

# Utjecaj inhibitora fosfolipaze C na izražaj metastatskog biljega CD15s na matičnim stanicama raka dojke

---

**Đilas, Petra**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:171:175567>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-06-17**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



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

**PETRA ĐILAS**

**UTJECAJ INHIBITORA FOSFOLIPAZE C NA IZRAŽAJ  
METASTATSKOG BILJEGA CD15s NA MATIČNIM  
STANICAMA RAKA DOJKE**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina: 2020./2021.**

**Mentor: prof. dr. sc. Anita Markotić**

**Split, studeni 2020.**

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

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

<b>Znanstveno područje:</b>	Biomedicinske znanosti
<b>Znanstveno područje:</b>	Farmacija
<b>Nastavni predmet:</b>	Medicinska biokemija
<b>Tema rada:</b>	prihvaćena je na 64. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i na 26. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
<b>Mentor:</b>	prof. dr. sc. Anita Markotić
<b>Pomoć pri izradi:</b>	prof. dr. sc. Anita Markotić

**Utjecaj inhibitora fosfolipaze C na izražaj metastatskog biljega CD15s na matičnim stanicama raka dojke**

Petra Đilas, broj indeksa 163

**Naslov rada:** Utjecaj inhibitora fosfolipaze C na izražaj metastatskog biljega CD15s na matičnim stanicama raka dojke

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi antitumorske učinke tretmana matičnih stanica karcinoma dojke novosintetiziranim inhibitorom fosfolipaze, spojem tieno [2,3-*b*] piridinom, preciznije, njegovo djelovanje na metastatski biljeg CD15s na MDA-MB-231 staničnoj liniji raka dojke.

**Materijali i metode:** Trostruko negativna stanična linija raka dojke MDA-MB-231 tretirana je novosintetiziranim tieno-piridinskim spojem (3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno [2,3-*b*] kinolin-2-karboksamid) koncentracije 2  $\mu$ M, tijekom 48h, kako bi se utvrdio postotak subpopulacije matičnih stanica raka pozitivnih na biljeg CD15s i na prosječni izražaj CD15s biljega po jednoj matičnoj stanici raka nakon tretmana. Nakon imunobojenja, pozitivne stanice detektirane su metodom protočne citometrije.

**Rezultati:** Tretman novosintetiziranim inhibitorom PLC značajno je smanjio postotak subpopulacije matičnih stanica pozitivnih na biljeg CD15s, ali nije imao utjecaja na prosječni izražaj CD15s biljega po jednoj matičnoj stanici.

**Zaključci:** Zbog utvrđenog smanjenja postotka subpopulacije matičnih stanica trostruko negativnog raka dojke koje na svojoj površini eksprimiraju metastatski biljeg CD15s, novosintetizirani inhibitor fosfolipaze C iz skupine tieno [2,3-*b*] piridina potencijalni je lijek za trostruko negativni karcinom dojke.

**Ključne riječi:** rak dojke, trostruko negativni rak dojke, inhibitor fosfolipaze C, metastatski biljeg CD15s

**Rad sadrži:** 55 stranica, 10 slika, 1 tablicu i 42 reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva:** 1. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić  
2. prof. dr. sc. u trajnom zvanju Tatijana Zemunik  
3. prof. dr. sc. Anita Markotić

**Datum obrane:** 20.11.2020.

**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. 64 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 28 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 26  
**Mentor:** Full prof. Anita Markotić, PhD  
**Technical assistnace:** Full prof. Anita Markotić, PhD

**The effect of phospholipase C inhibitor on expression of metastatic CD15s marker at breast cancer stem cells**

Petra Đilas, index number 163

**Diploma thesis title:** The effect of phospholipase C inhibitor on expression of metastatic CD15s marker at breast cancer stem cells

**The aim of this study:** The aim of this study was to determine the effects of treating of breast cancer stem cells with the newly synthesized thieno[2,3-*b*]pyridine anticancer agent, more precisely, focusing on its effect on metastatic marker, CD15 glyconjugate, expressed on the surface of cancer stem cells.

**Methods:** The MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell line was treated during 48h with a 2  $\mu$ M newly developed thienopyridine anticancer compound (3-amino-5-oxo-N-naphtyl-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-*b*]quinoline-2-carboxamide) to determine its effect on percentage of subpopulation of breast cancer stem cells that express CD15s and on the mean expression of CD15s on an individual breast cancer stem cells. Flow cytometric analysis was performed after immunostaining.

**Results:** PLC inhibitor has significantly decreased the percent of breast cancer stem cells positive on CD15s, but it was without effect upon mean expression of CD15s on an individual breast cancer stem cell.

**Conclusion:** Due to its decreasing effect upon the percentage of triple negative breast cancer stem cells that are positive for the metastatic CD15s glycoconjugate, the investigated PLC inhibitor can be a potential drug for triple-negative breast cancer treatment.

**Keywords:** breast-cancer, triple-negative breast cancer, phospholipase C inhibitor, CD15s glycoconjugate.

**Thesis contain:** 55 pages, 10 figures, 1 table, 42 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Associate prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD
2. Full prof. in permanent position Tatjana Zemunik, MD, PhD
3. Full prof. Anita Markotić, PhD

**Defence date:** 20.11.2020.

**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.

## **ZAHVALE**

*Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Aniti Markotić na pomoći, razumijevanju, strpljivosti te odličnom mentorstvu pri izradi ovog diplomskog rada te na vrlo ugodnom iskustvu koje mi je pružio rad na ovoj temi.*

*Velika hvala mojim roditeljima i sestri koji su mi pružili bezuvjetnu podršku i razumijevanje bez kojih ne bi bilo moguće moje studiranje.*

*Također se želim zahvaliti mojem malom krugu najbližih prijatelja i momku koji su uvijek bili uz mene te imali strpljenja i ljubavi.*

## POPIS KRATICA

- BCS: eng. breast-conserving surgery; operacija koja štedi tkivo dojke
- BCSC: eng. breast cancer stem cell; matična stanica raka dojke
- BRCA1/2: mutirani tumor supresorski gen
- CSC: eng. cancer stem cell; matična stanica raka
- EGF: eng. epidermal growth factor;
- ER: eng. estrogen receptor; receptor za estrogen
- FISH: eng. fluorescence *in situ* hybridization; fluorescentna *in situ* hibridizacija
- GMI: eng. geometric mean fluorescence intensity; geometrijska srednja vrijednost intenziteta fluorescencije- HER2: eng. human epidermal growth factor receptor; receptor za humani epidermalni faktor rasta
- IHC: eng. Immunohistochemistry; imunohistokemija
- MDA-MB-231: stanična linija trostruko negativnog raka dojke
- MRI: eng. magnetic resonance imaging; magnetska rezonancija
- PBS: eng. phosphate-buffered saline; izotonična otopina fosfatnog pufera s NaCl
- PLC: eng. phospholipase C; fosfolipaza C
- PLC C- $\gamma$ 2: eng. phospholipase C- $\gamma$ 1; fosfolipaza C- $\gamma$ 1
- PR: eng. progesterone receptor; receptor za progesteron
- RT: eng. radiation therapy; terapija zračenjem
- TNBC: eng. triple-negative breast cancer; trostruko negativni rak dojke
- WHO: eng. World Health Organization; Svjetska zdravstvena organizacija

# SADRŽAJ

## ZAHVALE

## POPIS KRATICA

1. UVOD .....	1
1.1 Rak dojke.....	2
1.1.1 Klasifikacija raka dojke .....	2
1.1.2 Epidemiologija raka dojke.....	4
1.1.3 Patofiziologija.....	6
1.2 Trostruko negativni rak dojke .....	7
1.2.1 Epidemiologija trostruko negativnog raka dojke.....	7
1.2.2 Etiologija trostruko negativnog raka dojke .....	9
1.2.3 Kliničke osobine trostruko negativnog raka dojke .....	10
1.2.4 Prognoza liječenja trostruko negativnog karcinoma dojke.....	10
1.2.5 Dijagnostika trostruko negativnog raka dojke.....	11
1.2.6 Terapijske opcije i napretci u terapiji trostruko negativnog raka dojke .....	12
1.3 Matične stanice raka.....	14
1.4 Fosfolipaza C kao ciljna molekula u terapiji tumora .....	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA .....	19
2. Cilj istraživanja i hipoteza.....	20
3. MATERIJALI I METODE .....	21
3.1. Stanična linija trostruko negativnog karcinoma dojke.....	22
3.2. Novosintetizirani inhibitor .....	23
3.3. Ustroj istraživanja .....	24
3.4. Tretiranje stanica inhibitorom i imunobojenje.....	25
3.5. Analiza izmjerenih fluorescencija s ciljem detekcije matičnih stanica s biljekom CD15s26	
3.6. Statistička analiza rezultata .....	27
4. REZULTATI.....	28
4.1. Djelovanje inhibitora na postotak CD15s+ subpopulacije matičnih stanica raka.....	29
4.2. Djelovanje inhibitora na izražaj CD15s+ subpopulacije po pojedinoj matičnoj stanici raka .....	30
5. RASPRAVA .....	31

6. ZAKLJUČCI.....	34
7. REFERENCE.....	36
8. SAŽETAK .....	42
9. SUMMARY .....	44
10. ŽIVOTOPIS.....	46



## **1. UVOD**

## 1.1 Rak dojke

Rak dojke je rak koji se razvija iz tkiva dojke [1]. Neki od znakova raka uključuju kvržicu na dojci, promjene oblika dojke te crvenilo na koži dojke. U onih s poodmaklom fazom bolesti, može se pojaviti bol u kostima, otekline limfnih čvorova, zaduha i žuto obojenje kože [2].

Rak dojke je najčešća maligna bolest kod žena te je vodeći uzrok smrti od raka kod žena, pa je stoga veliki zdravstveni problem u svijetu.

No u posljednje vrijeme stopa smrtnosti zaostaje u odnosu na porast broja bolesnika, što se u prvom redu tumači poboljšanjem rane dijagnostike, a zatim napretkom u liječenju. Mnogi ukazuju i na mogućnost povećanja broja benignih, odnosno manje malignih oblika raka dojke. U manje razvijenim zemljama Azije, zemljama Središnje Europe te Južne Amerike, u odnosu na prošlost, zabilježeno je povećanje broja oboljelih praćeno usporednim povećanjem smrtnosti. Taj paradoksalan podatak se tumači promjenama u načinu života žena koji ih približava načinu života u razvijenim zemljama.

Glavni razlozi umiranja pacijenata s rakom dojke i prostate su otpornost na terapiju, metastaziranje i povratak bolesti [3].

