

# Usporedba glikofenotipa subpopulacija karcinoma dojke nakon tretmana tienopiridinskim derivatom

---

**Delić, Loredana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:361974>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-04**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET  
I  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**LOREDANA DELIĆ**

**USPOREDBA GLIKOFENOTIPA SUBPOPULACIJA  
KARCINOMA DOJKE NAKON TRETMANA TIENOPIRIDINSKIM  
DERIVATOM**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina  
2021./2022.**

**Mentor:  
doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić**

**Split, studeni 2021.**

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**  
**DIPLOMSKI RAD**

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet**  
**Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA**  
**Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno područje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Medicinska biokemija  
**Tema rada:** prihvaćena je na 70. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 8. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i na 5. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić  
**Pomoć pri izradi:** doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić

**USPOREDBA GLIKOFENOTIPA SUBPOPULACIJA KARCINOMA DOJKE NAKON TRETMANA TIENOPIRIDINSKIM DERIVATOM**

Loredana Delić, broj indeksa 196

**Naslov rada:** Usporedba glikofenotipa subpopulacija karcinoma dojke nakon tretmana tienopiridinskim derivatom

**Cilj istraživanja:** Cilj istraživanja je dokazati djelovanje inhibitora fosfolipaze C, samog ili u kombinaciji s paklitakselom, na snižavanje postotka epitelnih CD44-CD24+ i luminalno epitelnih CD44-CD24- stanica pozitivnih na CD15s te na snižavanje prosječnog izražaja glikokonjugata CD15s po jednoj CD44-CD24+ i CD44-CD24- stanici.

**Materijali i metode:** Na MDA-MB-231 staničnoj liniji trostruko negativnog karcinoma dojke. Primijenjen je novosintetizirani inhibitor fosfolipaze C iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina. Stanice su tretirane inhibitorom fosfolipaze C koncentracije 2  $\mu$ M i/ili paklitakselom tijekom 48 sati, nakon čega je izmjerena fluorescencija uzoraka imunobojenih protutijelima na CD44, CD24 i CD15s pomoću protočnog citometra.

**Rezultati:** Rezultati su prikazani statističkim dijagramima u kojima su prikazani postotci luminalnih i epitelnih stanica MDA-MB-231 stanične linije pozitivnih na CD15s te prosječni izražaj CD15s po pojedinoj stanici navedenih populacija stanica po skupinama ovisno o korištenju samog inhibitora, paklitaksela ili njihove kombinacije. Paklitaksel je snizio izražaj CD15s na epitelnim stanicama no bez statističke razlike. Inhibitor je povećao, a paklitaksel je snizio izražaj CD15s na luminalnim stanicama, no bez statističke značajnosti. Inhibitor i paklitaksel su smanjili prosječni izražaj biljega CD15s po epitelnoj stanici uz statističku značajnost,  $p = 0.011$ . Paklitaksel je smanjio prosječni izražaj biljega CD15s po luminalnoj stanici no bez statističke značajnosti.

**Zaključci:** Tretman MDA-MB-231 stanične linije 2  $\mu$ M koncentracijom inhibitora fosfolipaze C iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina statistički značajno smanjuje postotak epitelnih CD44-CD24+ stanica na izražaj CD15s po jednoj matičnoj stanici raka dojke, no ne mijenja značajno postotak CD44-CD24+ subpopulacije matičnih stanica pozitivnih na biljeg CD15s.

**Ključne riječi:** trostruko negativni rak dojke, matične stanice raka, tienopiridinski derivat

**Rad sadrži:** 49 stranica, 5 tablicu, 11 slika i 56 reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva:** 1. doc.dr.sc. Ana Šešelja Perišin  
2. prof. dr. sc. Anita Markotić  
3. doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić

**Datum obrane:** 29.11.2021.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2**

**BASIC DOCUMENTATION CARD**  
**GRADUATE THESIS**

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia**

**Scientific area:** Biomedical science  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Medicinal biochemistry  
**Thesis subject:** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 70 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 8 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 5  
**Mentor:** doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić  
**Technical assistance:** doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić

**COMPARISON OF GLYCOPHENOTYPES OF BREAST CANCER SUBPOPULATIONS  
AFTER THIENOPYRIDINE DERIVATIVE TREATMENT**

Loredana Delić, index number 196

**Diploma thesis title:** Comparison of glycophenotypes of breast cancer subpopulations after thienopyridine derivative treatment

**The aim of this study:** The aim of the research was to demonstrate the effect of phospholipase C inhibitor, alone or in combination with paclitaxel, on reducing the percentage of epithelial CD44-CD24<sup>+</sup> and luminal epithelial CD44-CD24<sup>-</sup> cells positive for CD15s and on lowering the average expression of CD15s glycoconjugate per CD44-CD24<sup>+</sup> and CD44-CD24<sup>+</sup> cell.

**Methods:** A newly synthesized phospholipase C inhibitor from the thieno [2,3-*b*] pyridine group was used on the MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell line. Cells were treated with a 2 μM phospholipase C inhibitor and / or paclitaxel for 48 hours, after which the fluorescence of antibody-stained samples on CD44, CD24, and CD15s was measured using a flow cytometer.

**Results:** The results are presented in statistical diagrams showing the percentages of luminal and epithelial cells of the MDA-MB-231 cell line positive for CD15s and the average expression of CD15s per cell of these population cells by groups depending on the use of the inhibitor, paclitaxel or a combination thereof. Paclitaxel decreased CD15s expression on epithelial cells without statistical differences. Inhibitor increased, and paclitaxel decreased CD15s expression in luminal cells, with no statistical significance. Inhibitor and paclitaxel decreased the mean expression of the CD15s marker per epithelial cell with statistical significance,  $p = 0.011$ . Paclitaxel decreased the mean expression of the CD15s marker per luminal cell without statistical significance.

**Conclusion:** Treatment of MDA-MB-231 cell line with 2 μM concentration of thieno [2,3-*b*] pyridine phospholipase C inhibitor statistically significantly reduced the percentage of epithelial CD44-CD24<sup>+</sup> cells per CD15s expression per breast cancer stem cell but did not significantly change the percentage of CD44<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup> subpopulations of CD15s marker-positive stem cells.

**Keywords:** breast-cancer, triple-negative breast cancer, thienopyridine derivative

**Thesis contain:** 49 pages, 5 table, 11 figures and 56 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:** 1. doc.dr.sc. Ana Šešelja Perišin  
2. prof. dr. sc. Anita Markotić  
3. doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić

**Defence date:** 29.11.2021.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

## POPIS KRATICA

- A2A receptor: adenoziński receptor A2A podskupine
- abl: protoonkogen koji, kodira protein-tirozin kinazu
- akt: gen koji kodira serin/treonin-protein-kinaze
- AR: androgeni receptor
- ATOX1- bakarni metalohaperonski protein
- Bcl-2: od engl. B-cell lymphoma 2
- BH-3: od engl. Bcl-homology-3, proapoptički proteini
- CCND1: gen koji kodira ciklin d1
- CD15s: od engl. cluster of differentiation 15s, glikoprotein stanične površine
- CD24: od engl. cluster of differentiation 24
- CD44: glikoprotein stanične površine uključen u međustanične interakcije, biljeg CSC
- c-Myc: onkogen, regulira staničnu proliferaciju i apoptozu
- DNA: deoksiribonukleinska kiselina
- DMSO: od engl. dimethyl sulfoxide; dimetil sulfoksid
- EGF: od engl. epidermal growth factor; epidermalni faktor rasta
- EMT: epitelno-mezenhimalni prijelaz
- ER: od engl. estrogen receptor; receptor za estrogen
- ERBB2: HER2 (receptor za humani epidermalni faktor)
- ERBB4: od engl. erb-B2 receptor tyrosine kinase 4
- EGFR: od engl. epidermal growth factor receptor; receptor za epidermalni faktor rasta
- EU: Europska unija
- FBS: od engl. fetal bovine serum; fetalni goveđi serum

- FGFR: od engl. fibroblast growth factor receptor; receptor za faktor rasta fibroblasta
- FISH: od engl. fluorescence in situ hybridization; fluorescentna in situ hibridizacija
- FOXA1: od engl. Forkhead Box A1
- G2/M: G2, od engl. second growth phase, prijelaz iz interfaze u fazu mitoze (M)
- HER2 ili HER2/neu od eng. human epidermal growth factor receptor 2; receptor za humani epidermalni faktor rasta
- HSP90: on engl. heat shock protein 90, protein toplinskog šoka 90
- IGF1R: od engl. insulin-like growth factor 1 receptor
- IP3-: od engl. inositol trisphosphate, inozitol trifosfat
- LAR: od engl. luminal androgen receptor
- MAPK: od engl. mitogen-activated protein kinase
- MDA-MB-231: stanična linija trostruko negativnog raka dojke
- MET: od engl. mesenchymal to epithelial transition
- mTOR: od engl. the mammalian target of rapamycin; meta rapamicina kod sisavaca
- Notch: heterooligomerni transmembranski proteinski receptor uključen u stanično signaliziranje
- NPI: Nottinghamski prognostički indeks
- NST: od engl. not special type; ne-specijalni tip
- PARP: od engl. poly-ADP ribose polymerase
- PBS: od engl. phosphate-buffered saline; izotonična otopina fosfatnog pufera s NaCl
- PLC: od engl. phospholipase C; fosfolipaza C
- p53: tumorsupresorski protein nazvan po molekulskoj masi od 53 kDa određenoj SDAPAGE metodom

- PDGF: od engl. platelet-derived growth factor
- PD-1: od engl. programmed cell death protein 1; protein programirane smrti 1
- PD-L1: od eng. programmed death-ligand 1
- PI3K: od engl. phosphoinositide 3-kinases; fosfoinozimid-3-kinaza
- PIK3CA: od engl. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; katalitička podjedinica alfa fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat 3-kinaze
- PKC: od engl. protein kinase C; protein kinaza C
- PIP2: od engl. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
- PLC: eng. phospholipase C; fosfolipaza C
- PR: eng. progesterone receptor; receptor za progesteron
- RNA: ribonukleinska kiselina
- Ras: od engl. rat sarcoma; protoonkogen, nazvan po otkriću transformirajućeg načela virusa štakorskog sarkoma
- SZO: Svjetska zdravstvena organizacija
- TNBC: od eng. triple-negative breast cancer; trostruko negativni rak dojke
- TNM klasifikacija: klasifikacija stupnja proširenosti tumora; T-veličina primarnog tumora; N-proširenost u regionalne limfne čvorove; M-metastaze
- TGF-  $\beta$ : od engl. transforming growth factor  $\beta$ ; transformirajući čimbenik rasta  $\beta$
- TP53: p53, protoonkogen
- TP63: tumorski protein p63
- UICC: od engl. International Union Against Cancer
- VEGFR: od engl. vascular endothelial growth factor receptor; receptor za faktor rasta vaskularnog endotela

- vHTS: od engl. virtual high throughput screen, probirom na osnovu računalnog modeliranja
- WNT: od engl. wingless-related integration site, glikoproteini izvanstaničnog matriksa koji se vezuje za neke od receptora sparene s G proteinima



*Zahvaljujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Nikolini Režić-Mužinić i prof.dr.sc. Aniti Markotić na pomoći prilikom izrade diplomskog rada, prijateljskom pristupu i uloženom vremenu.*

*Hvala mojoj obitelji, prijateljima i Marinu koji su bili uz mene u lijepim i teškim trenucima tijekom ovih godina studija.*

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	TUMOR.....	2
1.1.1.	EPIDEMIOLOGIJA TUMORA .....	3
1.1.2.	KLASIFIKACIJA TUMORA.....	5
1.1.3.	ONKOGENI I TUMOR SUPRESORSKI GENI.....	5
1.1.4.	KARAKTERISTIKE TUMORSKIH STANICA .....	7
1.1.5.	TUMORSKE MATIČNE STANICE.....	7
1.2.	KARCINOM DOJKE.....	8
1.2.1.	EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA .....	8
1.2.2.	KLINIČKA SLIKA.....	10
1.2.3.	PATOHISTOLOGIJA.....	10
1.2.4.	TNM KLASIFIKACIJA .....	11
1.2.5.	MOLEKULARNA KLASIFIKACIJA .....	13
1.3.	GLIKOFENOTIP TUMORA DOJKE .....	16
1.4.	TIENOPIRIDINSKI DERIVATI .....	18
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA .....	19
2.1.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	20
2.2.	HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	20
3.	MATERIJALI I METODE.....	21
3.1.	STANIČNA LINIJA TROSTRUKO NEGATIVNOG KARCINOMA DOJKE .....	22
3.2.	NOVOSINTETIZIRANI INHIBITOR.....	22
3.3.	PROTOČNA CITOMETRIJA .....	23
3.4.	USTROJ ISTRAŽIVANJA .....	25
3.5.	TRETIRANJE STANICA INHIBITOROM I IMUNOBOJANJE.....	26
3.6.	ANALIZA IZMJERENIH FLUORESCENCIJA S CILJEM DETEKCIJE POJEDINIH SUBPOPULACIJA S BILJEGOM CD15s .....	26
3.7.	STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA .....	28
4.	REZULTATI .....	29
4.1.	DJELOVANJE INHIBITORA, PAKLITAKSELA TE INHIBITORA I PAKLITAKSELA NA IZRAŽAJ CD15s+ SUBPOPULACIJE EPITELNIH STANICA MDA-MB-231.....	30
4.2.	DJELOVANJE INHIBITORA, NA IZRAŽAJ CD15s LUMINALNE STANICE MDA- MB-231 .....	30
4.3.	DJELOVANJE INHIBITORA NA PROSJEČNI IZRAŽAJ CD15s PO POJEDINOJ CD44-CD24+ STANICI MDA-MB-231 .....	31

