase-2 and p63 with other factors including patient age, histologic grade of tumor, size of tumor, axillary lymph node status, TNM classification, stage, expression of estrogen and progesterone receptors, as well as Her2/neu expression were also analyzed. **Methods:** Fifty specimens of invasive ductal breast carcinoma were collected, and the presence of peritumoral clefts, as well as immunohistochemical expression of MMP-2 and p63 was analyzed. **Results:** Peritumoral clefts were found in 94% of carcinomas. Statistical significance was more commonly recorded in older patients ($p=0.010$) and larger tumors ($p=0.018$). Positive reaction to MMP-2 was found in 50% of carcinomas. The study found no correlation between MMP-2 expression and peritumoral clefts, or with other factors analyzed. Positive expression of p63 was found in only one carcinoma, histologic grade 3, with strong positive expression of Her2/neu protein. **Conclusion:** Statistically significant correlation between expression of MMP-2 and the occurrence of peritumoral clefts was not found. Positive expression of p63 in myoepithelial cells of the surrounding healthy breast tissue, as well as the lack of immunoreactivity in carcinomas with peritumoral clefts suggested a correlation with the occurrence of peritumoral clefts and loss of myoepithelial cells. The more frequent occurrence of peritumoral clefts in larger tumors suggested a possible correlation between peritumoral clefts and aggressive biological behavior. To reach a definitive conclusion, additional data should be collected and analyzed from continued patient follow-up.

Key words: breast carcinoma, peritumoral clefts, matrix metalloproteinase-2, p63