### 1.1.1 Klasifikacija raka dojke

Klasifikacija raka dojke, temeljena na prisutnosti određenog receptora na stanici koji odražava dostupnu terapiju, obuhvaća tumore pozitivne na estrogenski receptor (ER), progesteronski receptor (PR) te receptor humanog epidermalnog faktora rasta, HER2 (od engl. *Human epidermal growth factor 2*) te trostruko negativni rak dojke, TNBC (od engl. *Triple negative breast cancer*). Rak ovisan o hormonskim receptorima obuhvaća oko 80% svih slučajeva raka dojke. Kod tog tipa raka dojke rast stanice povećava se odgovorom na estrogen ili progesteron, stoga razlikujemo estrogen receptor pozitivni rak dojke, progesteron receptor pozitivni rak dojke te rak dojke pozitivan na prisutnost receptora oba hormona. Ovi tipovi raka dojke će vjerojatnije odgovarati na liječenje hormonskom terapijom. Kod HER2 pozitivnog raka dojke, zbog povećanog izražaja receptora za epidermalni faktor rasta, EGF, stanice su osjetljivije na pobudu EGF-a te je ovaj tip raka poznat kao brzo napredujući i agresivne prirode.

Nova klasifikacija raka dojke, temeljena na imunohistokemijskim markerima i komplementarnoj DNA mikročip (microarray) analizi obuhvaća 5 različitih podtipova koji se razlikuju s obzirom na ishod i terapijske mete koje eksprimiraju, kao i na vrstu epitelnih stanica (luminalne ili bazalne): (1) luminalni A podtip (ER pozitivan i/ili PR pozitivan te HER2 negativan), (2) luminalni B podtip (ER pozitivan i/ili PR pozitivan te HER2 pozitivan), (3) HER2 podtip (karakteriziran pretjeranom amplifikacijom gena za HER2), takozvani (4) podtip sličan bazalnom raku dojke (ER/PR/HER2 negativan; pozitivan za citokeratin 5/6) te (5) podtip sličan normalnoj dojci (s trostruko negativnim fenotipom, ali sa celularnom derivacijom tipičnom za normalan epitel dojke).

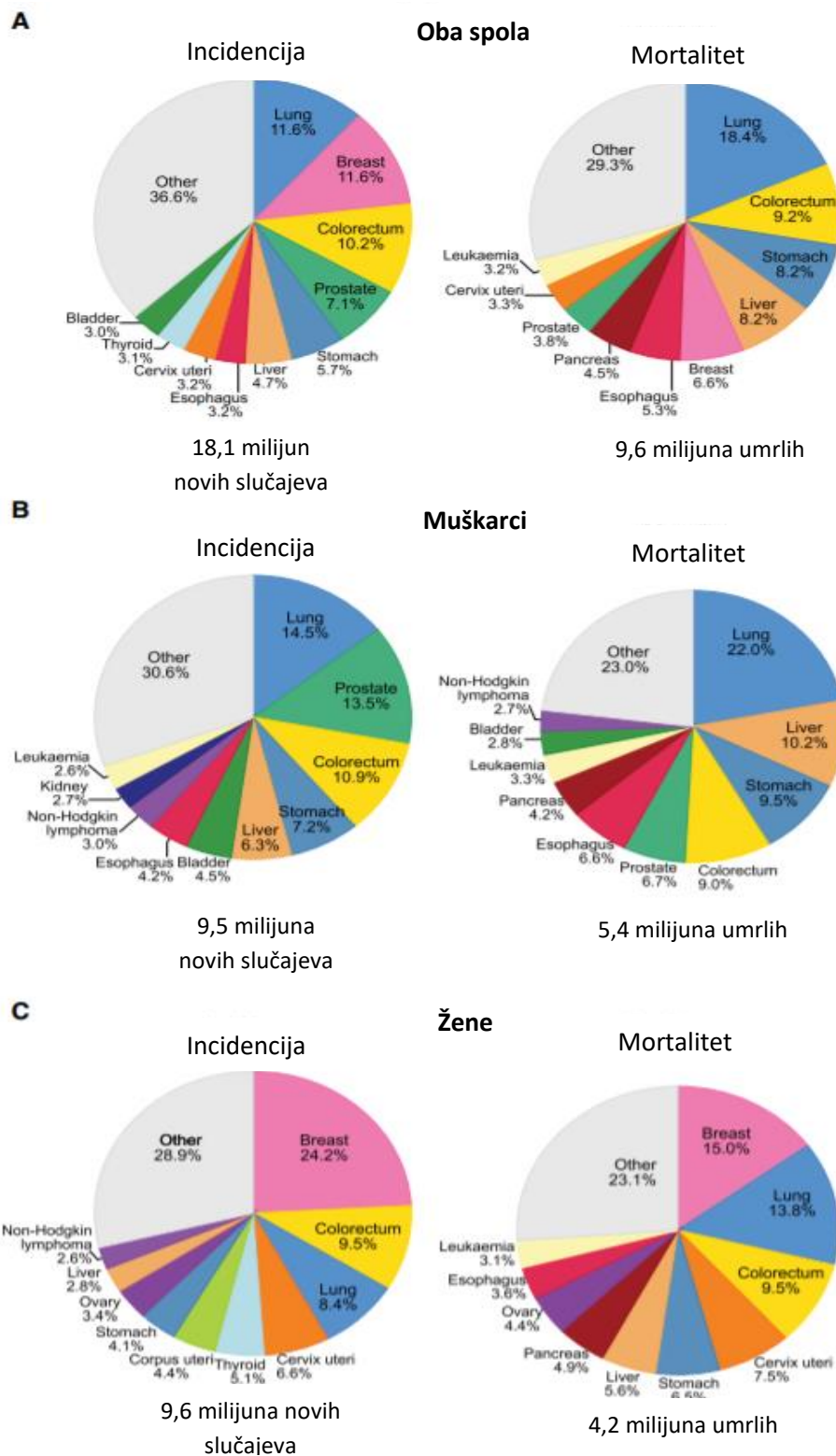
Otprilike 10-15% raka dojke su prepoznati kao trostruko negativni, od kojih otprilike 80% njih čini podtip sličan bazalnom raku dojke. Bitno je napomenuti da rak dojke sličan bazalnom i TNBC nisu istog entiteta. TNBC sadrži trostruko negativni fenotip: negativan je na estrogenske i progesteronske receptore (procijenjeno imunohistokemijskom metodom (IHC)), postoji nedostatak ekspresije HER2 (također procijenjeno IHC-om), te postoji odsutnost amplifikacije gena za HER2 (procijenjeno tehnikom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH)). S druge strane, tumori slični bazalnom imaju molekularni fenotip karakteriziran setom gena identificiranim od strane genskog profiliranja glasničke RNA (mRNA). Mnogi od gena identificiranih kod „tumora sličnih bazalnom obično su pronađeni među bazalnim ili mioepitelnim stanicama normalnog tkiva dojke i obuhvaćaju gene strukturnih elemenata bazalnih epitelnih stanica (primjerice citokeratin (CK) 5, CK 17, 5-kadherin i vimentin), kao i gene uključene u interakciju bazalnih stanica i izvanstaničnog matriksa (primjerice fascin i laminin) [4].

Navedeni podtipovi raka dojke ne samo da se razlikuju po prognostičkom ishodu već, po nedavnim dokazima, imaju i različite obrasce pojavnosti [5].

### 1.1.2 Epidemiologija raka dojke

Rak dojke je najčešća maligna bolest u žena, dok je u muškaraca rijetkost. Pojavljuje se u jednog muškarca na 100 slučajeva raka dojke u žena. Iznimka je prije puberteta, rijetkost prije 30-e godine, a zatim mu učestalost raste i doseže maksimum u dobi oko 50 godina u apsolutnim brojkama. S povećanjem ženine životne dobi rizik od razvoja raka raste [3].

Rak dojke je najčešće dijagnosticirani rak među ženama te vodeći uzrok smrti od raka. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2018. godine, rak dojke je najzastupljeniji rak među ženama u 154 zemlje diljem svijeta, brojeći oko 2 milijuna novodijagnosticiranih slučajeva raka dojke, dakle svaka četvrta žena s dijagnosticiranim rakom bolovala je od raka dojke. Također, ova bolest je vodeći uzrok smrti od raka u preko 100 zemalja diljem svijeta. Osim što je najčešće dijagnosticiran rak kod žena u svijetu (24,2% od sveukupno 8,6 milijuna zabilježenih novodijagnosticiranih slučajeva raka kod žena, kao što je prikazano na grafu C na priloženoj Slici 1), rak dojke je, zajedno s rakom pluća, najčešće dijagnosticirani rak općenito, kao što je prikazano na grafu A na priloženoj Slici 1. Incidencija raka dojke, za žene i muškarce, u 2018. godini je iznosila 11,6 % od sveukupnih 18 milijuna novodijagnosticiranih slučajeva raka, s time da je 99,1 % novodijagnosticiranih slučajeva raka dojke bilo kod ženskih pacijenata, kao što je prikazano na grafovima B i C na Slici 1 [6].



**Slika 1.** Kružni grafovi prikazuju incidenciju i mortalitet kod 10 najčešćih tipova raka u 2018. godini za (A) oba spola, (B) muškarce te (C) žene.

Područje unutar grafa predstavlja udjele cjelokupnih brojeva novih slučajeva i smrti. U nastavku su navedeni pojmovi s grafova te njihovi prijevodi: Breast cancer- rak dojke, Cervix uteri cancer- rak grlića maternice, Colorectum cancer- kolorektalni rak, Corpus uteri cancer- rak maternice, Esophagus cancer- rak jednjaka, Leukaemia- leukemija, Liver cancer- rak jetre. Non-Hodgkins lymphoma- ne Hodgkinov limfom, Ovary cancer- rak jajnika, Pancreas cancer- rak gušterače, Stomach cancer- rak želuca i Thyroid cancer- rak štitnjače. Slika preuzeta s izvora: Globocan 2018, Svjetska zdravstvena organizacija [6].

### **1.1.3 Patofiziologija**

U nastanku raka dojke vrlo su važni poremećaji gena za estrogenske i progesteronske receptore u stanicama raka dojke. Estrogeni djeluju kao promotori jer potiču proliferaciju žljezdanog epitela dojke djelujući preko estrogenskih receptora. Zloćudno izmijenjene stanice raka dojke mogu sadržavati estrogenske receptore koji funkcioniraju kao i u stanicama normalnog žljezdanog epitela dojke. Takve stanice redovito sadržavaju i progesteronske receptore koje inducira hormon estradiol potičući njihov genski izražaj. Međutim somatske mutacije ili hipermetilacija gena u stanicama raka dojke mogu uzrokovati prestanak sinteze estrogenskih i progesteronskih receptora ili izmijeniti njihov ustroj i funkciju. To je razlog velike raznolikosti odziva raka dojke pojedinih bolesnica na hormonske učinke, uključujući hormonsko liječenje. Hormonsko liječenje kojim se smanjuje lučenje ili djelovanje estrogena dovodi do dugotrajnog smanjivanja ili nestanka metastaza u 80% bolesnica s rakom dojke čije stanice sadržavaju estrogenske i progesteronske receptore. Nasuprot tome, takvo je liječenje uspješno tek u 10% bolesnica s tumorima koji ne sadržavaju te receptore. Dakle, hormonska ovisnost raka dojke ovisi o sadržaju estrogenskih i progesteronskih receptora. Stoga je njihovo određivanje u raku dojke važan putokaz za izbor liječenja [7].