4.4.DJELOVANJE INHIBITORA NA PROSJEČNI IZRAŽAJ CD15s PO POJEDINOJ CD44- CD24- STANICI MDA-MB-231 .....	32
5. RASPRAVA.....	33
6. ZAKLJUČCI .....	36
7. LITERATURA .....	38
8. SAŽETAK.....	44
9. SUMMARY .....	46
10. ŽIVOTOPIS.....	48

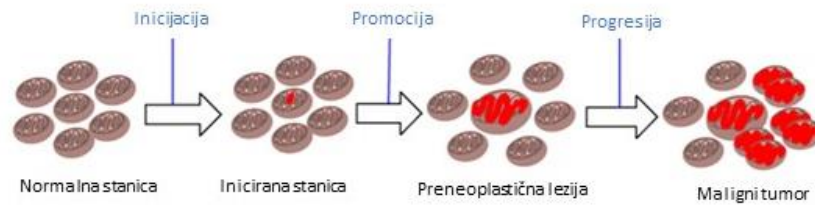
# **1. UVOD**

## 1.1. TUMOR

Abnormalne nakupine tkiva, čiji je rast autonoman, nesvrhovit, parazitarni, nepravilan i neorganiziran, nazivamo tumorom. Posljedica je prekomjerne proliferacije stanica, čiji rast nadmašuje rast normalnog tkiva. Razvrstavamo ih u dvije osnovne kategorije po kliničkoj klasifikaciji: benigne ili dobroćudne i maligne ili zloćudne. Međusobno se razlikuju u mnogim karakteristikama, kao što su tip stanica koji ih izgrađuje, lokalizacija i progresija bolesti, prisutnost različitih simptoma i ostalo, što utječe na tijek i klinički ishod bolesti te na odabir načina liječenja (1).

Benigne tumore izgrađuju dobro diferencirane stanice, koje su vrlo slične stanicama normalnog tkiva i ne šire se dalje po tijelu, već su lokalizirane na organ u kojem su nastale. Stoga imaju bolji klinički ishod i uglavnom ih je moguće kirurški ukloniti. Maligni tumor možemo mikroskopski razlikovati od benignog po prisutnosti atipičnih stanica, izrazitog pleomorfizma, uočljivih jezgri i brojnih, često patoloških mitozama. Karakterizira ih brži rast i razaranje tkiva organa u kojem nastaju (1). Maligni tumor nije ograničen na mjesto na kojem je nastao za razliku od benignog, već se može proširiti i na ostatak organizma uz pomoć krvožilnog ili limfatičkog sustava. S obzirom na vrstu stanica iz kojih nastaju većinu možemo podijeliti na karcinome, sarkome, leukemije i limfome. Pojam karcinom označava tumor epitelnih stanica i na njega otpada većina slučajeva raka u ljudi (2).

Povećani neoplastični rast povezan je s genskim promjenama, to jest mutacijama u slijedu DNA, kao što su supstitucija baza, translokacije, izbacivanje i umetanje segmenata DNA te preslagivanje unutar slijeda (3). Do mutacija može doći uslijed oštećenja DNA u slučaju izlaganja kemijskim, fizikalnim i biološkim agensima. Kao posljedica izlaganja karcinogenima, rak nastaje iz normalne stanice prolazeći kroz proces inicijacije, promocije i progresije. Inicijacija je ireverzibilni proces i dovodi do vezanja inicijacijskog faktora, karcinogena, na makromolekule stanice kao što je DNA. Promotor izaziva poticaj na proliferaciju stanica i on može, ali ne mora biti, karcinogen. Kroz proces progresije, benigni tumor postaje maligni (4) (Slika 1).



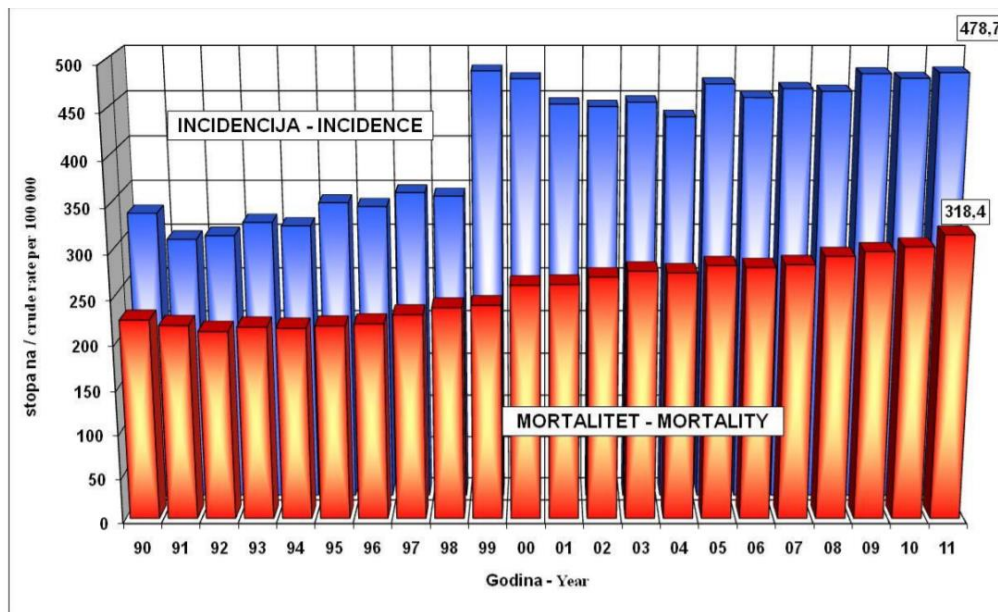
**Slika 1.** Proces karcinogeneze

Preuzeto sa: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29570697/>

Osim okolišnih faktora rizika, vrlo su bitni nasljedni čimbenici domaćina te uglavnom skupa dovode do razvoja tumora zbog čega tumore ne dijelimo na genetske i okolišne (5). DNA je izložena mnogim endogenim i egzogenim oštećenjima protiv kojih je razvila različite mehanizme popravka. Ukoliko ti procesi zakažu dolazi do gomilanja mutacija i porasta stope karcinogeneze (6). Mehanizmi popravka DNA omogućavaju održavanje genske stabilnosti, a neki od njih su uklanjanje baza, uklanjanje nukleotida, homologna rekombinacija, nehomologno spajanje krajeva i popravak neusklađenosti (7).

### 1.1.1. EPIDEMIOLOGIJA TUMORA

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo glavni uzročnik smrti u Hrvatskoj su krvožilne bolesti nakon kojih slijedi rak. U 2011. godini incidencija je bila 478.7 na 100 000 dok je mortalitet bio 318.4 na 100 000 (8) (Slika 2).



**Slika 2.** Stope incidencije i mortaliteta od raka u hrvatskoj od 1990. do 2011. godine

Preuzeto sa: [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/rak\\_2011.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/rak_2011.pdf)

U muškaraca se najčešće pojavljivao rak traheje, bronha i pluća (19%), prostate (15%), kolona (9%), mokraćnog mjehura (7%) i rektuma, rektosigme i anusa (6%). Kod žena je bila malo drugačija pojavnost i najčešći je bio rak dojke (20%), zatim rak traheje, bronha i pluća (8%), kolona (8%), tijela maternice (7%), jajnika, jajovoda i adneksa (5%) (8). Rizični čimbenici za nastanak tumora su dob, spol, genetička predispozicija, prehrana, okoliš, infekcije, lijekovi i radioterapija. Dob predstavlja faktor rizika zbog kumulativnog djelovanja karcinogena, nakupljanja genskih mutacija i slabljenja kontrolnih mehanizama. Različita je pojavnost određenih vrsta tumora s obzirom na spol, kao na primjer tumor dojke koji je 100 puta učestaliji u ženskog spola. Za nastanak raka želudca pogoduje zaraza bakterijom *Helicobacter pylori* koja je uzročnik kroničnog gastritisa (1). Neke od virusnih infekcija pokazale su uzročno posljedičnu vezu u nastanku tumora. Primjer su rak grlića maternice, orofaringealni karcinom i različiti anogenitalni karcinomi koji su povezani sa infekcijom humanim papiloma virusom, hepatocelularni karcinom kojem doprinosi zaraza hepatitisom C ili B i T-stanični limfom kojeg uzorkuje humani T-limfotrofni virus 1 (9). Prehrana najviše ima utjecaj na nastanak tumora u probavnom sustavu (1). Prehrana siromašna folatima, koji sudjeluju u metabolizmu DNA, može dovesti do razvitka kolorektalnog ili karcinoma gušterače (10).

### **1.1.2. KLASIFIKACIJA TUMORA**

Tumori se mogu podijeliti prema kliničkoj, morfološkoj, histogenetskoj i etiološkoj klasifikaciji. Za potrebe morfološke klasifikacije svi se mogu mikroskopski proučavati dok su pojedini i makroskopski uočljivi. Makroskopski se mogu uočiti papilomi, polipi, ulkusi, ciste. Nediferencirane ili atipične stanice mogu se otkriti mikroskopskom pretragom tumora. One ne nalikuju na normalne stanice i obično imaju jezgru nepravilnog oblika te im je omjer citoplazme i jezgre manji nego kod normalnih stanica. Ovisno o stupnju diferencijacije tumori se mogu stupnjevati po zloćudnosti. Što su manje diferencirane stanice tumora, to je tumor zloćudnije naravi. Histogenetska klasifikacija tumora otkriva iz koje vrste stanica je tumor nastao, što se može saznati iz mikroskopskog pregleda. Etiološka klasifikacija nam govori o uzroku nastanka tumora, a kod većina tumora radi se o kombinaciji genetičke predispozicije i faktora okoliša (1).

### **1.1.3. ONKOGENI I TUMOR SUPRESORSKI GENI**

Prilikom proučavanja virusnih onkogeni, otkriveni su protoonkogeni u normalnim stanicama. Protoonkogeni su stanični geni uključeni u proces regulacije diferencijacije i proliferacije. U slučaju njihove mutacije mogu nastati onkogeni koji uzrokuju transformaciju stanica, dovodeći do nenormalne proliferacije stanica i nastanka tumora (11) (Tablica 1). Kontrola staničnog rasta se odvija kroz nekoliko koraka, a započinje vezanjem faktora rasta za stanični receptor. Potom na različite načine može dovesti do aktivacije unutarstaničnog proteina. Aktivirani protein se može izravno vezati na DNA, stvoriti kompleks s proteinima koji se vežu na DNA ili modificirati proteine koji se vežu na DNA, što dovodi do stimulacije ekspresije gena povezanih s proliferacijom. Stanica može suprimirati razvoj stanica raka tako da inhibira transkripcijske čimbenike povezane s proliferacijom ili izravnom inaktivacijom aktiviranih molekula (12).

Do nastanka aktiviranih onkogeni, može doći zbog amplifikacije gena, točkastih mutacija, kromosomskih reorganizacija i umetanja promotora (13).



<b>Onkogen</b>	<b>Vrsta raka</b>	<b>Mehanizam aktivacije</b>
abl	kronična mijeloična leukemija, akutna limfoblastična leukemija	translokacija
akt	karcinom jajnika, dojke, gušterače	amplifikacija
bcl-2	folikularni B-stanični limfom	translokacija
CCND1	adenom paratireoide, B-stanični limfom	translokacija
CCND1	planocelalni karcinom, karcinom mjehura, dojke, jednjaka, jetara i pluća	amplifikacija
c-myc	Burkittov limfom	translokacija
c-myc	karcinom dojke i pluća	amplifikacija
rasH	karcinom štitnjače	točkasta mutacija

**Tablica 1.** Primjeri onkogenih svojstvenih ljudskim tumorima (2)

Nekontrolirani rast uzrokuju onkogeni proteini u koje spadaju polipeptidni čimbenici rasta, receptori za čimbenika rasta, unutarstanični signalni proteini, transkripcijski čimbenici i regulator staničnog ciklusa, ciklin D1 (2).

Uz aktivaciju onkogenih, u nastanku raka uključena je i inaktivacija tumor supresorskih gena, koji djeluju kao negativni regulatori staničnog rasta (14). Do otkrića prvog tumor supresorskog gena, RB1 gena, došlo je uslijed proučavanja retinoblastoma, maligne bolesti pedijatrijske populacije. Ustanovilo se da je za pojavu bolesti zaslužan nedostatak tog gena. Također je dokazan nedostatak ili mutacija tog gena i u drugim karcinomima (15). Osim Rb gena, postoje mnogi drugi značajni tumor supresorski geni kao što je p53. U 50% malignih tumora prisutna je mutacija ili nedostatak tog gena. P53 suprimira tumorski rast na način da inducira gene uključene u zaustavljanje staničnog ciklusa, apoptozu, starenje i popravak DNA te sudjeluje u regulaciji metabolizma i modulaciji reaktivnih kisikovih spojeva (16).

S pronalaskom onkogenih i tumor supresorskih gena došlo je do razvitka novih lijekova s bitno različitim svojstvima od citotoksičnih lijekova (17).

#### **1.1.4. KARAKTERISTIKE TUMORSKIH STANICA**

Tumorske stanice nastaju transformacijom normalnih stanica, pri kojoj dobivaju nova svojstva koja im omogućavaju neograničen rast. Neke od stečenih karakteristika su stalni poticaj na stanični rast, gubitak kontrole proliferacije, izbjegavanje programirane stanične smrti, neograničena proliferacija, angiogeneza, invazija, metastaziranje i kolonizacija (1). Jedan primjer su promjene u signalnom putu receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR, eng. *epidermal growth factor receptor*) u kojem može doći do pretjerane autokrine proizvodnje liganada tog receptora ili mutacija u genu za EGFR. Kao posljedica tih promjena nastaje stalni poticaj na staničnu proliferaciju. Stare stanice i one koje više nemaju svoju ulogu, kao što su stanice endometrija tijekom menstruacije, ulaze u proces programirane stanične smrti ili apoptozu (18). Za poticaj na apoptozu bitni su proapoptotični i antiapoptotični proteini te BH-3 proteini koji reguliraju odnos između njih. Proapoptotični proteini dovode do aktivacije kaspaza, enzima bitnih za izvršavanje apoptoze. Promjene u bilo kojem od navedenih segmenata mogu dovesti do poremećaja u homeostazi diobe i smrti stanice, što može dovesti do gomilanja tumorskih stanica (1). Normalne stanice u kulturi neće neograničeno rasti nego će proliferirati ovisno o gustoći, dok kod tumorskih stanica neće doći do inhibicije proliferacije ovisne o gustoći. Na površini normalnih stanica prisutne su adhezijske molekule pomoću kojih stupaju u interakciju s drugim stanicama i sastojcima tkiva. Smanjena ekspresija adhezijskih molekula na tumorskim stanicama omogućava tumoru širenje i metastaziranje na ostatak organizma. Da bi tumor nastavio rasti, luči faktore koji stimuliraju angiogenezu. Stvarajući nove krvne žile, osigurava si kisik i hranjive tvari (2). Također, može doći do metaboličkih promjena koje omogućavaju otpornost tumora na hipoksiju (1).

#### **1.1.5. TUMORSKE MATIČNE STANICE**

Matične stanice su nediferencirane stanice koje imaju sposobnost beskonačnog obnavljanja samih sebe. S obzirom da tumori imaju mogućnost neograničene proliferacije, otkrivaju se stanice koje iniciraju nastanak tumora i imaju svojstva matičnih stanica. Tumorske matične stanice mogu nastati iz normalnih matičnih i tumorskih diferenciranih stanica (19). Osim njihove uloge u poticanju tumorskog rasta, važne su i kod povrata tumora nakon liječenja i kod metastaziranja na udaljena tkiva. Intezivan tumorogeni potencijal, sposobnost rasta kao sfere s

nedostatkom seruma, visoka aktivnost aldehid dehidrogenaze (ALDH) i neregulirani stanični ciklus razlikuju tumorske matične stanice od normalnih matičnih stanica. Zbog svojih karakteristika, često su razlog rezistencije tumora na radio i kemoterapiju (20). Glavninu tumora čine diferencirane stanice kćeri koje nastaju asimetričnom podjelom tumorskih matičnih stanica. One se brzo šire i imaju ograničen proliferacijski potencijal u slučaju masovne stanice raka i progenitora (21). Nakon što je tumor formiran, tumorske matične stanice se nalaze u stadiju staničnog ciklusa G0, to jest u stadiju mirovanja stanice, što znači da se ne dijele. Kemoterapija djeluje na stanice koje se najbrže dijele, zbog čega matične tumorske stanice opstaju. Imaju povećanu ekspresiju gena uključenih u epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT), koja im omogućava diferencijaciju u različite tipove stanice i na taj način mogućnost stvaranja metastaza na udaljenim tkivima. Povećana aktivnost ALDH štiti tumorske matične stanice od oksidativnog stresa, održavajući nisku razinu reaktivnih kisikovih spojeva. Također doprinosi rezistenciji tumora na određene kemoterapijske agense (22). Uz navedene, važni su i izbjegavanje apoptoze tumorskih matičnih stanica pomoću mehanizama popravka DNA te aktivni procesi izbacivanja antitumorskog lijeka (21). Marker tumorskih matičnih stanica bi mogli poslužiti u terapijske, dijagnostičke i prognostičke svrhe. Većina markera je prisutna i u normalnim stanicama, stoga je važno koristiti se kombinacijom određenih tipova markera. Kao primjer mogu se izdvojiti stanični markeri na tumorskim matičnim stanicama dojke: CD24, CD44, CD29, CD49f, CD61, CD70, CD90, CD133 i ostali površinski stanični te unutarstanični markeri (23). Razvojem ciljane terapije na tumorske matične stanice dolazi se do napretka u liječenju tumora otpornih na trenutnu terapiju (21).

## **1.2. KARCINOM DOJKE**

### **1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA**

Tumor dojke može biti benigni i maligni te može nastati iz epitela ili strome (1). Karcinom dojke zauzima prvo mjesto u stopi incidencije karcinoma kod žena u svijetu ali liječenje može biti vrlo uspješno ako se na vrijeme otkrije (24). U Hrvatskoj je također na prvom mjestu, a incidencija mu je 2011. godine bila 94,4 na 100 000 (8). Incidencija je viša u razvijenim zemljama dok je stopa mortaliteta viša u niže razvijenim zemljama (25). Heterogena je bolest koja obuhvaća različite faktore rizika, patološke značajke, kliničke manifestacije, odgovore na

terapiju i ishode liječenja (26). Stopa preživljenja je u porastu, što se može zahvaliti češćim pregledima u široj populaciji i naprednijim načinima liječenja (27).

U proces nastanka raka dojke uključeni su različiti faktori rizika (Tablica 2), a najveći relativni rizik nosi dob. Znatniji porast incidencije događa se između 35 i 40 godina nakon čega slijedi stalni porast (28).

<b>Čimbenik rizika</b>	<b>Relativni rizik za nastanak raka dojke</b>
Dob	15 puta
Pozitivna obiteljska anamneza	8 puta
Starija životna dob prvorođilje	4 puta
Nerotkinja	4 puta
Rana menarha i kasna menopauza	2,5 puta
Zračenje	5 puta
Debljina	3 puta
Oralni kontraceptivi	1,8 puta
Hormonska nadomjesna terapija	1,4 puta
Dijagnoza dobroćudnih parenhimatoznih bolesti dojke	5 puta

**Tablica 2.** Čimbenici rizika i pridruženi relativni rizici za nastanak raka dojke (28)

Životna dob pri prvom porođaju utječe na rizik nastanka raka dojke, pri čemu raniji porođaj ima zaštitnu ulogu. Također se pokazalo da veći broj porođaja smanjuje rizik ali u manjem značaju. Rana pojava prve menstruacije i kasna menopauza imaju negativan utjecaj, što se može pripisati većoj izloženosti estrogenu i samim tim većoj vjerojatnosti pojave tumora (28).

### **1.2.2. KLINIČKA SLIKA**

Rak dojke se češće pojavljuje u lijevoj nego u desnoj dojci te u 50% slučajeva nastaje u gornjem lateralnom kvadrantu. Mjesto nastanka tumora je bitno jer određuje način širenja (1). Kao najčešći simptom raka dojke pojavljuje se kvržica. Neke od ostalih promjena koje se događaju su promjene na bradavicama, bol u dojčkama, ulceracije dojke i abnormalnosti kože dojke. Uglavnom se brzo dijagnosticira, a slučajevi koji su kasnije dijagnosticirani povezani su sa smanjenim petogodišnjim preživljenjem (29). Ukoliko dođe do većeg napredovanja tumora dojke, može doći do pojave edema ruke, što je znak da se tumor proširio na regionalne limfne čvorove (28).

Poželjno bi bilo provoditi redovitu samokontrolu dojke i ići na inspekcijsko-palpacijski pregled liječnika kako bi se rak otkrio u predkliničkom stadiju (28). Postoje suvremene dijagnostičke metode od kojih se mamografija smatra zlatnim standardom. U slučaju dvosmislenih i sumnjivih nalaza, točnost dijagnoze može potvrditi digitalna tomosinteza. Ostale metode su ultrazvuk i magnetska rezonancija pomoću kojih se može dijagnosticirati, klasificirati i pratiti tijek bolesti. Histološka klasifikacija se određuje pomoću perkutane biopsije kao minimalno invazivne metode (30).

### **1.2.3. PATOHISTOLOGIJA**

Rak dojke se očituje kroz različite kliničke simptome, faktore rizika, patološka obilježja i odgovore na liječenje. Određivanje histološke ocjene i histološkog tipa može pomoći u određivanju stupnja agresivnosti, obrasca rasta tumora i načina liječenja. Epitelni rak dojke može nastati iz žljezdanog parenhima, izvodnih kanalića (duktalni tip) ili žljezdanih lobula (lobularni tip). Ovisno o tome probijaju li bazalnu membranu, dijelimo ih na invazivne i neinvazivne (in situ) karcinome. Postoje i drugi histološki tipovi tumora dojke, kao što su tubularni, mucinozni, metaplastični, papilarni, mikropapilarni i medularni, ali su oni mnogo rjeđe dijagnosticirani. Najčešće dijagnosticirani su invazivni duktalni i invazivni lobularni karcinom, na koje otpada 80-95% svih tumora dojke. S obzirom na njihova imunohistokemijska i genska obilježja, tumore možemo podijeliti na luminalne tumore tipa A i B, HER2 pozitivne i trostruko negativne tumore. Luminalni tumor tipa A ima visoku razinu estrogenskih i progesteronskih receptora, Ki-67 manji od 20% i negativan je na humani receptor epidermalnog

faktora rasta (HER 2, eng. *human epidermal growth factor receptor*), dok luminalni tumor tipa B ima razinu progesteronskih receptora nižu od 20% ili Ki-67 veći od 20%, pozitivan je na estrogenske i HER2 receptore. Trostruko negativni karcinom ima najlošiju prognozu jer je negativan na sva tri navedena parametra (26). Određivanje histološke ocjene bitno je kod invazivnih karcinoma i provodi se na temelju procjene formacije tubula, promjena na jezgri i mitotičkog indeksa (31). Parametri koji se navode u patohistološkom opisu tumora dojke su veličina tumora u dvije dimenzije, stupanj zloćudnosti, proliferativna aktivnost ili mitotički indeks kroz Ki-67 indeks, status hormonskih i HER2 receptora, broj pregledanih i pozitivnih limfnih čvorova te odnos tumora prema limfnim i krvnim žilama (28).

#### 1.2.4. TNM KLASIFIKACIJA

TNM sustav klasifikacije tumora koristi se za određivanje stadija tumora s obzirom na: T- veličinu tumora, N-prisutnost bolesti u regionalnim limfnim čvorovima i M- prisutnost metastaza (Tablica 3 i 4). Također pomaže kliničarima u planiranju liječenja, dobivanju informacija o prognozi, uspoređivanju rezultata liječenja, razmjeni informacija u različitim centrima liječenja i istraživanju zloćudnih bolesti (32).