## 1.2 Trostruko negativni rak dojke

TNBC čini širok spektar entiteta s različitom biologijom i kliničkim ponašanjem te sa označenim genetskim, transkripcijskim, histološkim i kliničkim razlikama. Tako se dalje može podijeliti na molekularne podskupine s obzirom na prisutnost pretjerane ekspresije androgenog receptora (AR) na AR pozitivni (AR+) TNBC i AR negativni (AR-) TNBC. Uloga AR kao biomarkera u prognozi i praćenju bolesti se trenutno istražuje [9].

Metastatski potencijal trostruko negativnog raka dojke je sličan onima drugih podgrupa raka dojke, ali TNBC je povezan s kraćim vremenom pojave recidiva te smrti odnosno najgorim prognostičkim ishodom [8, 4]. Ova grupa tumora čini oko 15% svih slučajeva raka dojke diljem svijeta. Ciljna terapija je dostupna za ER, PR i HER2 pozitivni rak dojke, no za TNBC nema dostupne standardne terapije [5]. S obzirom da rast stanica raka ne potiču hormoni, ova vrsta raka neće reagirati na hormonsku terapiju (Tamoxifen), kao ni na lijekove koji ciljaju HER2 protein (Herceptin) [4].

### 1.2.1 Epidemiologija trostruko negativnog raka dojke

TNBC obuhvaća otprilike 10-20% svih novodijagnosticiranih raka dojke [8]. Rizik od razvitka TNBC-a varira s dobi, rasom, genetikom, omjerom obujma struka i bokova i obrascima dojenja [4]. Zasad ne postoje epidemiološke studije specifično osmišljene da bi ispitale poveznicu između faktora rizika i prevalencije specifičnih molekularnih podtipova raka dojke, no nekoliko retrospektivnih studija na kohortama je radilo na tom otkriću (skupljeni podaci prikazani u Tablici 1) [6, 8].

Bauer et al. su identificirali 6370 žena sa dijagnozom TNBC-a koristeći podatke dobivene iz California Cancer Registry te su ih usporedili sa 44704 žena s drugim tipovima raka dojke u korelaciji s dobi, rasom/etnicitetom, socioekonomskim statusom, stadijem u kojem je dijagnosticiran rak, stupanj tumora te relativnim preživljenjem. Zaključeno je da je značajno vjerojatnije da će žene starosti ispod 40 godina te žene crne rase ili hispanskog etniciteta dobiti TNBC u usporedbi sa ženama druge rase ili etniciteta. Neovisno o stadiju u kojem je postavljena dijagnoza, ove žene su imale lošiju stopu preživljenja od onih s drugim tipovima raka dojke, te su

žene crne rase s postavljenom dijagnozom u kasnijem stadiju raka imale najslabije preživljenje, s 5-godišnjim relativnim preživljenjem od samo 14%.

**Tablica 1.** Ključne kliničke i patološke karakteristike TNBC fenotipa

Kliničke i patološke karakteristike
Uključuje 15% svih karcinoma dojke u SAD-u
Veća pojavnost kod mlađih žena u usporedbi s drugim podtipovima raka dojke
Veća pojavnost kod žena crne rase i/ili hispanskog etniciteta
Obično je visokog gradusa
Infiltracija tumor infiltrirajućih leukocita je češća nego kod drugih podtipova raka dojke
Veća je prevalencija zametne BRCA mutacije u usporedbi s drugim podtipovima raka dojke
Kraće je vrijeme za nastanak recidiva
Viši je rizik za pojavu visceralnih metastaza, uključujući metastaze na mozgu

Tablica preuzeta i prevedena s izvora: Dawood, S (2010). Triple-Negative Breast Cancer. *Drugs*, 70(17), 2247–2258. [4]

Rauch et al. su istraživali poveznicu između epidemioloških faktora i molekularnih podtipova raka u kohorti koja se sastojala od pacijenata s rakom dojke. Podaci su skupljeni i obrađeni sa strane Njemačkog društva za rak (German Cancer Society). Zaključeno je da je dob bitan faktor u dijagnozi; vjerojatnije je da će žene starosti 42 godine ili ispod te perimenopauzalne žene sa indeksom tjelesne mase (ITM) većim od 32,4 kg/m<sup>2</sup> prije oboliti od TNBC-a.

Iako je TNBC bolest neosjetljiva na hormone neke hormonske preinake koje se događaju kroz ženin život su povezane s povećanim rizikom za razvoj TNBC-a. Višestruke trudnoće i mlada dob pri prvoj trudnoći povećavaju rizik od razvoja TNBC-a, dok dojenje, duže trajanje dojenja te veći broj djece koja su dojena smanjuju rizik od nastanka TNBC-a. Također, što je veći omjer struk/bokovi, to je veći i rizik za razvoj TNBC-a. Pronađeno je da je korištenje oralnih kontraceptiva je povezano s povećanim rizikom za razvoj TNBC-a te nema značajno povećanje rizika za razvoj drugih tipova raka dojke.

Kabel et al. su proveli studiju sa 148030 žena uključenih u inicijativu Women's Health od kojih je 300 slučajeva bilo TNBC te je zaključeno da pušenje cigareta nije povezano s TNBC-om, dok uživanje alkohola smanjuje rizik za nastanak TNBC-a u usporedbi s ne-alkoholičarima.



Prethodne epidemiološke studije pokazale su da premenopauzalna pretilost djeluje protektivno na tkivo dojke, dok je postmenopauzalna pretilost povezana s povećanim rizikom za razvoj raka. Predloženi mehanizam zaslužan za navedeni protektivan efekt uključuje povećanje broja anovulacijskih ciklusa što smanjuje kumulativnu izloženost cikličkim spolnim hormonima te posljedično smanjuje rizik za nastanak tumora ovisnih o hormonima.

Doduše, pretilost (posebice centralni adipozitet, karakteriziran većim omjerom struk/bokovi) može biti povezana s povišenim razinama inzulina i povezanim faktorima rasta koji mogu povećati rizik za nastanak nekih podtipova raka dojke, uključujući trostruko negativan karcinom. Nedavna je studija pokazala da žene oboljele od trostruko negativnog karcinoma dojke imaju visoku prevalenciju metaboličkog sindroma, karakteriziranog pretilošću i inzulinskom rezistencijom. Inzulinska rezistencija može povećati rizik premenopauzalnog raka dojke na način da smanjuje razine globulina koji vezuju hormone što rezultira povišenim razinama slobodnog estrogena i androgena i povećanjem proliferacije epitelnih stanica dojke [5].

### **1.2.2 Etiologija trostruko negativnog raka dojke**

Malo je poznato o etiološkim faktorima koji promiču inicijaciju i razvoj TNBC-a. Pacijentice s obiteljskom poviješću raka dojke i jajnika imaju rizik od 50-85% da razviju rak dojke tijekom života. Mutacije u BRCA1 genu u dojci i jajnicima su povezane s nastankom TNBC-a, preciznije rečeno 60-80% tumora dojke sa mutacijom BRCA1 gena prikazuje trostruko negativni fenotip, a 15-20% žena s TNBC-om nosi mutaciju BRCA1/2 gena, pogotovo kod žena kod koji je TNBC dijagnosticiran prije 50.-e godine [5, 10].

Dodatne studije su identificirale mutacije BRCA1 gena kod 29% pacijenata oboljelih od TNBC-a koji su po etničkoj pripadnosti Aškenazi, kod 20% pacijenata kojima je TNBC dijagnosticiran u ranoj dobi s ili bez obiteljske povijesti raka dojke te kod 8-14% pacijenata bez obiteljske povijesti raka dojke [5, 11].

### 1.2.3 Kliničke osobine trostruko negativnog raka dojke

TNBC se na mamogramu prezentira kao masa glatkih rubova bez kalcifikacija, a brz rast tumora te česta pojava kod mlađih žena otežava otkriće TNBC-a redovnom mamografijom ili ultrazvukom u odnosu nađene s drugim podtipom raka dojke [4, 11].

Tumori TNBC-a i rak dojke sličan bazalnom općenito su veći nego tumori ostalih podtipova raka. Veličina tumora ovisi o kategorizaciji TNBC-a s obzirom na prisustvo odnosno odsustvo androgenog receptora u stanici raka: AR+TNBC varira od 0,6 do 10,3 (mean 3,1, median 2,9) cm te je veći od AR-TNBC (mean 2,3 cm, median 2,0 cm) [4, 9, 11]. Uz to, tumori kod pacijentica s TNBC obično su invazivni duktalni karcinomi visokog stupnja te postoji visoka stopa pozitivnih limfnih čvorova [11, 12].

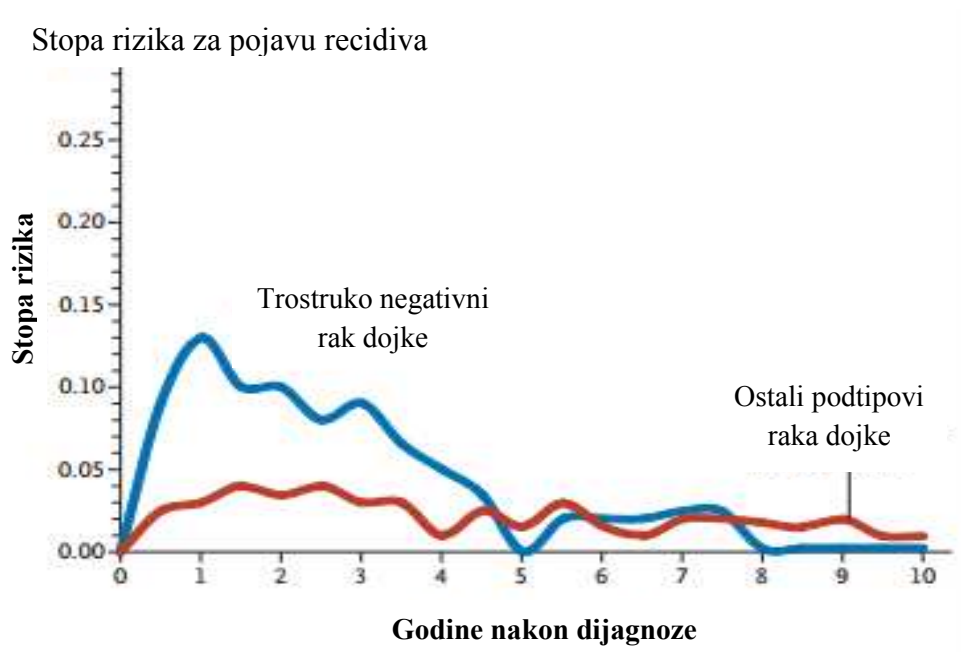
Ostale osobine TNBC-a uključuju neke od prethodno spomenutih: mlađu dob pri dijagnozi u usporedbi s drugim podtipovima raka, češći kod žena crne rase ili hispanskog etniciteta, više razine tumor infiltrirajućih limfocita te kraće razdoblje u kojem se može dogoditi recidiv [4].

Što se tiče metastaza, kod TNBC-a je dosta viši rizik za pojavu metastaza na mozgu (oko 30%) nego kod ostalih podtipova, malo je viši rizik za pojavu metastaza na plućima (oko 40%) i jetri (oko 20%) te je značajno niži rizik za pojavu metastaza na kostima (oko 10%) [11, 12].

### 1.2.4 Prognoza liječenja trostruko negativnog karcinoma dojke

Svaki podtip raka dojke ima jedinstven prognostički ishod. Studije provedene sa strane Sørli et al su dovele do zaključka da sveukupno preživljenje značajno varira kod različitih podtipova raka dojke, a najgore je kod HER2 pozitivnog raka te kod raka sličnog bazalnom. U kanadskoj studiji koju su proveli Drent et al pokazano je da žene oboljele od TNBC-a imaju povišen rizik od smrti i dalekog recidiva u usporedbi sa ženama koje boluju od drugih podtipova raka dojke. Detaljnije, stopa recidiva kod TNBC-a je visoka prvih par godina nakon operacije, postižući vrhunac tri godine nakon operacije, nakon čega rizik od pojave recidiva brzo opada. S druge strane, pacijentice oboljele od ER-pozitivnog raka dojke, najčešće doživljavaju recidive u razdoblju od 5 do 10 godina nakon operacije te je u duljem razdoblju zabilježen veći broj događaja povezan s rakom dojke nego kod pacijentica s TNBC-om, kako je prikazano na Slici 2 [5, 12].

Žene sa podtipom sličnom bazalnom raku dojke općenito imaju goru prognozu od žena sa rakom koji nije sličan bazalnom. Također, iako je jasna razlika u preživljenju kod različitih rasnih skupina, te je incidencija TNBC-a veća među ženama crne rase, studije su pokazale ako se žene različitih rasnih grupa sa dijagnosticiranim TNBC-om podvrgnu sličnoj terapiji te standardnom praćenju bolesti, prognostički ishodi između različitih rasnih grupa su slični [11].



**Slika 2.** Prikaz rizika od pojave recidiva kod pacijentica s TNBC-om te pacijentica s ostalim podtipovima raka dojke.

Slika preuzeta s izvora: Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2010;363:1938-48. [11]

### 1.2.5 Dijagnostika trostruko negativnog raka dojke

#### *Mamografija:*

Unatoč tome što su kod TNBC-a tumori znatne veličine u usporedbi s drugim podtipovima raka, oko 18% TNBC slučajeva su okultni pri prvotnoj mamografiji. Na mamografiji se TNBC prezentira kao masa, s glatkim rubovima u oko 20-24% slučajeva, s odsustvom kalcifikacije u 49-100% slučajeva te s nedostatkom nekih od tipičnih osobina raka dojke koji se inače primjećuju na

mamografskom pregledu, kao što su nepravilan oblik, s nejasnim granicama prema zdravom tkivu te kalcifikacije inače karakteristične za tumore.

*Ultrazvuk:*

Na ultrazvuku se TNBC prezentira kao jasno izražena masa s prilično ograničenim rubovima ultrazvučni pregled pokazao vrlo visoku osjetljivost za TNBC (92-100%) [5].

*Magnetska rezonancija (MRI):*

Što se tiče magnetske rezonancije, osobine koje su najčešće primijećene pri vizualizaciji tumora su glatke lezije s povećanjem granicama prema glatkom tkivu, i intratumoralni signali jakog intenziteta kod pretrage T2-magnetskog zračenja. Potonji odgovaraju tumorskoj nekrozi te su značajno češći kod tumora s glatkim rubovima, što je bitna informacija s obzirom da je nekroza prognostički faktor u invazivnom raku dojke [5, 13].

Također, dijagnoza TNBC-a podrazumijeva testiranje na prisutnost ER, PR i HER2 proteina, iako se određivanje toga statusa prvenstveno koristi zbog odabira ciljne terapije, ne zbog same identifikacije TNBC-a. Prema najnovijim smjernicama Američkog društva za kliničku onkologiju prisutnost ER i PR se određuje pomoću IHC metode, a HER2 pomoću IHC ili FISH metode [9].

### **1.2.6 Terapijske opcije i napretci u terapiji trostruko negativnog raka dojke**

*Sistemska terapija:*

Zbog nedostatka molekularnih ciljeva na stanici raku dojke, kemoterapija je jedina dostupna sistemska terapija za TNBC, te unatoč svojoj agresivnoj prirodi, ovaj podtip raka može biti vrlo osjetljiv na djelovanje citotoksičnih lijekova.

Standardna kemoterapija temeljena na antraciklinima i taksanima dokazano uspješno djeluje kod određenog podskupa pacijenata, ali unatoč liječenju, znatan broj oboljelih (30-40%) u ranom stadiju TNBC-a razvije metastatsku bolest te umre od raka, no napredak što se tiče postizanja potpunog patološkog odgovora je pokazalo dodavanje soli platine standardnoj terapiji temeljenoj na antraciklinima i taksanima [4, 14].

Neoadjuvantna terapija podrazumijeva primjenu lijekova prije pravog tretmana, to uključuje smanjivanje tumora kako bi se operacija mogla izvršiti [5]. Pacijenti koji su postigli

potpuni patološki odgovor nakon neoadjuvantne terapije imaju odlično dugoročno preživljenje [4,11]. Zanimljiva informacija je da je prisutnost i povećani postotak tumor infiltrirajućih limfocita, koji su prognostički faktori u ranom stadiju TNBC-a povezana s boljim odgovorom na neoadjuvantnu terapiju temeljenu na antraciklinima [4].

Nekoliko drugih ciljnih agenasa je istraživano u svrhu pronalaska potencijalnog lijeka za TNBC. Pretjerana ekspresija EGFR je primijećena u oko 60% slučajeva TNBC-a, te je ta opservacija dovela do istraživanja monoklonskog protutijela cetuksimaba koji cilja EGFR. Dodavanje cetuksimaba adjuvantnoj terapiji je pokazalo veću stopu odgovora na terapiju ali je rezultiralo većom toksičnošću. Studije su zabilježile povišene razine vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. Vascular endothelial growth factor, VEGF) kod žena s TNBC-om, stoga je istraživano monoklonsko protutijelo bevacizumab koji cilja VEGF. Dodatak tog lijeka adjuvantnoj terapiji je pokazalo pozitivne ishode. Inhibitori multitirozin kinaze, sunitinib i sorafenib, su također istraživani kao potencijalna terapija TNBC-a. Ciljaju na VEGF, PDGFR i c-kit. Veća stopa odgovora na terapiju je pokazana kod pacijenata otpornih na adjuvantnu terapiju. Poli(ADP-riboza)polimeraza (PARP) je jezgreni enzim koji je ključan element kod stanične proliferacije i popravka DNA; inhibitori tog enzima se još istražuju kao potencijalni lijekovi. Jedan od njih je iniparib koji je istraživan u kombinaciji s karboplatinom te je zabilježeno značajno poboljšanje ishoda i bolje sveukupno preživljenje [4,10].

#### *Operacija:*

Operacija, kao lokalni tretman TNBC-a, slična je onoj drugih podtipova raka dojke. Uključuje kirurško uklanjanje tumorske mase mastektomijom ili operacijom koja štedi tkivo dojke (engl. *breast-conserving surgery*, BCS) i praćena je radioterapijom. Nekoliko studija je istražilo utječe li tip operacije na ishod te je studija provedena od strane Parkera i suradnika zaključila da je 5-godišnje preživljenje bolje kod pacijenata s provedenim BCS-om nego kod pacijenata s provedenom mastektomijom.

#### *Radioterapija (RT):*

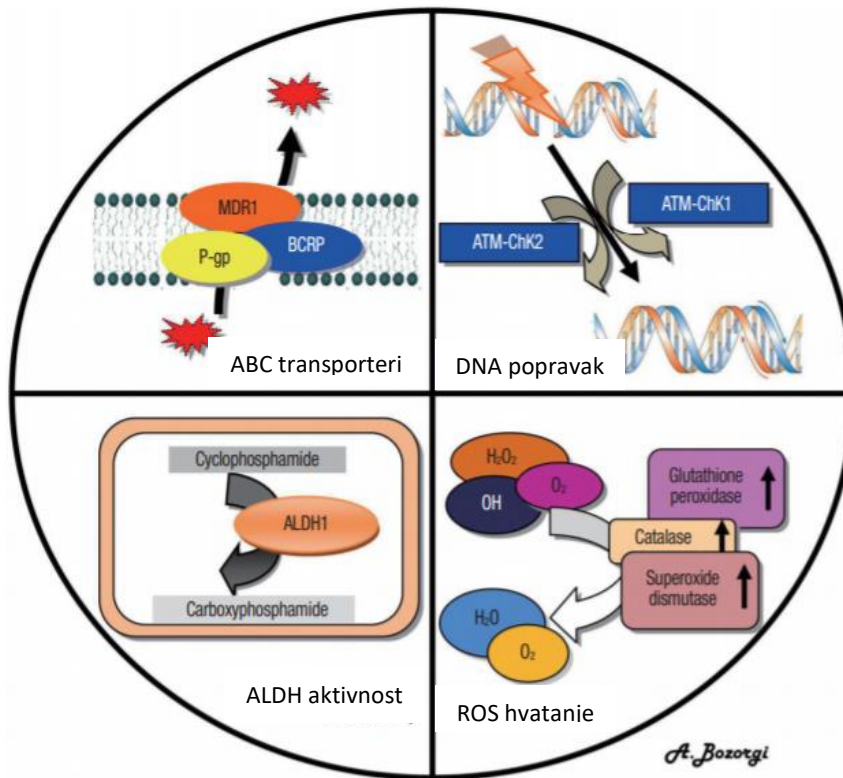
Važnost radioterapije u dugoročnom liječenju raka dojke je utvrđena, te se provodi nakon obavljenog BCS-a. Smjernice za adjuvantnu radioterapiju TNBC-a je jednaka kao i kod drugih tipova raka dojke [11].