TNM	Značenje
Tis (DCIS)	Duktalni karcinom <i>in situ</i>
Tis (Paget)	Pagetova bolest bradavice nepovezana sa invazivnim karcinomom i/ili DCIS u podložećem parenhimu
T1	tumor $\leq 20$ mm u najvećem promjeru
T1mi	tumor $\leq 1$ mm u najvećem promjeru
T1a	tumor $> 1$ mm, ali $\leq 5$ mm u najvećem promjeru
T1b	tumor $> 5$ mm, ali $\leq 10$ mm u najvećem promjeru
T1c	tumor $> 10$ mm, ali $\leq 20$ mm u najvećem promjeru
T2	tumor $> 20$ mm, ali $\leq 50$ mm u najvećem promjeru
T3	tumor $> 50$ mm u najvećem promjeru
T4	tumor bilo koje veličine s direktnom invazijom stjenke prsnog koša i/ili kože (ulceracija ili makroskopski kožni čvorovi)

T4a	ekstenzija tumora na stjenku prsnog koša; invazija ili adherencija pektoralnog mišića u odsutnosti invazije struktura stjenke prsnog koša ne kvalificira se kao T4
T4b	ulceracija i/ili ipsilateralni makroskopski satelitski čvor i/ili edem (uključujući 'peau d'orange') kože, koji ne uključuje kriterije inflamiranog karcinoma
T4c	prisutni kriteriji T4a i T4b
T4d	inflamirani karcinom
Nx	ne može se procijeniti (nije uzet uzorak za PHD analizu)
N0	nije se identificiralo metastaza u limfnim čvorovima ni ITC (eng. isolated tumor cells)
N0 (i+)	samo ITCs (nakupine malignih stanica ne veće od 0,2 mm) u regionalnim limfnim čvorovima
N0 (mol+)	pozitivan nalaz RT-PCR-om; nije se detektiralo ITCs
N1mi	mikrometastaze (> 0,2 mm, ali ≤ 2,0 mm)
N1a	metastaze u 1 – 3 aksilarna limfna čvora, najmanje 1 metastaza > 2,0 mm
N1b	metastaza u ipsilateralne interne mamarne limfne čvorove čuvare, isključujući ITC
N1c	N1a i N1b
N2a	metastaza u 4 – 9 aksilarnih limfnih čvorova (najmanje 1 tumorski depozit > 2,0 mm)
N2b	metastaze klinički detektirane u internim mamarnim limfnim čvorovima, sa ili bez mikroskopske potvrde; s patološki negativnim aksilarnim limfnim čvorovima
N3a	metastaza u 10 ili više aksilarnih limfnih čvorova (najmanje 1 tumorski depozit > 2,0 mm) ili metastaza u infraklavikularne limfne čvorove (razina III aksilarnih limfnih čvorova)
N3b	N1a ili N2a u prisutnosti N2b (slikovnim metodama pozitivni interni mamarni limfni čvorovi); ili N2a u prisutnosti N1b
N3c	metastaze u ipsilateralne supraklavikularne limfne čvorove
M0 (i+)	bez kliničkog ili radiološkog dokaza o postojanju metastaze, uz prisutnost depozita tumorskih stanica < 0,2 mm dokazanog mikroskopski ili molekularnim metodama
M1	metastaza dokazana klinički ili slikovnim metodama i/ili histološki dokazana metastaza > 0,2 mm

**Tablica 3.** TNM klasifikacija raka dojke (28)

<b>Stadij</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
Stadij 0	Tis	N0	M0
Stadij IA	T1	N0	M0
Stadij IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	
Stadij IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	
	T2	NO	
Stadij IIB	T2	N1	M0
	T3	NO	
Stadij IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	
	T2	N2	
	T3	N1,N2	
Stadij IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stadij IIIC	Bilo koji T	N3	M0
Stadij IV	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

**Tablica 4.** Stadij raka dojke (28)

### **1.2.5. MOLEKULARNA KLASIFIKACIJA**

U tradicionalnoj TNM klasifikaciji, nedostaje molekularna komponenta koja pokazuje biološke razlike među pojedinim tumorima dojke. Prema molekularnoj klasifikaciji razlikujemo 4 intrinzične podvrste: luminalni tip A, luminalni tip B, HER2 pozitivni i trostruko negativni tumor. Najčešće dijagnosticirani je luminalni tumor tipa A koji ujedno ima najbolju prognozu. S obzirom da ima veću ekspresiju estrogenskih i progesteronskih receptora uglavnom je dovoljno hormonsko liječenje. Negativan je na HER2, Ki67 je manji od 14% i ima mali rizik za povratak bolesti. Kod luminalnog tumora tipa B prognoza je lošija i zbog slabijeg izražavanja hormonskih receptora u većini slučajeva potrebno je dodatno kemoterapijsko liječenje. Agresivnije podvrste su HER2 pozitivni i trostruko negativni tumori. Ostala obilježja HER2 pozitivnih tumora su nedostatak estrogenskih i progesteronskih receptora te visoka histološka



ocjena (33). Novi oblici liječenja, koristeći anti-HER2 protutijela, omogućila su veću stopu preživljenja kod pacijenata dijagnosticiranih s tim tipom tumora. Kombinacija pertuzumaba i transtuzumaba, koja djeluje na HER2 receptore, izuzetno se pokazala učinkovitom (34). Najlošiju prognozu ima trostruko negativni tumor koji ima veću stopu povratka bolesti u pet godina nakon dijagnoze. Obilježava ga nedostatak estrogenskih, progesteronskih i HER2 receptora te više izraženi geni za proliferaciju (33). Najčešće se pojavljuje kod žena mlađih od 40 godina koje još nisu ušle u menopauzu. Ne odgovara na hormonsku i molekularnu terapiju, stoga je kemoterapijsko liječenje glavni izbor. Trostruko negativne tumore razvrstavamo u 6 podvrsta (Tablica 5) ovisno o ekspresiji gena: bazalni tip 1 (BL1), bazalni tip 2 (BL2), imunomodulatorni (IM), mezenhimalni (M), mezenhimalni matični (MSL) i luminalni androgeni tip (LAR). Svrstavanje tumora u određene kategorije pomaže kod odabira terapije i procjene prognoze. Kod BL1 zamijećena je abnormalna ekspresija gena uključenih u regulaciju proliferacije i gena za popravak DNA. Geni promijenjeni u BL2 tipu su geni povezani sa signalnim putevima kao što su EGFR, TP63 i MET. IM tip ima promjene u imunološkim signalnim putovima, dok M i MSL tip pokazuju visoku aktivnost signalnih puteva uključenih u migraciju i diferencijaciju stanica te pokazuju veću sklonost epitelno-mezenhimalnoj tranziciji. MSL tip se razlikuje po većoj ekspresiji gena vezanih za matične stanice i posebnih markera mezenhimalnih matičnih stanica te također pokazuje manju ekspresiju gena za proliferaciju stanica. Od svih podvrsta trostruko negativnog tumora, najviše se razlikuje LAR koji ima visoko izražene androgene receptore što mu omogućava liječenje nesteroidnim antiandrogenima. (35).

<b>TNBC podvrsta</b>	<b>Terapijska strategija</b>	<b>Ciljni terapijski lijekovi</b>
bazalni tip 1	inhibicija stanične proliferacije i odgovor na DNA oštećenja	Inhibitori mitoze (Paclitaxel, Docetaxel, Ixabepilone, Nab-Paclitaxel, Vinorelbine)  Citostatici (Cisplatin, Carboplatin, Nedaplatin, Etoposid, Oxaliplatin, Lobaplatin, Satraplatin, Mercaptopurine)  PARP inhibitori (Olaparib, Rucaparib, Talazoparib, Niraparib)  Inhibitori sinteze DNA (Topotecan, Irinotecan, Camptothecin, Doxorubicin, Daunorubicin, Mitomycin)

bazalni tip 2	inhibicija EGFR, MET, TP63 signalizacije	<p>Citostatici (Cisplatin, Carboplatin, Nedaplatin, Eptaplatin, Oxaliplatin, Lobaplatin, Satraplatin, Mercaptopurine)</p> <p>PARP inhibitori (Olaparib, Rucaparib, Talazoparib and Niraparib)</p> <p>Inhibitori faktora rasta (Erlotinib, Gefitinib, Afatinib, Osimertinib, Olmutinib, Nazartinib, Avitinib, lapatinib, Cetuximab, Panitumumab, Vandetanib, Bevacizumab, Pertuzumab, Ramucirumab, Trastuzumab, Axitinib, Cabozantinib, Ceritinib, Crizotinib, Lenvatinib, Nilotinib, Pazopanib, Regorafenib, Sorafenib, Sunitinib)</p> <p>mTOR inhibitori (rapamycin, everolimus, RapaLink-1)</p>
imunomodulatorni	inhibicija imunološkog signaliziranja	<p>Citostatici (Cisplatin, Carboplatin, Nedaplatin, Eptaplatin, Oxaliplatin, Lobaplatin, Satraplatin, Mercaptopurine)</p> <p>PARP inhibitori (Olaparib, Rucaparib, Talazoparib and Niraparib)</p>
mezenhimalni	inhibicija EMT, Wnt, PI3K, mTOR, Scr, TGF $\beta$ , IGF1R, Notch	<p>Inhibitori faktora rasta (Erlotinib, Gefitinib, Afatinib, Osimertinib, Olmutinib, Nazartinib, Avitinib, lapatinib, Cetuximab, Panitumumab, Vandetanib, Bevacizumab, Pertuzumab, Ramucirumab, Trastuzumab, Axitinib, Cabozantinib, Ceritinib, Crizotinib, Lenvatinib, Nilotinib, Pazopanib, Regorafenib, Sorafenib, Sunitinib)</p> <p>mTOR inhibitori (Rapamycin, Everolimus, RapaLink-1)</p> <p>Scr inhibitori (Bosutinib, Dasatinib)</p> <p>PI3K inhibitors (Idelalisib)</p>
mezenhimalni matični	Inhibicija EMT, Wnt, TGF $\beta$ , MAPK, Rac, PI3K, mTOR, Scr, PDGF	<p>Inhibitori faktora rasta (Erlotinib, Gefitinib, Afatinib, Osimertinib, Olmutinib, Nazartinib, Avitinib, lapatinib, Cetuximab, Panitumumab, Vandetanib, Bevacizumab, Pertuzumab, Ramucirumab, Trastuzumab, Axitinib, Cabozantinib, Ceritinib, Crizotinib, Lenvatinib, Nilotinib, Pazopanib, Regorafenib, Sorafenib, Sunitinib)</p>

		mTOR inhibitori (rapamycin, everolimus, RapaLink-1) PI3K inhibitori (Idelalisib) MAPK inhibitori (Trametinib, Dabrafenib) Ser inhibitori (Bosutinib, Dasatinib)
luminalni s androgenim receptorom	Inhibicija AR, FOXA1 i ERBB4 signaliziranja	Nesteroidni antiandrogeni (bicalutamide) mTOR inhibitori (rapamycin, everolimus, RapaLink-1) PI3K inhibitori (Idelalisib)

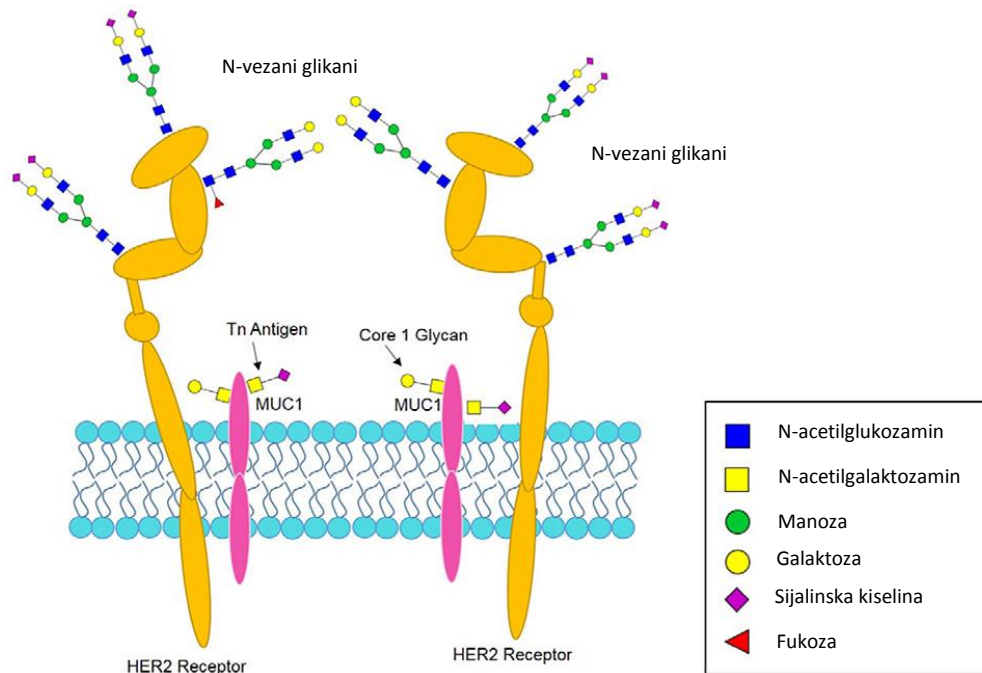
**Tablica 5.** Potencijalna terapijska strategija i ciljni lijekovi korišteni za određenu podvrstu trostruko negativnog raka dojke (35)

Tumorske matične stanice imaju bitno ulogu u razvoju i rezistenciji trostruko negativnog tumora na terapiju zahvaljujući svojoj sposobnosti samoobnavljanja i ponovnog uspostavljanja heterogene populacije tumorskih stanica. CD44, CD24, i ALDH predstavljaju glavne markere tumorskih matičnih stanica tumora dojke (36).

### 1.3. GLIKOFENOTIP TUMORA DOJKE

Na stanicama se nalaze molekule kao što su glikokonjugati, koji stupaju u interakciju s okolnim stanicama i imaju ulogu u adheziji bakterija, strukturi membrane i staničnoj imunogeničnosti. Glikokonjugati se razlikuju ovisno o stanicama na kojima se nalaze, staničnoj diferencijaciji i stupnju razvoja stanice. Patološkom promjenom stanica, kao što je transformacija u stanice raka, dolazi do modifikacije glikokonjugata s posljedičnom promjenom u odnosu s okolnim stanicama, adhezivnosti i imunogeničnosti (37). Glikozilacija je proces u kojem dolazi do vezanja jedinica saharida na lipide i proteine koji se nalaze na staničnoj površini što dovodi do nastanka glikokonjugata. Promjene u glikozilaciji važne su u nastanku tumora stoga imaju potencijalnu ulogu u dijagnozi, prognozi i liječenju tumora dojke (38). Uspoređujući normalne i tumorske stanice, primijetila se razlika u ekspresiji glikoziltransferaza, enzima uključenih u glikozilaciju. Sijalil i fukoziltransferaze su pokazale povećanu aktivnost u tumorskim stanicama za razliku od galaktozil i N-acetilglukozamin transferaza, koje su aktivnije u normalnim stanicama. Jedan od prvih serumskih biomarkera tumora dojke bio je CA15-3, to jest glikozilirani

mucin-1. Promjene u glikozilaciji mucina-1 su povećale adhezivnost tumora za druga tkiva uzrokujući povećanu stopu metastaziranja (Slika 3).



**Slika 3.** HER2 receptor i muc1 kao primjer glikoproteina. prikaz n- i o- vezanih glikana na glikoproteinima stanične membrane nađenim u tumoru dojke.

Preuzeto sa : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6702063/>

Sijalizacija je postupak vezanja sijalinske kiseline na krajeve glikoproteina, a kao produkti sijalizacije na tumorskim stanicama mogu se istaknuti Thomsen-Friedenreichovi antigeni, sijalil Lewis antigeni, sijalil  $\alpha$ 2,6-laktozaminske strukture i polisijalinske kiseline. Povećana ekspresija sijalil Lewis X i sijalil Lewis A antigena je prisutna na različitim tumorskim stanicama. Oni služe kao ligandi za adhezijske receptore na aktiviranim endotelnim stanicama omogućavajući stvaranje metastaza. Uz proces sijalizacije, primijećena je i povećana aktivnost fukozilacije, dodatka fukoze na krajeve membranskih struktura, koja je povezana sa nastankom Lewis X, Lewis Y, sijalil Lewis X i sijalil Lewis A antigena. Povećana ekspresija sijalil Lewis X antigena povezana je s lošijom prognozom bolesti. Ovi procesi uzrokuju modifikaciju tumorskih stanica koja dovodi do rasta aktivnosti u proliferaciji, endotelno-mezenhimalnoj transmisiji, metastaziranju i stvaranju otpornosti na kemoterapiju (39).

## 1.4. TIENOPIRIDINSKI DERIVATI

Derivati piridina imaju različita biološka obilježja i djelovanja kod ljudi, stoga se pokazao interes za dodatna istraživanja njegovih spojeva. Tienopiridini predstavljaju posebnu skupinu heterocikličkih derivata piridina, koja se posebno istražuje i mogu se klasificirati u 6 izomernih grupa: tieno[2,3-*b*]piridin, tieno[2,3-*c*]piridin, tieno[3,2-*c*]piridin, tieno[3,4-*b*]piridin i tieno[3,4-*c*]piridin. Učinci tieno[2,3-*b*]piridinskih derivata su mnogobrojni, a mogu se izdvojiti imunoregulacija, blokiranje kalcijских kanala, inhibicija topoizomeraze i 5-lipooksigenaze, antagonističko vezanje za endotelni receptor, vezanje za receptore g-aminomaslačne kiseline i mnogi drugi s posljedičnim protuupalnim, antialergijskim, analgetskim i protutumorskim djelovanjem (40). Protutumorsko djelovanje ostvaruje preko inhibicije fosfolipaze C i modulacije nekih drugih ciljnih molekula kao što su adenzinski A2A receptor, tubulin, bakarni metalohaperonski protein (ATOX1), tirozil DNA fosfodiesteraza 1 i G-protein sparni receptor. Razvijanje posebnih derivata tieno[2,3-*b*]piridina s ciljem djelovanja na specifične molekule, omogućilo bi napredak u liječenju mnogih karcinoma (41,42).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

## **2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Nakon primjene inhibitora fosfolipaze C, samog ili u kombinaciji s paklitakselom na staničnoj liniji MDA-MB-231 ciljevi istraživanja su::

1. odrediti postotak epitelnih CD44-CD24+ i luminalno epitelnih CD44-CD24- stanica pozitivnih na CD15s,
2. odrediti prosječni izražaj CD15s po jednoj CD44-CD24+ i CD44-CD24- stanici.

## **2.2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**

Primjena inhibitora fosfolipaze C samog ili u kombinaciji s paklitakselom će unutar stanične linije MDA-MB-231:

1. sniziti postotak epitelnih CD44-CD24+ i luminalno epitelnih CD44-CD24- stanica pozitivnih na CD15s,
2. sniziti prosječni izražaj CD15s po jednoj CD44-CD24+ i CD44-CD24- stanici.

### **3. MATERIJALI I METODE**



### **3.1. STANIČNA LINIJA TROSTRUKO NEGATIVNOG KARCINOMA DOJKE**

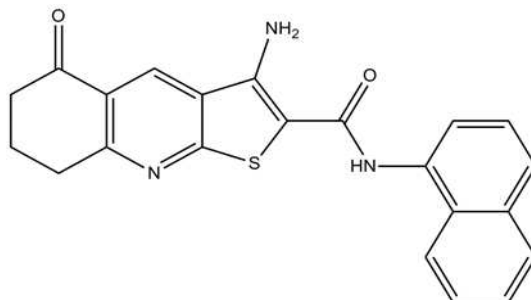
U istraživanju je korištena stanična linija trostruko negativnog raka dojke MDA-MB-231. MDA-MB-231 stanična linija pripada mezenhimalnom matičnom tipu karcinoma dojke. Karakteriziraju je abnormalnosti u genima za mobilizaciju stanica, diferencijaciju, signalizaciju faktorima rasta, epidermalno-mezenhimalnu tranziciju (EMT), proliferaciju i genima za angiogenezu, što doprinosi njenoj invazivnosti i agresivnosti (35). Može izražavati markere tumorskih matičnih stanica, CD44 i CD24, koji su i povezani s EMT (43). Stanice koje izražavaju CD44, imaju veću aktivnost gena uključenih u pokretnost stanice, proliferaciju i angiogenezu (44). CD44 je transmembranski glikoprotein koji je uključen u procese adhezije, invazije i migracije stanica (45). Za razliku od njih, CD24+ stanice izražavaju gene uključene u metabolizam ugljikohidrata i prekrajanje RNA. Udaljene metastaze su uglavnom sastavljene od CD24+ stanica epitelnog fenotipa (44). Za korištenu terapiju je bitno djelovanje na obje vrste stanica, epitelne i mezenhimalne matične stanice, koje imaju različite karakteristike i aktivnosti signalnih putova, kako bi liječenje bilo uspješno (45). Kao još jedan tumorski marker, koristi se sijalil Lewis X, to jest CD15s. On je ligand E-selektina i ukoliko dođe do njihovog vezanja, tumor se može širiti. Često je izražen u tumorskim stanicama i ima ulogu u invaziji i metastaziranju raka (46).

Uvjeti u kojima su uzgajane stanice su temperatura inkubatora od 37° C i 5% CO<sub>2</sub> u DMEM mediju (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) U mediju se nalazi i 10% fetalni goveđi serum, FBS (fetal bovine serum) (EuroClone, Milano, Italija) i 1% antibiotik (EuroClone, Milano, Italija).

### **3.2. NOVOSINTETIZIRANI INHIBITOR**

Nakon probira računalnim modeliranjem metodom vHTS, sintetiziran je inhibitor iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina (Slika 4). Dokazano je da ima antiproliferacijski učinak na MDA-MB-231 staničnu liniju i da djeluje inhibitory na fosfolipazu C. Fosfolipaza C je membranski vezani protein, koji je uključen u mnoge stanične regulacijske procese rasta, što je izazvalo interes za razvijanjem protutumorskog lijeka, koji će djelovati na nju. Predstavlja je nekoliko izoformi enzima, a u tumoru dojke mogu se istaknuti PLC- $\delta$ 1 i PLC- $\delta$ 3. (47)

Inhibitor pokazuje hidrofobne karakteristike i stoga je prvo otopljen u dimetil sulfoksidu DMSO-u. Razrijeđen je s PBS-om da bi se postigla koncentracija od 2 $\mu$ M.



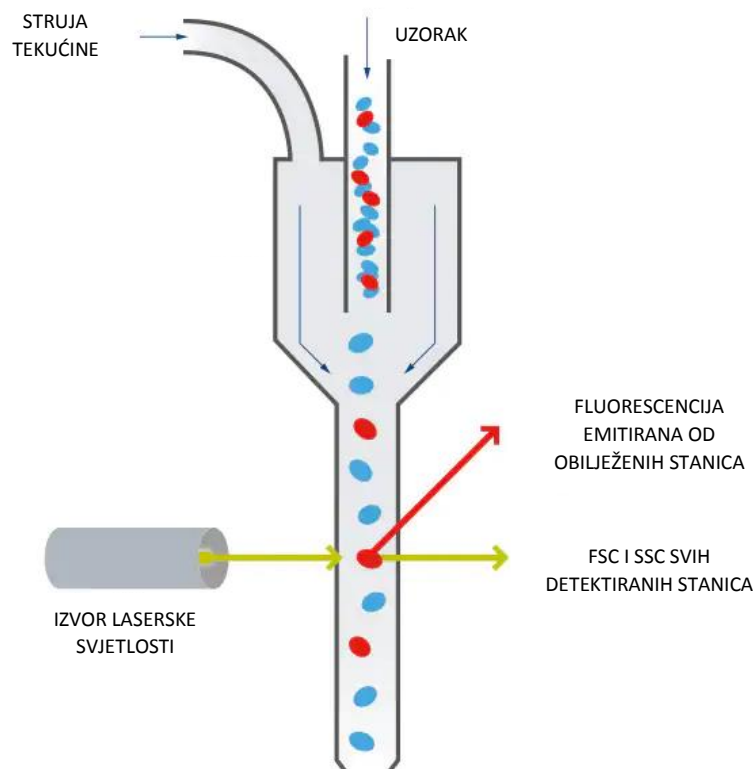
**Slika 4.** Molekulska građa inhibitora fosfolipaze C, 3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno) [2,3-*b*] kinolin-2-karboksamida.

### 3.3. PROTOČNA CITOMETRIJA

Protočna citometrija je metoda korištena za određivanje različitih tipova stanica i njihovih karakteristika u heterogenoj staničnoj populaciji analiziranjem izraženih površinskih i unutarstaničnih molekula (Slika 5). Ovom metodom se također procjenjuje čistoća izoliranih populacija, veličina i volumen stanice te na taj način osigurava više parametarsku analizu pojedinačnih stanica.

Uglavnom se provodi fluorescentno obilježavanje protutijela koja detektiraju molekule i zatim se protočnim citometrom mjeri intezitet fluorescencije.