### 1.3 Matične stanice raka

Prijelaz stanica raka u matične stanice raka, CSC (od engl. *cancer stem cells*) ostvaruje se zadobivanjem fenotipa koji im olakšava migraciju i invazivnost [15]. Matične stanice raka dojke predstavljaju subpopulaciju tumorskih stanica te su istraživane kao jedan od mogućih uzroka pojave recidiva i metastaza kod prethodno liječenih pacijenata. Nedostatak glikosfingolipida Gb3Cer, izazvan delecijom gena laktozilceramid 4-alfa-galaktoziltransferaze (A4GALT), koji kodira sintezu Gb3Cer, povećava broj CSC koje su pozitivne na biljeg CD44 a negativne na biljeg CD24 [16]. Glikosfingolipidi su važne komponente stanične membrane te mogu utjecati na krajnje ponašanje stanice. Osim Gb3Cer, važnu ulogu u metastaziranju stanica raka ima i glikokonjugat CD15s.

Matične stanice ne moraju nužno proizaći iz matičnih stanica tkiva, već mogu proizaći iz već diferencirane stanice raka koja je poprimila svojstvo samoobnove. Ostale teorije predlažu da BCSC mogu originalno poteći iz somatskih stanica [17]. Dakle, matične stanice raka imaju sposobnost samoobnavljanja i regeneracije heterogenosti primarnog tumorskog fenotipa, a definirane su izražajem biljega CD44 i CD24 (CD44+/CD24-). Smatra se da CSC doprinose otpornosti na terapiju koju pokazuju različiti tipovi raka, uključujući trostruko negativni rak dojke te rak prostate [18, 19, 20]. Neki od mehanizama otpornosti na terapiju su navedeni dalje u tekstu te prikazani na Slici 3.

ABC transporteri (s kutijastim domenama koje vezuju ATP, od engl. *ATP binding cassette domains*) igraju bitnu ulogu u kemijskoj homeostazi i preživljavanju stanice u nepogodnim uvjetima. Zapaženi su u fenomenu poznatom kao otpornost na više lijekova, MDR (od engl. *multidrug resistance*) u raznim karcinomima. Zakazivanje uobičajenog popravka DNA je još jedan od mehanizama rezistencije na terapiju. S metastazama i invazijom karcinoma povezan je i enzim aldehid dehidrogenaza (ALDH1). ALDH inducira rezistenciju na radioterapiju matičnih stanica raka. Konačno, još jedan bitni mehanizam rezistencije je uklanjanje reaktivnih oblika kisika, ROS, (od engl. *reactive oxygen species*) indukcijom enzima glutation peroksidaze, katalaze i superoksid dismutaze., čime CSC sebi omogućuju dulje preživljenje (Slika 3) [17].



**Slika 3.** Različiti mehanizmi koju potpomažu u otpornosti na određenu terapiju u raku dojke, uključujući i TNBC.

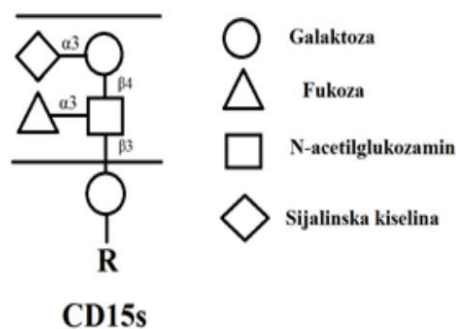
Slika preuzeta s izvora: Bozorgi, A; Khazaei, M; Khazaei, MR. New findings on breast cancer stem cells. *Journal of Breast Cancer*.2015;18:303-12. [17]

Matične stanice trostruko negativnog raka dojke i „raka dojke sličnog bazalnom karakterizirane su CD44+CD24- fenotipom (u kojem je visoka ekspresija CD44+, a razine CD24- su vrlo niske ili neprepoznatljive) te ekspresijom aldehyd dehidrogenaze 1 (ALDH1A1). CD44 je površinski glikoprotein bitan za brz razvoj raka jer je njegova uloga u adheziji, migraciji, invaziji BCSC, proliferaciji i angiogenezi tumora od kritične važnosti.

Površina tumorskih stanica se znatno razlikuje od površine normalnih stanica glede glikozilacije, a to je posljedica poremećaja u radu glikoziltransferaza i glikozidaza u stanicama tumora [21].

### 1.3.1 Glikokonjugati na plazma membranama matičnih stanica

Glikokonjugati su važne komponente stanične membrane te mogu utjecati na krajnje ponašanje stanice. Nedostatak glikosfingolipida Gb3Cer, izazvan delecijom gena laktozilceramid 4-alfa-galaktoziltransferaze (A4GALT), koji kodira sintezu Gb3Cer, povećava broj CSC koje su pozitivne na biljeg CD44 a negativne na biljeg CD24 [16]. Osim Gb3Cer, važnu ulogu u metastaziranju stanica raka imaju i glikoprotein CD44 i glikoprotein/glikosfingolipid CD15s (sialil-Lewis x) [17, 18]. Stanice raka zlorabe u patološke svrhe fiziološki mehanizam ekstravazacije leukocita, vezujući se za receptor endotelni selektin na plazma membranama endotelnih stanica te tako prodiru u tkivo [23]. CD15s je inače fiziološki izražen na leukocitima, odgovoran je za njihovo vezanje za endotelni selektin krvnih žila te potom prolaz u subendotelno inficirano ili ozlijeđeno tkivo [24].



**Slika 4.** CD15s glikokonjugatnog liganda. R predstavlja N- ili O-glikan vezan za integralni membranski protein, a kod glikolipidnih liganada R je ceramid vanjskog jednosloja plazma membrane. Preuzeto s izvora: Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors [25].

Signalni put sporog kotrljanja leukocita nakon vezanja na endotelni selektin, a prije same ekstravazacije leukocita u subendotelno područje krvne žile, uključuje fosfolipazu C, enzim u staničnoj membrani koji sudjeluje u regulaciji brojnih staničnih funkcija (transformacija, diferencijacija te rast stanica). Također, fosfolipaza C sudjeluje u razvoju raka kao signalizirajući intermedijar za citokine kao što su EGFR i interleukini [15].

Kod tumora sličnih bazalnom, stanice raka dojke mogu se podvrgnuti epitelno-mezenhimalnoj tranziciji čime poprimaju svojstva gotovo nerazlučiva od onih od BCSC. Tranzicija od epitelnih do mezenhimalnih karakteristika je prirodan proces koji se događa prilikom



embriogeneze, cijeljenja rane i regeneracije tkiva. Stoga, istražuje se kao ključan korak u nastanku metastatskog potencijala raka. Bitna činjenica vezana za preživljenje tumorskih stanica je ta da tumor mora imati određenu klimu u kojoj ima sve potrebno za brzi rast i razvoj. Specifično stanje u kojem se nalaze tumorske stanice naziva se mikrookoliš. Mikrookoliš CSC-a uključuje različite faktore koji utječu na svojstva CSC-a. Ovi faktori obuhvaćaju podražaj fibroblasta, imunološke stanice, autokrine signale i izvanstanični matriks, kao i fizičke/kemijske faktore kao što su pritisak kisika, nutrijenti i pH [17, 11].

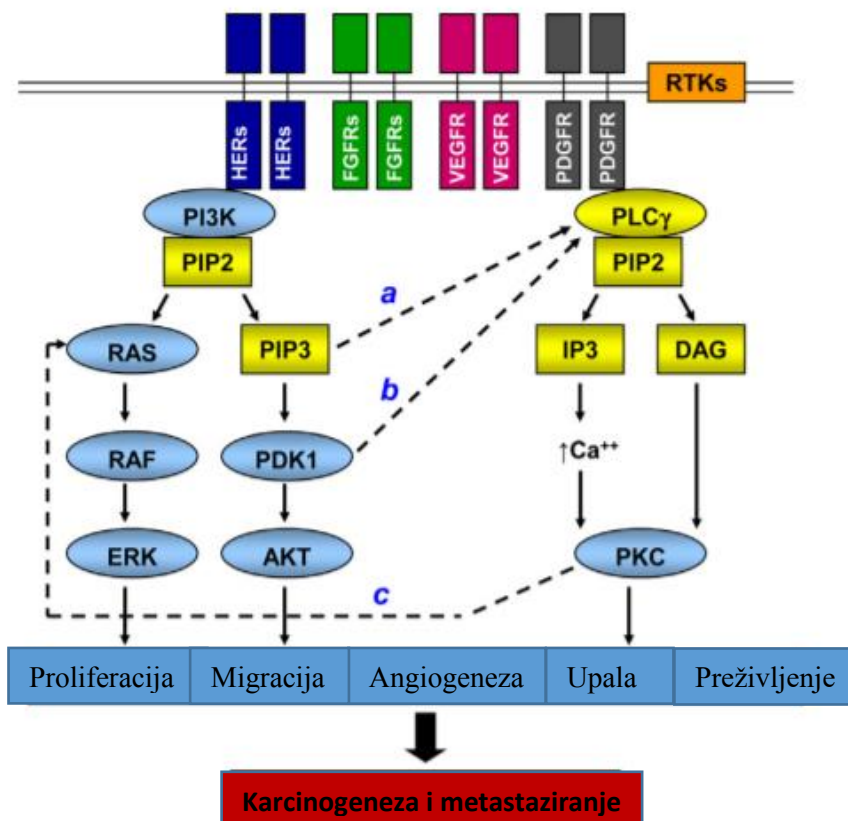
Što se tiče zametne BRCA1 mutacije te mutacije tumor supresorskog gena p53, trostruko negativan te rak dojke sličan bazalnom, klinički gledano, indiciraju potencijalnu prisutnost istih. Iako su BRCA mutacije odgovorne za samo 5-10% slučajeva raka dojke u žena, 70% tih slučajeva su upravo trostruko negativnog fenotipa [2, 5].

#### **1.4 Fosfolipaza C kao ciljna molekula u terapiji tumora**

Fosfolipaza C, PLC (od engl. *phospholipase C*) regulira pokretljivost, transformaciju, diferencijaciju i rast stanica pa stoga predstavlja dobru ciljnu molekulu za terapiju tumora [26]. Izoenzimi fosfolipaze C kataliziraju hidrolitičko cijepanje fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata (PIP<sub>2</sub>) na dva druga glasnika: diacilglicerol (DAG) i inozitol-1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) koji posredno aktiviraju fosforilaciju unutarstaničnih proteina, uključujući i MAP kinaze (mitogenom aktivirane protein kinaze), odgovorne za proliferaciju stanica [27]. Studije su zabilježile promjene u razinama ekspresije PLC-a u stanicama tumora, kao što je promjena u ekspresiji PLC- $\gamma$ 1 koji sudjeluje u regulaciji migracije stanica. Povišena razina PLC- $\delta$ 4 pogoduje proliferaciji stanica raka. Također aktivirajući svoje signalne puteve, ovaj enzim, uz fosfatidilinozitol-3-kinazu, PI3K, igra bitnu ulogu u proliferaciji, angiogenezi, inflamaciji i preživljenju stanica. U slučaju poremećaja signalnih puteva, sudjeluje u procesu metastaziranja raka, koji je, kao što je navedeno ranije, jedan od najčešćih uzročnika smrti od raka (Slika 5) [28, 29, 30]. Dakle homeostaza signalnih puteva je od ključne važnosti za stanično zdravlje i prevenciju razvoja raka [31, 32]. Potencijalni lijek za terapiju tumora, iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina, koji bi ciljao na PLC, otkriven je probirom na osnovu računalnog modeliranja metodom vHTS (engl. virtual high throughput screen) [26].