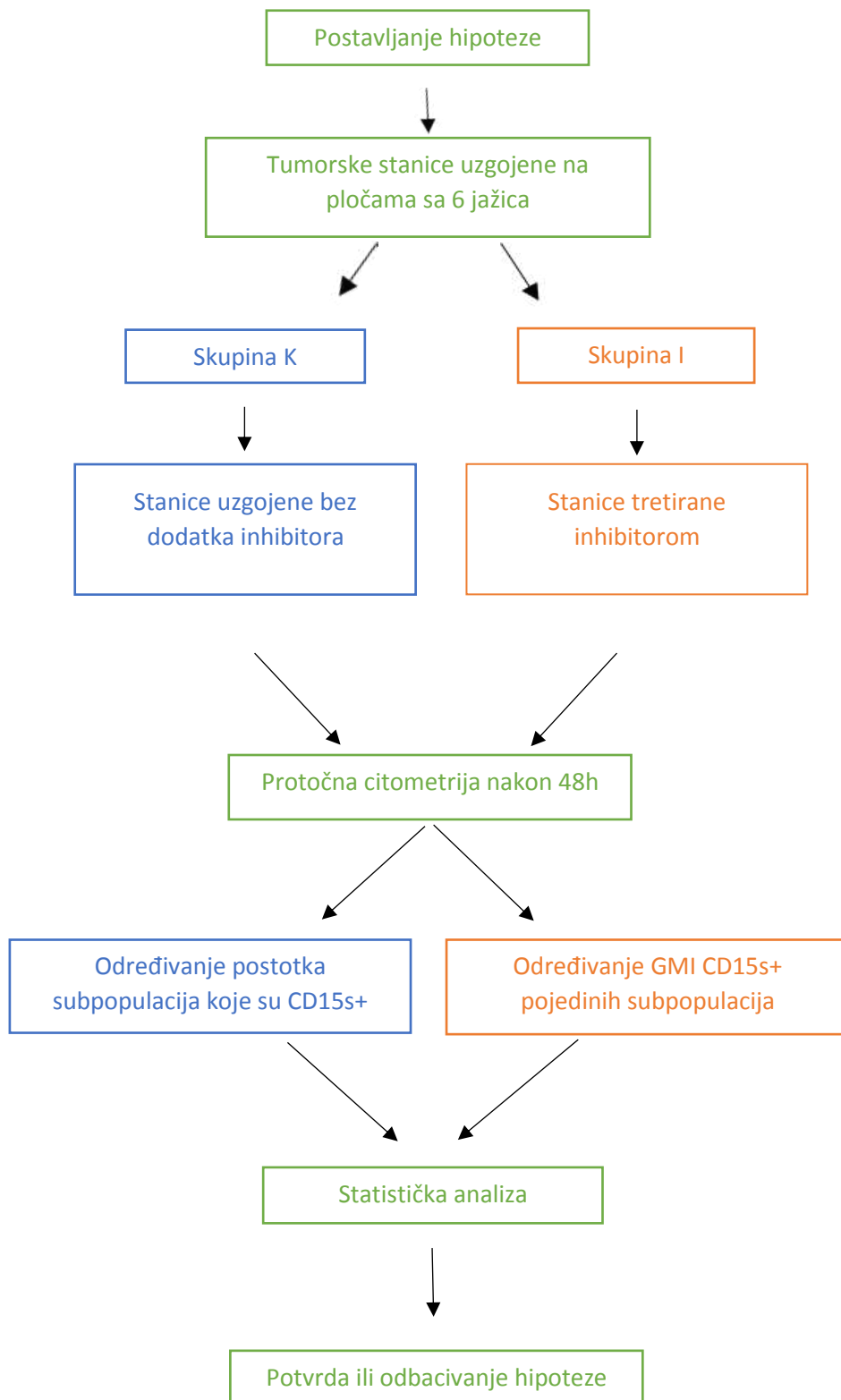
Prvi korak u postupku obilježavanja je izoliranje jednostanične suspenzije od stanične kulture ili uzoraka tkiva. Potom se stanice inkubiraju s neoznačenim ili fluorokrom-označenim protutijelima. Nakon toga može se započeti postupak protočne citometrije (48).



**Slika 5.** Protočni citometar (48)

Stanice se uvode u struju tekućine i prolaze kroz malu mlaznicu, što omogućava pojedinačno protjecanje stanica dok ih laserska zraka obasjava. Kada dođe do obasjavanja, svjetlost se rasprši i emitira se fluorescencija. Fluorescentne signale hvataju FL-detektori, kojih ima najmanje 4 u protočnom citometru. Oni hvataju 4 različite boje koje su vezane na 4 različita protutijela. Veličina stanice se može odrediti pomoću FSC-detektora (eng. *forward scatter*), dok se unutarnja struktura stanice može odrediti pomoću SSC-detektora (eng. *side scatter*). Oba detektora hvataju raspršene zrake svjetlosti (48).

### 3.4. USTROJ ISTRAŽIVANJA

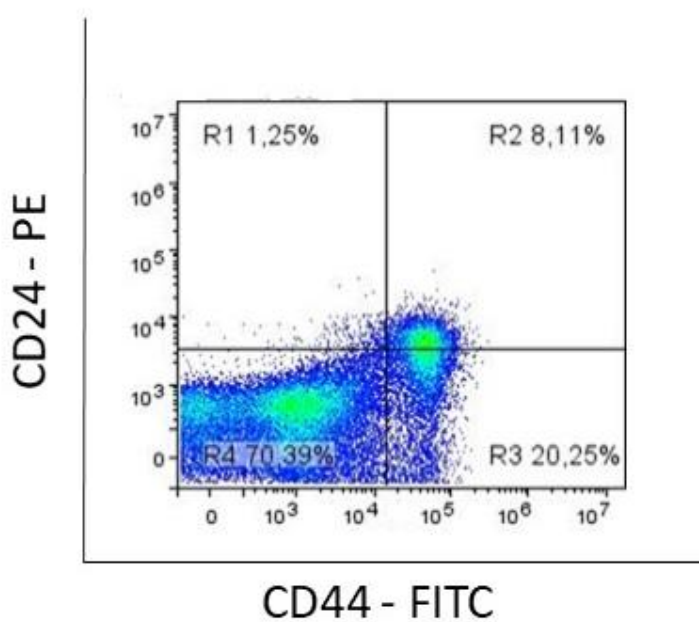


### **3.5. TRETIRANJE STANICA INHIBITOROM I IMUNOBOJANJE**

Na ploče sa šest jažica svolumenom 2 ml, nasaden je približno jednak broj stanica. Pod mikroskopom je provjerena adheriranost stanica na površinu jažica nakon najmanje 12h. Zatim je dodan inhibitor fosfolipaze C, koncentracije 2  $\mu$ M. U kontrolnim skupinama samo je zamijenjen medij. Kako bi došlo do odvajanja stanica od površine jažica, uklonjen je medij sa stanica nakon 48h i provedena je tripsinizacija. Potom su uzorci tretirani s Fc receptorom. (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) koji se veže na različite molekule na stanici. U slučaju da su slobodne, te molekule bi na sebe nespecifično vezale protutijela za biljege koji se istražuju. Primijenjena su 3 protutijela za 3 istraživana biljega. Od 3 korištena protutijela, 2 su obilježena kromogenima, za razliku od trećeg za koje je bilo primijenjeno sekundarno protutijelo konjugirano s kromogenom eFluor 660 (eBioscience, Inc., San Diego, CA, SAD). To protutijelo je bilo ciljano za biljeg CD15s (BD Biosciences). Korišteni kromogeni su kromogen FITC (fluorescein izotiocijanat) (BD Biosciences) za protutijelo na CD44 i kromogen PE (eBioscience) za protutijelo na CD24. Protočni citometar se koristio za mjerenje fluorescencije obojenih uzoraka. Svi pokusi su provedeni u tri primjerka.

### **3.6. ANALIZA IZMJERENIH FLUORESCENCIJA S CILJEM DETEKCIJE POJEDINIH SUBPOPULACIJA S BILJEGOM CD15s**

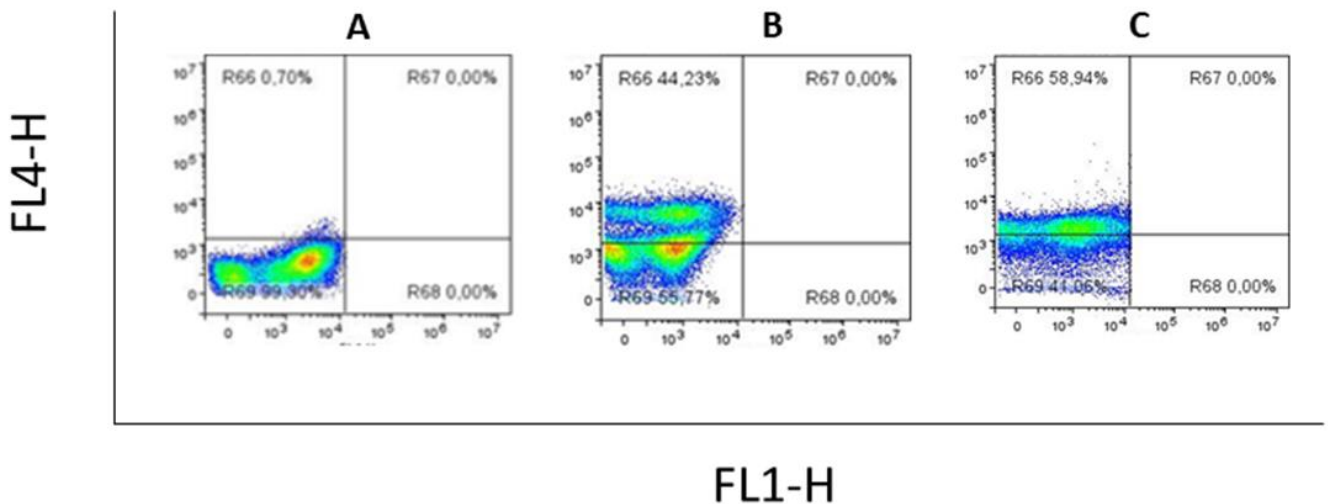
Podaci dobiveni protočnom citometrijom nadalje su analizirani FlowLogic programom (Inivai, Mentone, Victoria, Australija). Pojedine subpopulacije stanica raka birane su iz točkastog dijagrama (od engl. dot-plot, gdje svaka točka predstavlja jednu stanicu) CD24 naspram CD44, odnosno FL2-H naspram FL1-H. Naime, FITC kromogen vezan za protutijelo na CD44 detektiran je u FL1 kanalu a PE kromogen od anti-CD24 u FL2 kanalu protočnog citometra (Slika 5) na osnovu mjerenja neobojenih stanica te stanica bojenih bilo anti-CD44 ili anti-CD24 protutijelom (Slika 6).



**Slika 6.** Biranje granica za stanice raka, na osnovu imunobojenih stanica protutijelom na CD44 i protutijelom na CD24.

U R1 kvadrantu nalaze se CD44-CD24<sup>+</sup>, u R2 su CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> dok se u R4 nalaze CD44-CD24<sup>-</sup> stanice.

Potom su pojedini kvadranti uzimani kao samostalni s koordinatama FL-4 naspram FL-1. Naime, u FL-4 kanalu mjerena je fluorescencija kromogena konjugiranog za sekundarno protutijelo na CD15s. Time je omogućeno određivanje postotka za CD15s unutar različitih subpopulacije, kao i izražaja CD15s po jednoj stanici različitih subpopulacija (Slika 7).



**Slika 7.** Biranje granica za stanice pozitivne na CD15s, unutar kvadranta R4 s prethodne slike (CD44-CD24-), na osnovu citograma neobojenih (A) te imunobojenih protutijelom na CD15s (B). Podsluka (C) prikazuje kontrolne CD15s+CD44-CD24- stanice.

Osim postotka CD15s+ stanica određivan je i prosječni izražaj CD15s po jednoj stanici pomoću parametra geometrijske srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije, GMI (od engl. geometric mean fluorescence intensity) kromogena eFluor660, konjugiranog za sekundarno protutijelo kojim je u pokusu detektirano primarno protutijelo na CD15s.

### 3.7. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA

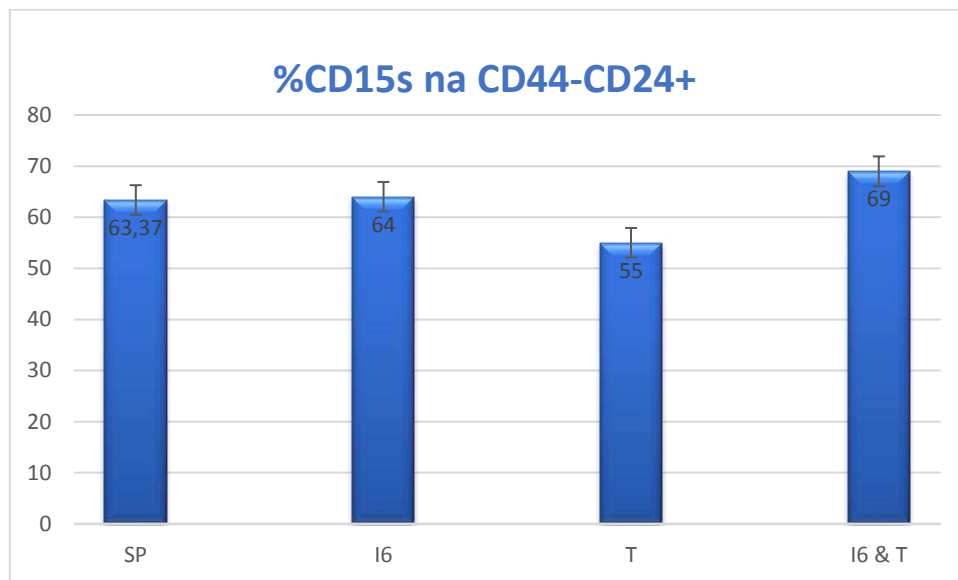
Podaci dobiveni FlowLogic programom obrađeni su ANOVA testom te post-hoc Tukey testom u Past 3. X software (version 3.14, University of Oslo, Norway). Statistička značajnost postavljena je na  $p=0,05$ .