Inhibitor fosfolipaze C iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina mogao bi doprinijeti smanjenju izražaja metastatskog glikokonjugata CD15s na plazma membranama matičnih stanica raka.

R. Lattanzio et al. / *Advances in Biological Regulation* 53 (2013) 309–318



**Slika 5.** Uloga fosfolipaze C u karcinogenezi i metastaziranju. Žuti kvadrati i elipse predstavljaju signaliziranje potaknuto PLC $\gamma$ 1, plave elipse predstavljaju PI3K i njegove nizvodne efekte. Aktivacija signalnih puteva pomoću PLC $\gamma$  u konačnici dovodi do regulacije proliferacije, migracije, angiogeneze, inflamacije i preživljenja stanica raka. Isprekidane linije a-c predstavljaju međusobnu povezanost PI3K i PLC $\gamma$ 1.

Slika preuzeta i prevedena s izvora: Lattanzio, R., Piantelli, M., & Falasca, M. (2013). Role of phospholipase C in cell invasion and metastasis. *Advances in Biological Regulation*, 53(3), 309–318. [28]

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA**

## 2. Ciljevi istraživanja i hipoteze

Obzirom da je CD15s biljeg odgovoran za metastaziranje matičnih stanica raka, ciljevi istraživanja su:

1. odrediti postotak subpopulacije matičnih stanica raka dojke pozitivnih na biljeg CD15s nakon tretmana novosintetiziranim inhibitorom PLC i
2. odrediti prosječni izražaj CD15s po jednoj matičnoj stanici nakon tretmana novosintetiziranim inhibitorom PLC.

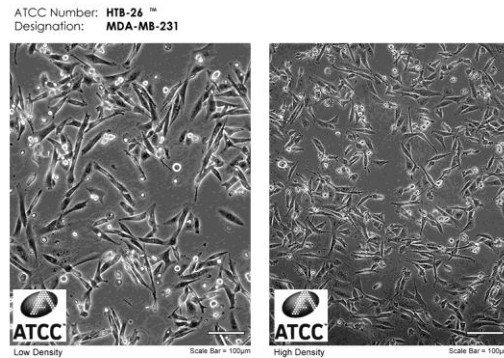
Hipoteze su da će primijenjena koncentracija inhibitora PLC:

1. smanjiti postotak subpopulacije matičnih stanica raka dojke pozitivnih na biljeg CD15s i
2. smanjiti prosječni izražaj metastatskog biljega CD15s po jednoj matičnoj 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 (Slika 6).



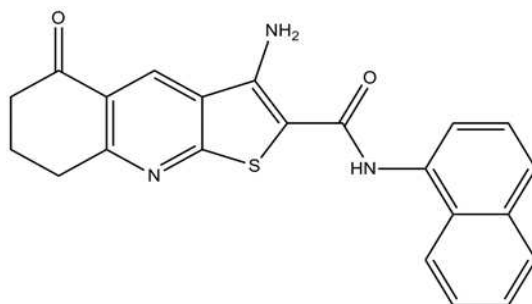
**Slika 6.** MDA-MB-231 stanice u staničnoj kulturi. Lijevo-niska gustoća; desno-visoka gustoća  
Preuzeto s: [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx?geo\\_country=hr](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx?geo_country=hr) [33].

Stanice su uzgajane u inkubatoru na 37° C uz 5% CO<sub>2</sub> u mediju DMEM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) koji je sadržavao još i 10% fetalni goveđi serum, FBS (od engl. *fetal bovine serum*) (EuroClone, Milano, Italija) i 1% antibiotik (EuroClone, Milano, Italija).

### 3.2. Novosintetizirani inhibitor

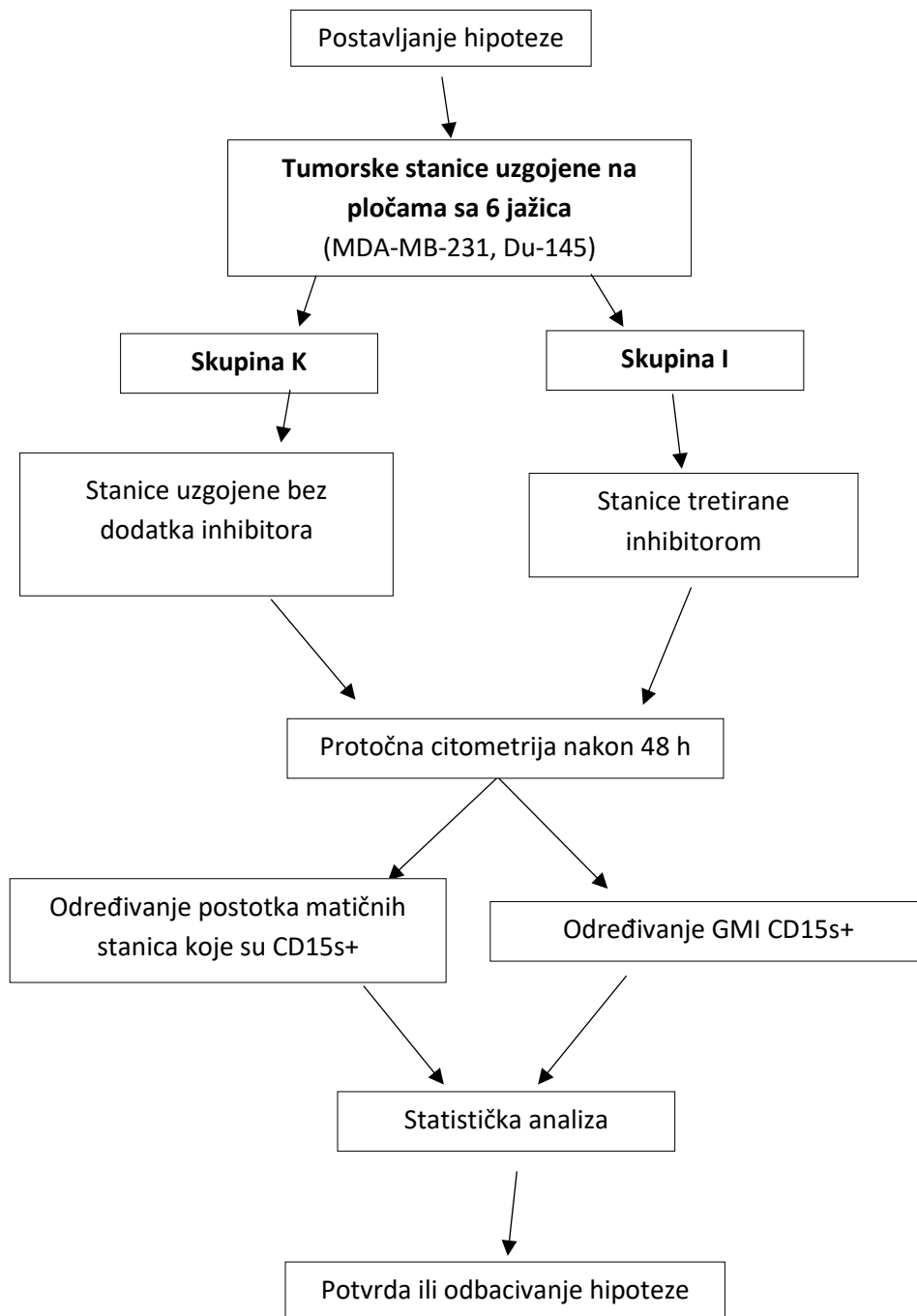
Inhibitor iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina (Slika 7.) sintetiziran je nakon probira računalnim modeliranjem metodom vHTS (engl. *virtual high throughput screen*) [34]. Dosad je dokazano da tieno[2,3-*b*]piridin ograničava rast MDA-MB-231 stanica, povećava populaciju u G2/M fazi te smanjuje pokretljivost i proliferaciju. Inhibitor je razvijen s ciljem da inhibira fosfolipazu C te su zapaženi učinci u skladu su s inhibicijom PLC- $\delta$ 1 i  $\delta$ 2 izoforma [35].

Zbog hidrofobnog ponašanja, inhibitor je prvo bio otopljen u dimetil sulfoksidu DMSO-u (od engl. *dimethyl sulfoxide*). Koncentracija o 2  $\mu$ M postignuta je razrjeđivanjem s PBS-om.