## **4. REZULTATI**



#### 4.1. DJELOVANJE INHIBITORA, PAKLITAKSELA TE INHIBITORA I PAKLITAKSELA NA IZRAŽAJ CD15s+ SUBPOPULACIJE EPITELNIH STANICA MDA-MB-231

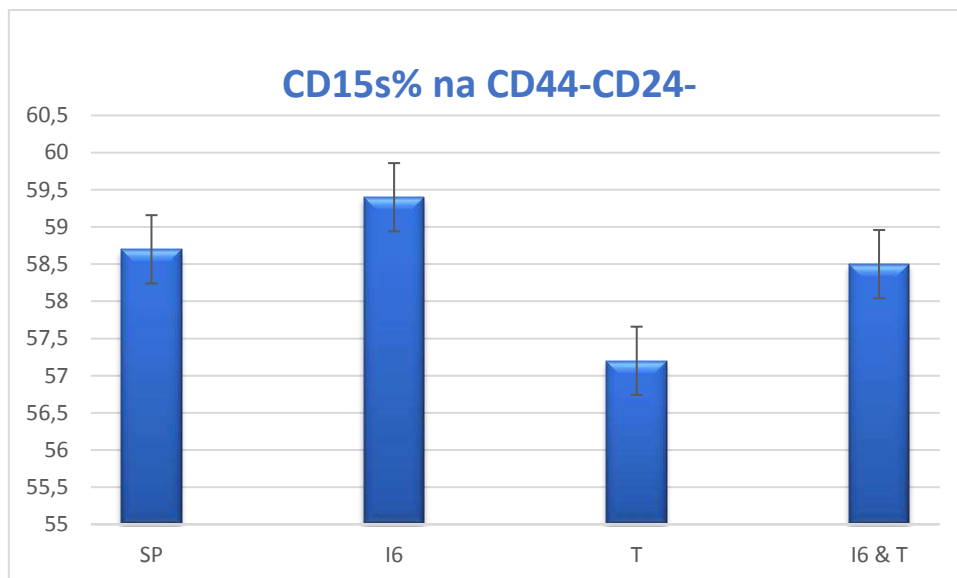
Paklitaksel je snizio izražaj CD15s na epitelnim stanicama MBA-MB-231 no bez statističke razlike (Slika 8).



**Slika 8.** Postotak CD44-CD24+ stanica koje su pozitivne na biljeg CD15s. Statistički dijagrami kontrolne (SP), ispitne skupine tretirane inhibitorom (I6), paklitakselom (T) te kombinacijom inhibitora i paklitaksela (I6&T)

#### 4.2. DJELOVANJE INHIBITORA NA IZRAŽAJ CD15s LUMINALNE STANICE MDA-MB-231

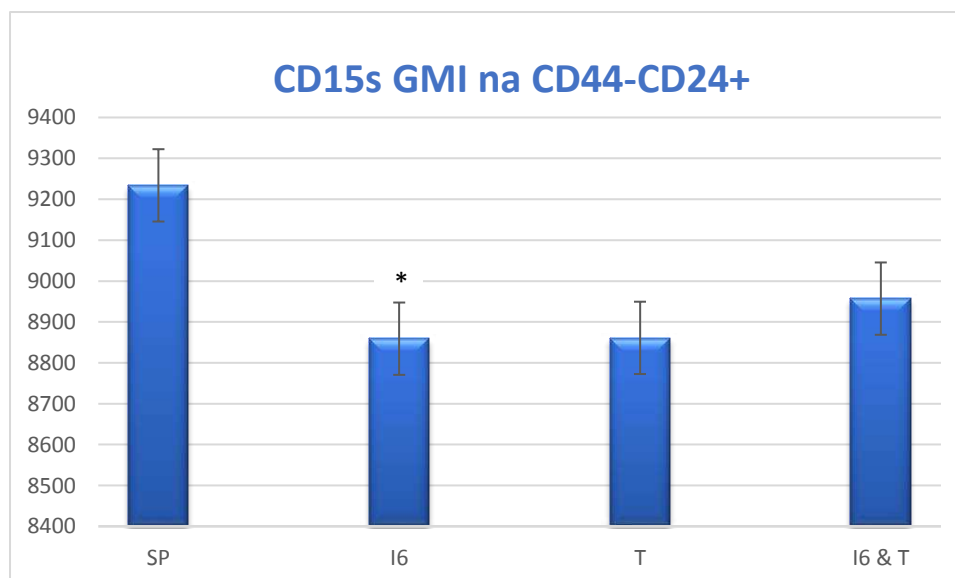
Inhibitor je povećao, a paklitaksel je snizio izražaj CD15s na luminalnim stanicama MDA-MB-231, no bez statističke značajnosti (Slika 9).



**Slika 9.** Postotak CD44-CD24- stanica koje su pozitivne na biljeg CD15s. Statistički dijagrami kontrolne (SP), ispitne skupine tretirane inhibitorom (I6), paklitakselom (T) te kombinacijom inhibitora i paklitaksela (I6&T).

#### 4.3. DJELOVANJE INHIBITORA NA PROSJEČNI IZRAŽAJ CD15s PO POJEDINOJ CD44-CD24+ STANICI MDA-MB-231

Inhibitor i paklitaksel su smanjili prosječni izražaj biljega CD15s po stanici uz statističku značajnost,  $p = 0.011$  (Slika 10).

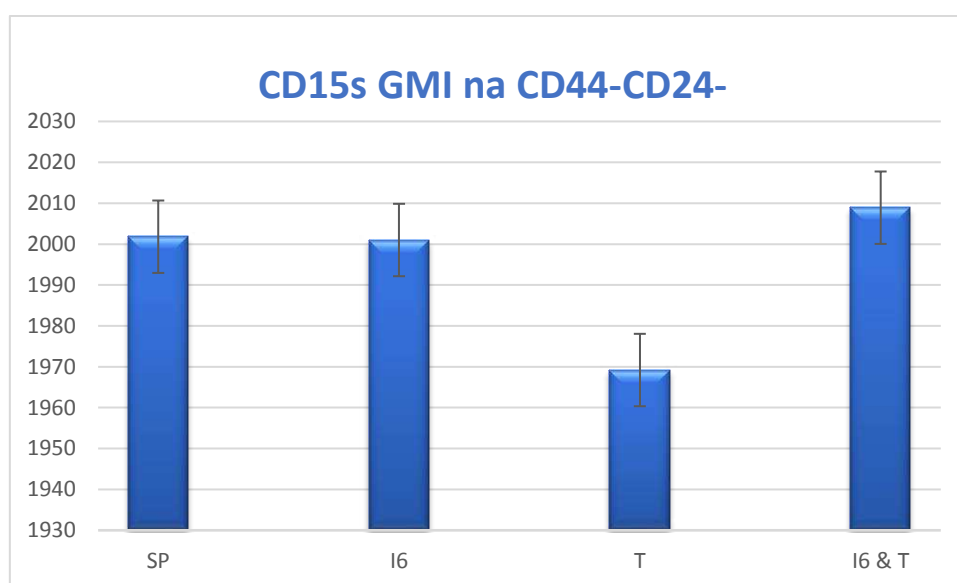


**Slika 10.** Prosječni izražaja CD15s na CD44-CD24- stanici.  
\* $p < 0,05$

Statistički dijagrami kontrolne (SP), ispitne skupine tretirane inhibitorom (I6), te skupina tretiranih samo paklitakselom (T) te kombinacijom inhibitora i paklitaksela (I6+T). GMI = prosječni izražaj CD15s

#### 4.4. DJELOVANJE INHIBITORA NA PROSJEČNI IZRAŽAJ CD15s PO POJEDINOJ CD44-CD24- STANICI MDA-MB-231

Paklitaksel je smanjio prosječni izražaj biljega CD15s po stanici no bez statističke značajnosti (Slika 11).



**Slika 11.** Prosječnog izražaj CD15s na CD44-CD24- stanici.

Statistički dijagrami kontrolne (SP), ispitne skupine tretirane inhibitorom (I6), paklitakselom (T) te kombinacijom inhibitora i paklitaksela (I6&T). GMI = prosječni izražaj CD15s

## **5. RASPRAVA**

Incidencija raka je u porastu i svaka četvrta osoba je u riziku za razvoj bolesti. Što se ranije dijagnosticira, veća je mogućnost izlječenja. Neki od terapijskih pristupa su kirurško uklanjanje, kemoterapija ili neki drugi specifični lijekovi protiv raka, kao što je hormonska terapija, radioterapija, a može doći i do samostalnog smanjivanja stanice raka dovodeći do spontanog nestanka bolesti (49).

Najčešće dijagnosticirani rak kod žena je rak dojke, koji zauzima drugo mjesto među uzročnicima smrti u žena. Došlo je do napretka u probiru, dijagnosticiranju i liječenju bolesti, ali trostruko negativni karcinom dojke predstavlja velik izazov zbog loše prognoze i rezistencije na lijekove (50). Trostruko negativni karcinom je izrazito invazivan, liječi se uobičajenim kemoterapeutičima jer nema razvijen specifičan način liječenja. Česta je pojava rezistencije na lijekove i relaps, zbog čega se razvijaju novi terapijski pristupi (51).

Fosfolipaza C je uključena u staničnu proliferaciju i pokretljivost stanice, što omogućava tumoru prodiranje u okolna tkiva i širenje na ostatak organizma. Fosfolipaza C djeluje tako da potiče hidrolitičku reakciju polifosfoinozitida kao što je PIP2 (od engl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) čime nastaju sekundarni glasnici IP3 (od engl. *inositol trisphosphate*) i DAG (od engl. *diacylglycerol*). IP3 se veže za sarkoplazmatski i endoplazmatski retikulum na kalcijeve kanale uzrokujući oslobađanje kalcijevih iona u citosol. Kalcij i DAG skupa dovode do aktivacije protein kinaze C koja sudjeluje u pokretljivosti, dijeljenju, rastu i smrti stanica (52). Kao takva, fosfolipaza C čini izvrsnu metu za razvoj antitumorskih agensa. Derivati tieno[2,3-b]piridina djeluju kao inhibitori fosfolipaze C i staničnog rasta tumora (53).

Predmet ovog diplomskog rada je istraživanje utjecaja inhibitora fosfolipaze C iz skupine tienopiridina na izražaj biljega CD15s. Sijalil Lewis x ili CD15s je ugljikohidrat koji može pokazivati povećanu ekspresiju na stanicama tumora, pogotovo ukoliko je riječ o višem stupnju tumora s lošijom prognozom. Sudjeluje u širenju tumora u organizmu vežući se za E-selektin, koji predstavlja receptor prisutan na stanicama endotela. Nakon vezanja, dolazi do kotrljanja duž vaskularnog endotela, što može pospješiti stvaranje metastaza (54).

Uz ispitivanje utjecaja inhibitora fosfolipaze C, također smo koristili paklitaksel i kombinaciju inhibitora i paklitaksela. Paklitaksel se koristi kao kemoterapijski lijek, koji stabilizira mikrotubule uzrokujući zaustavljanje mitoze. Uloga mikrotubula je formiranje diobenog vretena, do kojeg ne dolazi u slučaju njihove stabilizacije, što uzrokuje zaustavljanje u G2/M fazi staničnog ciklusa i posljedično do stanične smrti. Razvio se iz taksola, kojeg su

znanstvenici izolirali iz biljke *Taxus Brevifolia*, to jest pacifičke tise, koja je pokazivala citotoksični učinak (55).

Procjenu utjecaja novosintetiziranog inhibitora fosfolipaze C na metastatski potencijal MDA-MB-231 stanične linije raka dojke, određivan je postotkom stanica koje eksprimiraju glikokonjugat CD15s te također prosječni izražaj CD15s po jednoj stanici nakon tretiranja s inhibitorom. Tretman inhibitorom fosfolipaze C značajno je smanjio postotak subpopulacije epitelnih CD44-CD24+ stanica na izražaj CD15s po jednoj matičnoj stanici raka te je smanjio postotak CD44-CD24+ stanica pozitivnih na biljeg CD15s no bez statističke značajnosti.

Rezultat koji smo dobili ukazuje da PLC inhibicija uzrokuje smanjenje metastatskog potencijala karcinoma dojke. Slično, povoljan učinak liječenja paklitakselom je vidljiv smanjenjem postotka i izražaja CD15s po jednoj stanici za subpopulacije CD44-CD24- i CD44-CD24+. Taj učinak je bio i jači u usporedbi s liječenjem inhibitorom.

Nova studija iz 2021. godine provedena od strane Lattanzia i suradnika ukazala je na to da CD44-CD24- stanice trostruko negativnog karcinoma dojke spontano prelaze u CD44-CD24+ svojstvima sličnim CD44-CD24+ subpopulaciji iz primarnih ljudskih stanica raka dojke u smislu samoobnove, diferencijacije, tumorogeneze i mogućnosti stvaranja metastaza na plućima *in vitro* i kod miševa (56).

Na temelju navedenog, inhibitor primijenjen u našoj studiji ima potencijala za daljnja istraživanja.

Limitacija našeg istraživanja je što nisu uočene statistički značajne razlike između korištenja inhibitora i ostalih istraživanih skupina, to jest kontrolne skupine, skupine tretirane paklitakselom i skupine tretirane kombinacijom inhibitora i paklitaksela. Također, istraživanje bi trebalo provesti na više staničnih linija jer se vidi da ima potencijala za buduća istraživanja.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Tretman MDA-MB-231 stanične linije 2  $\mu$ M koncentracijom inhibitora fosfolipaze C iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina statistički značajno smanjuje postotak epitelnih CD44-CD24+ stanica na izražaj CD15s po jednoj matičnoj stanici raka dojke.