**Slika 7.** Inhibitor fosfolipaze C, 3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamid.

### 3.3. Ustroj istraživanja



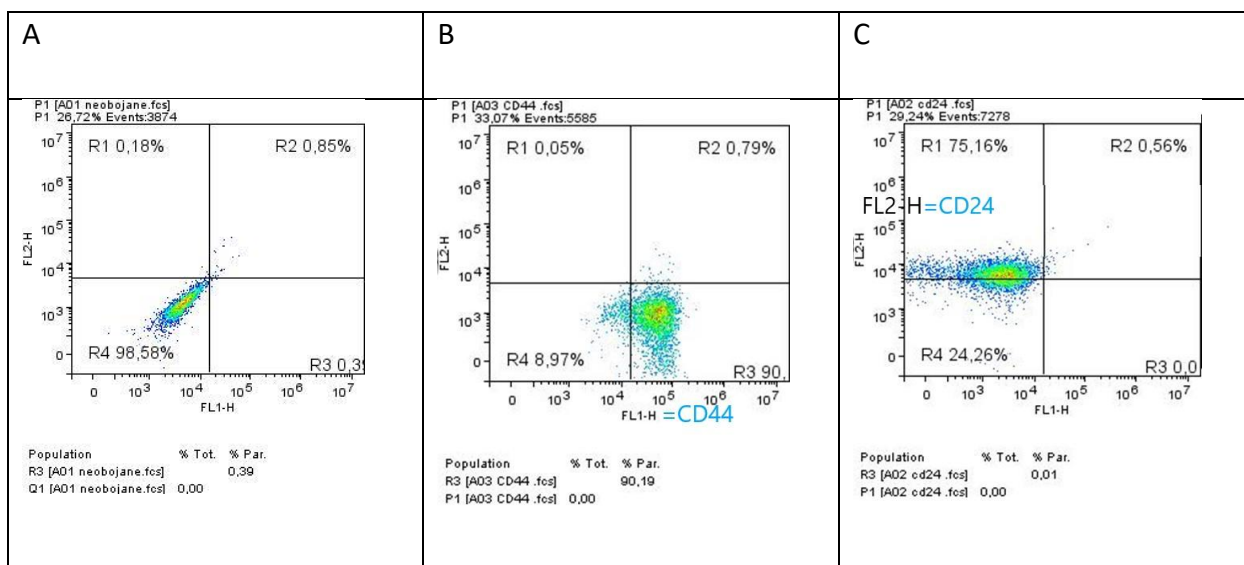


### 3.4. Tretiranje stanica inhibitorom i imunobojenje

Približno jednak broj stanica nasađen je na ploče sa šest jažica, svaka volumena 2 ml. Nakon najmanje 12h, pod mikroskopom je provjereno jesu li stanice adherirane za površinu jažica. Potom su tretirane 2  $\mu$ M koncentracijom inhibitora PLC u mediju. Kontrolama je samo zamijenjen medij. Nakon 48h, uklonjen je medij sa stanica, te provedena tripsinizacija kako bi se stanice odvojile od površine jažica. Nadalje se uzorci predtretirani s Fc receptorom (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). Fc receptor veže se za različite molekule na površini stanice koje bi u slučaju da su slobodne nespecifično vezale protutijela za biljege koji se istražuju. Istraživana su 3 biljega pa su primijenjena tri protutijela od kojih 2 s kromogenima dok je primarno protutijelo na CD15s (BD Biosciences) bilo neobilježeno protutijelom te je na njega primijenjeno sekundarno protutijelo konjugirano s kromogenom eFluor 660 (eBioscience, Inc., San Diego, CA, SAD). Protutijelom na CD44 bilo je konjugirano s kromogenom FITC (BD Biosciences) a protutijelo na CD24 s kromogenom PE (eBioscience) [36]. Fluorescencije obojenih uzoraka izmjerene su pomoću protočnog citometra. Svi su pokusi provedeni u triplikatu.

### 3.5. Analiza izmjerenih fluorescencija s ciljem detekcije matičnih stanica s biljekom CD15s

Podaci dobiveni protočnom citometrijom nadalje su analizirani FlowLogic programom (Invai, Mentone, Victoria, Australija). Granice za matične stanice raka (CD44+CD24-) postavljene se na točkastim dijagramima (od engl. *dot-plot*, gdje svaka točka predstavlja jednu stanicu) na osnovu mjerenja neobojenih stanica te stanica bojanih bilo anti-CD44 ili anti-CD24 protutijelom (Slika 8).



**Slika 8.** Biranje granica za matične stanice raka, unutar kvadranta R3 (CD44+CD24-), na osnovu citograma neobojenih (A) te imunobojenih stanica protutijelom na CD44 (B) ili protutijelom na CD24 (C)

Kod uzoraka bojanih s oba protutijela kvadrant R3 je preuzet kao samostalni s koordinatama FL-3 naspram FL-1. Naime, u FL-3 kanalu mjerena je fluorescencija kromogena konjugiranog za sekundarno protutijelo na CD15s. Time je omogućeno određivanje postotka za CD15s unutar subpopulacije matičnih stanica.

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.

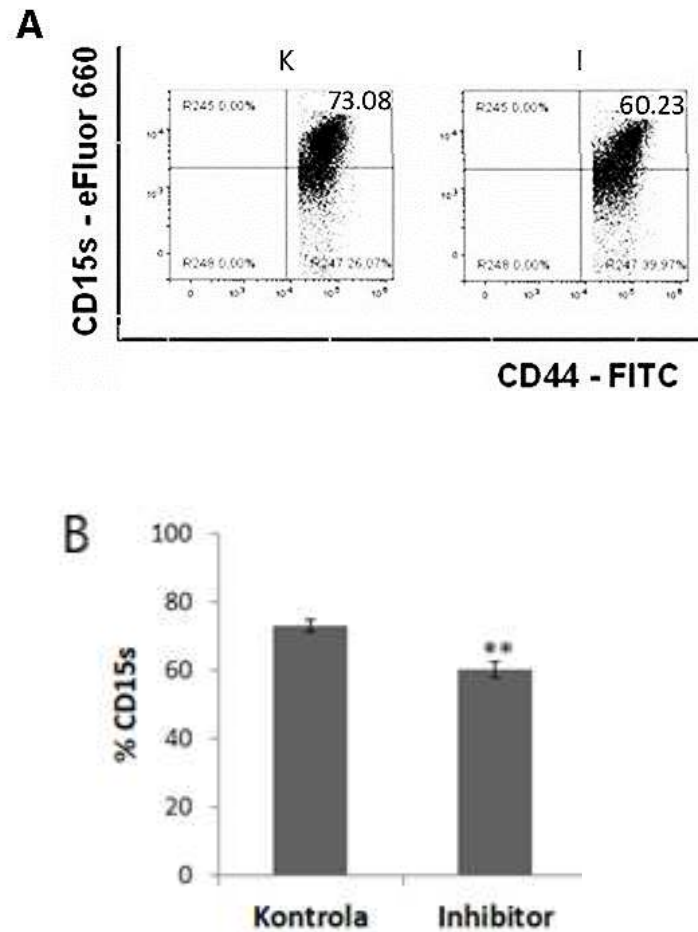
### **3.6. Statistička analiza rezultata**

Podaci dobiveni FlowLogic programom obrađeni su ANOVA testom te *post-hoc* Tukey testom u Statistica programu (for Windows version 7.0; Stat Soft, Tulsa, USA). Statistička značajnost postavljena je na  $P=0,05$ .

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Djelovanje inhibitora na postotak CD15s+ subpopulacije matičnih stanica raka

Metastatski biljeg tumorskih stanica CD15s omogućava njihovu infiltraciju u različita tkiva. Inhibitor je snizio postotak CD15s+CSC unutar ukupne CSC subpopulacije (Slika 9)

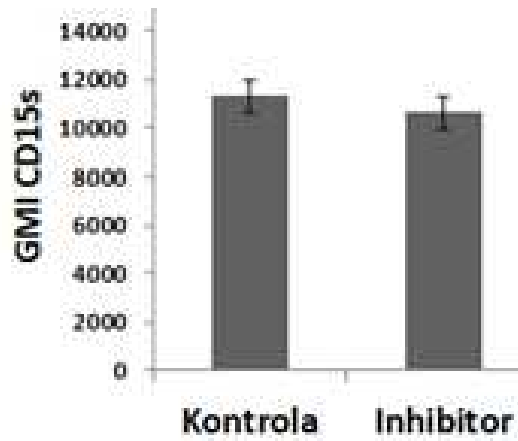


**Slika 9.** Točkasti (A) i statistički (B) dijagram postotka matičnih stanica raka koje su pozitivne na biljeg CD15s

\*\* P<0,01

#### 4.2. Djelovanje inhibitora na izražaj CD15s+ subpopulacije po pojedinoj matičnoj stanici raka

Tretman inhibitorom nije utjecao na izražaj CD15s na CSC (Slika 10).



**Slika 10.** Izražaj (GMI) za CD15s na matičnim stanicama

## **5. RASPRAVA**

Dokazano je da PLC ima ključnu ulogu u rastu i invaziji stanica te da signaliziranje putem PLC, točnije izoforme PLC $\gamma$ , doprinosi karcinogenezi. Snažni dokazi potvrđuju da je PLC $\gamma$ 1 ključni enzim u razvoju i održavanju tumorskih metastaza kontrolom signalnih puteva važnih za metastatski razvoj (studije su pokazale da se metastaze molekularno razlikuju od primarnih tumora). Stoga ciljanje signalnih puteva PLC $\gamma$ 1 pomoću njegovih inhibitora predstavlja jednu od najnovijih strategija u kontroli širenja tumorskih metastaza [28, 38].

Dakle, fokus ovog istraživanja bio je odrediti djelovanje novosintetiziranog inhibitora fosfolipaze C, 3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*] kinolin-2-karboksamida (slika 7.) na metastatski biljeg CD15s matičnih stanica raka dojke koje su generalno otporne na terapiju.

U ranijoj sličnoj studiji istraživano je djelovanje inhibitora fosfolipaze na stanice raka dojke. Kao inhibitor fosfolipaze C korišten je također kemijski spoj iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina, 3-amino-*N*-(3-klorofenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamid, te je, između ostaloga, dokazano njegovo agresivno djelovanje na morfologiju stanice raka dojke, točnije na citoskelet i pokretljivost stanice koja potencijalno značajno povećava invazivnost metastaziranja [37]. No osim same pokretljivost stanice, za njen prolaz iz krvi kroz endotelnu tkivnu barijeru, presudan je izražaj metastatskog biljega CD15s.

Da bismo procijenili utjecaj novosintetiziranog inhibitora fosfolipaze C na metastatski potencijal matičnih stanica MDA-MB-231 stanične linije raka dojke (CSC), određivan je postotak CSC koje eksprimiraju glikokonjugat CD15s te također prosječni izražaj CD15s po jednoj CSC nakon tretiranja s inhibitorom..

Tretman inhibitorom fosfolipaze C značajno je smanjio postotak subpopulacije matičnih stanica pozitivne na biljeg CD15s no nije utjecao na izražaj CD15s po jednoj matičnoj stanici raka.

Dokazano smanjenje subpopulacije CSC pozitivnih na biljeg CD15s pomoću inhibitora je klinički relevantno zbog toga što je upravo glikokonjugat CD15s, eksprimiran na površini CSC, odgovoran za metastaziranje, na način da se vezuje na endotelni selektin na plazma membranama endotelnih stanica te pomaže prodiranje u tkivo [21, 22, 23]. Stoga inhibitori fosfolipaze C predstavljaju obećavajuće područje istraživanja u farmakologiji i medicini, pogodno za istraživanje lijeka za TNBC, osobito metastatski oblik.

Problem inhibitora fosfolipaze C kao potencijalnog lijeka za TNBC je identificiran odmah pri početku istraživanja uloge PLC u karcinogenezi i metastaziranju raka, a jedna od studija koja



je na to ukazala je provedena od strane Lattanzia i suradnika. Inhibicija PLC može izazvati ozbiljne nuspojave, pogotovo ako je inhibitor nespecifičan, jer ovaj enzim ima vrlo bitnu ulogu u regulaciji brojnih staničnih procesa, [28]. Kod sisavaca inače postoji 13 izoenzima PLC koji se mogu svrstati u 6 skupina. Iako svi izoenzimi kataliziraju istu reakciju, svaki od njih ima jedinstvenu fiziološku funkciju te različitu raspodjelu po tkivima [39]. Za pretpostaviti je da svi PLC enzimi ne bi bili jednako inhibirani novim inhibitorom te da bi većina staničnih funkcija bile očuvane.

Molarna masa inhibitora je 386,37 g/mol, dakle nije prevelika molekula. Lipofilnog je ponašanja, dakle lako prolazi kroz plazma membrane pa potencijalno može biti vrlo učinkovit u živom organizmu [40, 41]. Zato bi bilo vrijedno istražiti djelovanje inhibitora na *in vivo* modelu. Idelani bi bili tzv. *nude* miševe s nerazvijenim timusom koji ne odbacuju transplantirane tumore. [42].

## **6. ZAKLJUČCI**

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

2. Tretman MDA-MB-231 stanične linije 2  $\mu$ M koncentracijom inhibitora fosfolipaze C iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina ne mijenja prosječni izražaj metastatskog biljega CD15s po jednoj matičnoj stanici raka dojke.

## **7. REFERENCE**

1. Breast Cancer. NCI. January 1980. Archived from the original on 25 June 2014.
2. Breast Cancer Treatment (PDQ®). NCI. 23 May 2014.
3. Orešić V, Nola P, Petrincec Z, Vrdoljak D V. Kirurško liječenje u: Turić M. Kolarić K, Eljuga D. Klinička onkologija Zagreb: Nakladni zavod Globus, 1996.
4. Dawood, S (2010). Triple-Negative Breast Cancer. *Drugs*, 70(17), 2247–2258.
5. Kumar, P., & Aggarwal, R.. An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 293(2), 247–269. (2015)
6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:394-424.
7. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici. Patofiziologija: Endokrinopatije. 7. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011 (359-360.)
8. Hudis CA, Gianni L. "Triple-negative breast cancer: an unmet medical need". *The Oncologist*. 16 Suppl 1: 1–11. (2011)
9. Astvatsaturyan, K., Yue, Y., Walts, A. E., & Bose, S. (2018). Androgen receptor positive triple negative breast cancer: Clinicopathologic, prognostic, and predictive features. *PLOS ONE*, 13(6), e0197827.
10. Sharma, P. (2016). Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist*, 21(9), 1050–1062.
11. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010;363:1938-48.

12. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., ... Narod, S. A. (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4429–4434
13. Uematsu T, Kasami M, Yuen S (2009) Triple-negative breast cancer: correlation between MR imaging and pathologic findings. *Radiology* 250:638–647
14. Brewster, A. M., Chavez-MacGregor, M., & Brown, P. (2014). Epidemiology, biology, and treatment of triple-negative breast cancer in women of African ancestry. *The Lancet Oncology*, 15(13), e625–e634
15. Chang JC. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. *Medicine (United States)*. 2016.
16. Jacob F, Alam S, Konantz M, Liang CY, Kohler RS, Everest-Dass A V., et al. Transition of mesenchymal and epithelial cancer cells depends on a1-4 galactosyltransferase-mediated glycosphingolipids. *Cancer Res*. 2018;
17. Bozorgi, A; Khazaei, M; Khazaei, MR. New findings on breast cancer stem cells. *Journal of Breast Cancer*.2015;18:303-12.
18. Corcoran C, Rani S, O'Brien K, O'Neill A, Prencipe M, Sheikh R, et al. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. *PloS one*. 2012;7(12):e50999. Epub 2012/12/20.
19. May CD, Sphyris N, Evans KW, Werden SJ, Guo W, Mani SA. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2011;13(1):202. Epub 2011/03/12.

20. Castillo V, Valenzuela R, Huidobro C, Contreras HR, Castellon EA. Functional characteristics of cancer stem cells and their role in drug resistance of prostate cancer. *Int J Oncol.* 2014;45(3):985-94. Epub 2014/07/06.
21. Schultz MJ, Swindall AF, Bellis SL. Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. *Cancer metastasis reviews.* 2012;31(0):501-18.
22. Sottnik JL, Theodorescu D. CD44: A metastasis driver and therapeutic target. *Oncoscience.* 2016;3(11-12):320-1.
23. Mastelić, A., Čikeš Čulić, V., Režić Mužinić, N., Vuica-Ross, M., Barker, D., Leung, E. Y., Markotić, A. (2017). Glycophenotype of breast and prostate cancer stem cells treated with thieno[2,3-*b*]pyridine anticancer compound. *Drug design, development and therapy, 11*, 759–769.
24. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Preceded by: Abbas AK. Cellular and molecular immunology. 8th edition. Saunders. In: Saunders, editor. 2017 [cited 2020 Mar 7]. Available from: [https://books.google.pt/books?id=L4FUDgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.pt/books?id=L4FUDgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
25. Varki ACRD. EJD. FHH. SP. BCR. HGW. EM, E. Essentials of Glycobiology, 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY). 2015.
26. Reynisson J, Court W, O'Neill C, Day J, Patterson L, McDonald E, et al. The identification of novel PLC- $\gamma$  inhibitors using virtual high throughput screening. *Bioorganic Med Chem.* 2009;17(8):3169-76. Epub 2009/03/24
27. Lieberman 1950- M. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach. Basic Med Biochem. 2013;
28. Lattanzio, R., Piantelli, M., & Falasca, M. (2013). Role of phospholipase C in cell invasion and metastasis. *Advances in Biological Regulation, 53*(3), 309–318.

29. Falasca, M. (2010). PI3K/Akt Signalling Pathway Specific Inhibitors: A Novel Strategy to Sensitize Cancer Cells to Anti-Cancer Drugs. *Current Pharmaceutical Design*, 16(12), 1410–1416.
30. Kim MJ, Kim E, Ryu SH, Suh PG. The mechanism of phospholipase C- $\gamma$ 1 regulation. *Exp Mol Med* 2000;32: 101–9.
31. Eurtivong, C., Pilkington, L. I., van Rensburg, M., White, R. M., Brar, H. K., Rees, S., ... Reynisson, J. (2019). Discovery of novel phosphatidylcholine-specific phospholipase C drug-like inhibitors as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 111919.
32. J.B. Park, C.S. Lee, J.H. Jang, J. Ghim, Y.J. Kim, S. You, D. Hwang, P.G. Suh, S.H. Ryu, Phospholipase signalling networks in cancer, *Nat. Rev. Cancer* 12 (2012) 782-792.
33. MDA-MB-231 ATCC® HTB-26™ [Internet]. [cited 2020 Mar 26]. Available from: [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx?geo\\_country=hr#characteristics](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx?geo_country=hr#characteristics)
34. Reynisson J, Jaiswal JK, Barker D, D’mello SAN, Denny WA, Baguley BC, et al. 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(1):1–9.
35. Režić-Mužinić N, Čikeš-Čulić V, Božić J, Tičinović-Kurir T, Salamunić I, Markotić A. Hypercalcemia induces a proinflammatory phenotype in rat leukocytes and endothelial cells. *J Physiol Biochem.* 2013;69,199-205.
36. Leung, E., Hung, J. M., Barker, D., & Reynisson, J. (2014). The effect of a thieno[2,3-b]pyridine PLC- $\gamma$  inhibitor on the proliferation, morphology, migration and cell cycle of breast cancer cells. *Med. Chem. Commun.*, 5(1), 99–106.
37. Sala, G., Dituri, F., Raimondi, C., Previdi, S., Maffucci, T., Mazzoletti, M., ... Falasca, M. (2008). Phospholipase C 1 Is Required for Metastasis Development and Progression. *Cancer Research*, 68(24), 10187–10196.



38. Nakamura Y, Fukami K. Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C. *Journal of Biochemistry*. 2017.
39. Hughes JD, Blagg J, Price DA, Bailey S, DeCrescenzo GA, Devraj R V., et al. Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2008;
40. Hann MM, Kesen GM. Finding the sweet spot: The role of nature and nurture in medicinal chemistry. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012.
41. <https://www.jax.org/strain/002019>.

## **8. SAŽETAK**

**Ciljevi:** Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi antitumorske učinke tretmana matičnih stanica karcinoma dojke novosintetiziranim inhibitorom fosfolipaze spojem tieno [2,3-*b*] piridinom, preciznije, njegovo djelovanje na metastatski biljeg CD15s na MDA-MB-231 staničnoj liniji raka dojke.

**Materijali i metode:** Trostruko negativna stanična linija raka dojke MDA-MB-231 tretirana je 2  $\mu$ M koncentracijom novosintetiziranog tieno-piridinskog spoja (3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno [2,3-*b*] kinolin-2-karboksamid) tijekom 48h, kako bi se utvrdio postotak subpopulacije matičnih stanica raka pozitivnih na biljeg CD15s i na prosječni izražaj CD15s biljega po jednoj matičnoj stanici raka nakon tretmana. Nakon imunobojenja, CD15s+ stanice detektirane su protočnom citometrijom .

**Rezultati:** Tretman novosintetiziranim inhibitorom PLC značajno je smanjio postotak subpopulacije matičnih stanica pozitivnih na biljeg CD15s, ali nije imao utjecaja na prosječni izražaj CD15s biljega po jednoj matičnoj stanici.

**Zaključci:** Zbog utvrđenog smanjenja postotka subpopulacije matičnih stanica trostruko negativnog raka dojke koje na svojoj površini eksprimiraju metastatski biljeg CD15s, novosintetizirani inhibitor fosfolipaze C iz skupine tieno [2,3-*b*] piridina potencijalni je lijek za trostruko negativni karcinom dojke.

## **9. SUMMARY**

**Objectives:** The aim of this study was to determine the effects of treating of breast cancer stem cells with the newly synthesized thieno[2,3-*b*]pyridine anticancer agent, more precisely, focusing on its effect on metastatic marker, CD15 glycoconjugate, expressed on the surface of cancer stem cells.

**Methods:** The MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell line was treated during 48h with a 2  $\mu$ M newly developed thienopyridine anticancer compound (3-amino-5-oxo-N-naphthyl-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-*b*]quinoline-2-carboxamide) to determine its effect on percentage of subpopulation of breast cancer stem cells that express CD15s and on the mean expression of CD15s on an individual breast cancer stem cells. Flow cytometric analysis was performed after immunostaining.

**Results:** PLC inhibitor has significantly decreased the percent of breast cancer stem cells positive for CD15s, but it was without effect upon mean expression of CD15s on an individual breast cancer stem cell.

**Conclusion:** Due to its decreasing effect upon the percentage of triple negative breast cancer stem cells that are positive for the metastatic glycoconjugate CD15s, the investigated PLC inhibitor can be a potential drug for triple-negative breast cancer treatment.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**OSOBNI PODACI:**

Ime i prezime: Petra Đilas

Adresa stanovanja: ulica 31, broj 6, 20271 Blato

Telefon: +38591 597 0572

E-mail: [petra.dilas@hotmail.com](mailto:petra.dilas@hotmail.com)

Državljanstvo: hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 01.08.1996., Dubrovnik, RH

**OBRAZOVANJE:**

2003.-2011. Osnovna škola "Blato", Blato

2011.-2015. Srednja škola "Blato", Opća gimnazija, Blato

2015.-2020. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer-Farmacija (integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij)

**STRUČNO OSPOSOBLJAVANJE:**

25. veljače- 18. rujna 2020.

Stručno osposobljavanje, Ljekarne Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Marjan

**POSEBNE VJEŠTINE:**

Strani jezici: engleski i talijanski

Rad na računalu: MS Office