2. Tretman MDA-MB-231 stanične linije 2  $\mu$ M koncentracijom inhibitora fosfolipaze C iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina ne mijenja značajno postotak CD44-CD24+ subpopulacije matičnih stanica pozitivnih na biljeg CD15s.



## **7. LITERATURA**

1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Marin N. Patologija. 5. izdanje. Zagreb, Medicinska naklada; 2018. 149-77 str.
2. Cooper GM, Hausman, RE. Stanica molekularni pristup, 5 izdanje, Zagreb, Medicinska naklada; 2010. 726-760 str.
3. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458:719-724.
4. Basu AK. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19:970.
5. Lyman GH. Risk factors for cancer. *Prim Care*. 1992;19:465-479.
6. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*. 2000;21:167-223.
7. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2017;58:235-263.
8. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2017. [Internet] Bilten 42, Zagreb, 2020. [citirano 5. listopada 2021.] Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/01/Bilten-2017-final.pdf>
9. Schelhaas M. Viruses and cancer: molecular relations and perspectives. *Biol Chem*. 2017;398:815-816.
10. Tiffon C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19:3425.
11. Torry DS, Cooper GM. Proto-oncogenes in development and cancer. *Am J Reprod Immunol*. 1991;25:129-132.
12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-674.
13. Stowers SJ, Maronpot RR, Reynolds SH, Anderson MW. The role of oncogenes in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect*. 1987;75:81-86.
14. Lee NK. Tumor suppressor genes. *Head Neck*. 1992;14:407-414.
15. Berry JL, Polski A, Cavenee WK, Dryja TP, Murphree AL, Gallie BL. The RB1 Story: Characterization and Cloning of the First Tumor Suppressor Gene. *Genes (Basel)*. 2019;10:879.

16. Duffy MJ, Synnott NC, Crown J. Mutant p53 as a target for cancer treatment. *Eur J Cancer*. 2017;83:258-265.
17. Liu Y, Hu X, Han C, et al. Targeting tumor suppressor genes for cancer therapy. *Bioessays*. 2015;37:1277-1286.
18. Cree IA. Cancer biology. *Methods Mol Biol*. 2011;731:1-11.
19. Peiris-Pagès M, Martinez-Outschoorn UE, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Res*. 2016;18:55.
20. Najafi M, Mortezaee K, Majidpoor J. Cancer stem cell (CSC) resistance drivers. *Life Sci*. 2019;234:116781.
21. Wang T, Shigdar S, Gantier MP, et al. Cancer stem cell targeted therapy: progress amid controversies. *Oncotarget*. 2015;6:44191-44206.
22. Huang T, Song X, Xu D, Tiek D, Goenka A, Wu B i sur. Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance. *Theranostics*. 2020;10:8721-8743.
23. Schulenburg A, Blatt K, Cerny-Reiterer S, Sadovnik I, Herrmann H, Marian B i sur. Cancer stem cells in basic science and in translational oncology: can we translate into clinical application?. *J Hematol Oncol*. 2015;8:16.
24. WHO. Breast cancer. [Internet].2021.,[citirano 10. listopada 2021.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
25. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys*. 2015;72:333-338.
26. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they?. *Mol Oncol*. 2010;4:192-208.
27. Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol*. 2016;59:651-672.
28. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Rak dojke. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. Str. 203-13.

29. Koo MM, von Wagner C, Abel GA, McPhail S, Rubin GP, Lyratzopoulos G. Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis. *Cancer Epidemiol.* 2017;48:140-146.
30. Funke M. Bildgebende Diagnostik des Mammakarzinoms : Ein Update [Diagnostic imaging of breast cancer : An update]. *Radiologe.* 2016;56:921-938.
31. 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;19:403-410.
32. Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch.* 2018;472:697-703.
33. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol.* 2020;27:27-35.
34. Loibl S, Gianni L. HER2-positive breast cancer. *Lancet.* 2017;389(10087):2415-2429.
35. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res.* 2020;22:61.
36. O'Connor CJ, Chen T, González I, Cao D, Peng Y. Cancer stem cells in triple-negative breast cancer: a potential target and prognostic marker. *Biomark Med.* 2018;12:813-820.
37. Andrade CG, Cabral Filho PE, Tenório DP, Santos BS, Beltrão EI, Fontes A i sur. Evaluation of glyco-phenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:4623-4629.
38. Potapenko IO, Haakensen VD, Lüders T, Helland A, Bukholm I, Sørli T i sur. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Mol Oncol.* 2010;4:98-118.
39. Scott DA, Drake RR. Glycosylation and its implications in breast cancer. *Expert Rev Proteomics.* 2019;16:665-680.
40. Litvinov VP, Dotsenko VV, Krivokolysko SG. The Chemistry of Thienopyridines. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, 117–178. 2007.

41. Zafar A, Sari S, Leung E, Pilkington LI, van Rensburg M, Barker D i sur. GPCR Modulation of Thieno[2,3-b]pyridine Anti-Proliferative Agents. *Molecules*. 2017;22:2254.
42. Zafar A, Pilkington LI, Haverkate NA, van Rensburg M, Leung E, Kumara S i sur. Investigation into Improving the Aqueous Solubility of the Thieno[2,3-b]pyridine Anti-Proliferative Agents. *Molecules*. 2018;23:145.
43. Li W, Ma H, Zhang J, Zhu L, Wang C, Yang Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis [published correction appears in *Sci Rep*. 2018 Mar 6;8:4276]. *Sci Rep*. 2017;7:13856.
44. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16:876-887.
45. Sulaiman A, McGarry S, Han X, Liu S, Wang L. CSCs in Breast Cancer-One Size Does Not Fit All: Therapeutic Advances in Targeting Heterogeneous Epithelial and Mesenchymal CSCs. *Cancers (Basel)*. 2019;11:1128.
46. Fujita T, Murayama K, Hanamura T, Okada T, Ito T, Harada M i sur. CSLEX (Sialyl Lewis X) is a useful tumor marker for monitoring of breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*. 2011;41:394-399.
47. Reynisson J, Jaiswal JK, Barker D, D'mello SA, Denny WA, Baguley BC i sur. Evidence that phospholipase C is involved in the antitumour action of NSC768313, a new thieno[2,3-b]pyridine derivative. *Cancer Cell Int*. 2016;16:18.
48. Abcam. Flow cytometry introduction. [Internet]; 2019 [Citirano 15. listopada 2021.]. Dostupno na: <https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>
49. Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*. 2016;53:441-442.
50. Fahad Ullah M. Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1152:51-64.
51. Medina MA, Oza G, Sharma A, Arriaga LG, Hernández Hernández JM, Rotello VM i sur. Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17:2078.

52. Owusu Obeng E, Rusciano I, Marvi MV, Fazio A, Ratti S, Follo MY i sur. Phosphoinositide-Dependent Signaling in Cancer: A Focus on Phospholipase C Isozymes. *Int J Mol Sci.* 2020;21:2581.
53. Feng L, Reynisdóttir I, Reynisson J. The effect of PLC- $\gamma$ 2 inhibitors on the growth of human tumour cells. *Eur J Med Chem.* 2012;54:463-469.
54. Cohen EN, Fouad TM, Lee BN, Arun BK, Liu D, Tin S i sur. Elevated serum levels of sialyl Lewis X (sLeX) and inflammatory mediators in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2019;176:545-556.
55. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2014;25:2677-2681.
56. Qiao X, Zhang Y, Sun L, Ma Q, Yang J, Ai L i sur. Association of human breast cancer CD44-/CD24- cells with delayed distant metastasis. *Elife.* 2021;10:e65418.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:**

Cilj istraživanja je dokazati djelovanje inhibitora fosfolipaze C, samog ili u kombinaciji s paklitakselom, na snižavanje postotka epitelnih CD44-CD24+ i luminalno epitelnih CD44-CD24- stanica pozitivnih na CD15s te na snižavanje prosječnog izražaja glikokonjugata CD15s po jednoj CD44-CD24+ i CD44-CD24- stanici.

**Materijali i metode:**

Na MDA-MB-231 staničnoj liniji trostruko negativnog karcinoma dojke, primijenjen je novosintetizirani inhibitor fosfolipaze C iz skupine tieno[2,3-b]piridina. Stanice su tretirane inhibitorom fosfolipaze C koncentracije 2  $\mu$ M i/ili paklitakselom tijekom 48 sati, nakon čega je izmjerena fluorescencija uzoraka imunobojenih protutijelima na CD44, CD24 i CD15s pomoću protočnog citometra.

**Rezultati:**

Rezultati su prikazani statističkim dijagramima u kojima su prikazani postotci luminalnih i epitelnih stanica MDA-MB-231 stanične linije pozitivnih na CD15s te prosječni izražaj CD15s po pojedinoj stanici navedenih populacija stanica po skupinama ovisno o korištenju samog inhibitora, paklitaksela ili njihove kombinacije. Paklitaksel je snizio izražaj CD15s na epitelnim stanicama no bez statističke razlike. Inhibitor 6 je povećao, a paklitaksel je snizio izražaj CD15s na luminalnim stanicama, no bez statističke značajnosti. Inhibitor 6 i paklitaksel su smanjili prosječni izražaj biljega CD15s po epitelnoj stanici uz statističku značajnost,  $p = 0.011$ . Paklitaksel je smanjio prosječni izražaj biljega CD15s po luminalnoj stanici no bez statističke značajnosti.

**Zaključci:**

Tretman MDA-MB-231 stanične linije 2  $\mu$ M koncentracijom inhibitora fosfolipaze C iz skupine tieno[2,3-b]piridina statistički značajno smanjuje postotak epitelnih CD44-CD24+ stanica na izražaj CD15s po jednoj matičnoj stanici raka dojke, no ne mijenja značajno postotak CD44-CD24+ subpopulacije matičnih stanica pozitivnih na biljeg CD15s.



## **9. SUMMARY**

**The aim of research:**

The aim of the research was to demonstrate the effect of phospholipase C inhibitor, alone or in combination with paclitaxel, on reducing the percentage of epithelial CD44-CD24<sup>+</sup> and luminal epithelial CD44-CD24<sup>-</sup> cells positive for CD15s and on lowering the average expression of CD15s glycoconjugate per CD44-CD24<sup>+</sup> and CD44-CD24<sup>+</sup> cell.

**Materials and methods:**

A newly synthesized phospholipase C inhibitor from the thieno [2,3-b] pyridine group was used on MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell line. Cells were treated with a 2  $\mu$ M phospholipase C inhibitor and / or paclitaxel for 48 hours, after which the fluorescence of antibody-stained samples on CD44, CD24 and CD15s was measured using a flow cytometer.

**The results:**

The results are presented in statistical diagrams showing the percentages of luminal and epithelial cells of the MDA-MB-231 cell line positive for CD15s and the average expression of CD15s per cell of these population cells by groups depending on the use of the inhibitor, paclitaxel or a combination thereof. Paclitaxel decreased CD15s expression on epithelial cells without statistical differences. Inhibitor 6 increased, and paclitaxel decreased CD15s expression in luminal cells, with no statistical significance. Inhibitor 6 and paclitaxel decreased the mean expression of the CD15s marker per epithelial cell with statistical significance,  $p = 0.011$ . Paclitaxel decreased the mean expression of the CD15s marker per luminal cell without statistical significance.

**Conclusions:**

Treatment of MDA-MB-231 cell line with 2  $\mu$ M concentration of thieno [2,3-b] pyridine phospholipase C inhibitor statistically significantly reduced the percentage of epithelial CD44-CD24<sup>+</sup> cells per CD15s expression per breast cancer stem cell, but did not significantly change the percentage of CD44<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup> subpopulations of CD15s marker-positive stem cells.

## **10.ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODACI:**

**Ime i prezime:** Loredana Delić

**Datum rođenja:** 17.05.1997.

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Adresa:** Put Skalica 39, 21000 Split

**e-mail:** loredanadelic@gmail.com

## **OBRAZOVANJE:**

- **2004. – 2012.** Osnovna škola „Spinut”, Split, Republika Hrvatska
- **2012. – 2016.** „Prirodoslovno-matematička gimnazija“ Split, Republika Hrvatska
- **2015. - 2020.** Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: farmacija
- **2020. - 2021.** Škola stranih jezika – Jantar (engleski jezik, diploma C1)

## **RADNO ISKUSTVO:**

2020.-2021. Rad u Galenskom laboratoriju Ljekarni SDŽ, ispomoć u proizvodnji

**III. 2021. – IX. 2021.** – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Brda, analitički i galenski laboratorij

**CPSA Split** (Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske)

## **POSEBNE VJEŠTINE:**

**Rad na računalu:** MS Office, Eskulap 2000

**Strani jezici:** engleski jezik

**Vozačka dozvola:** B kategorija