

Izražaj glikokonjugata na stanicama karcinoma dojke nakon tretmana tienopiridinskim derivatom

Gabrilo, Paula

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:171:786117>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



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

PAULA GABRILO

**IZRAŽAJ GLIKOKONJUGATA NA STANICAMA KARCINOMA
DOJKE NAKON TRETMANA TIENOPIRIDINSKIM
DERIVATOM**

DIPLOMSKI RAD

**Akadska godina:
2021./2022.**

Mentor: prof. dr. sc. Anita Markotić

Split, prosinac 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: prof. dr. sc. Anita Markotić
Pomoć pri izradi: prof. dr. sc. Anita Markotić

Izražaj glikokonjugata na stanicama karcinoma dojke nakon tretmana tienopiridinskim derivatom

Paula Gabrilo, broj indeksa 174

Naslov rada: Izražaj glikokonjugata na stanicama karcinoma dojke nakon tretmana tienopiridinskim derivatom
Cilj istraživanja: Cilj istraživanja bio je utvrditi učinak primjene inhibitora fosfolipaze C iz skupine tieno[2,3-*b*] piridina na postotak epitelno mezenhimalnih CD44+CD24+, epitelnih CD44-CD24+ i luminalno epitelnih CD44-CD24- stanica pozitivnih na glikokonjugat GM3(NeuAc) te prosječni izražaj GM3(NeuAc) po jednoj stanici za svaku od navedenih subpopulacija trostruko negativnog karcinoma dojke.

Materijali i metode: Stanice MDA-MB-231 linije kultivirane su tijekom 48h na četiri načina: bez dodatka inhibitora i/ ili paklitaksela, te uz dodatak samog inhibitora, samog paklitaksela ili njihove kombinacije. Metodom protočne citometrije izmjerena je fluorescencija suspenzija stanica imunobojenih protutijelima na CD44, CD24 i GM3(NeuAc) te analiziran postotak pojedine stanične subpopulacije kao i izražaj GM3(NeuAc).

Rezultati: Inhibitor fosfolipaze je doveo do porasta postotka i izražaja GM3(NeuAc) u CD44+CD24+ te postotka u CD44-CD24- staničnoj subpopulaciji. Samo kod CD44+CD24+ subpopulacije, zapažen je povećani prosječni izražaj GM3(NeuAc) po jednoj stanici. Kombinirani tretman s paklitakselom još je učinkovitije povećao postotak GM3(NeuAc) na svim subpopulacijama.

Zaključci: GM3(NeuAc) glikokonjugat pripada klasi kiselih glikosfingolipida te je opisan kao inhibitor prijenosa signala putem receptora za faktor rasta fibroblasta. Budući da inhibitor fosfolipaze iz ovog istraživanja dovodi do porasta postotka i izražaja GM3(NeuAc) u određenim subpopulacijama, zaslužuje daljnja *in vitro* i *in vivo* istraživanja kaomogućući antitumorski agens.

Ključne riječi: trostruko negativni rak dojke, tienopiridinski derivat, glikokonjugat GM3

Rad sadrži: 62 stranice, 1 tablicu, 16 slika i 45 referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva: 1. doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić
2. prof. dr. sc. u trajnom zvanju Tatijana Zemunik
3. prof. dr. sc. Anita Markotić

Datum obrane: 02.12.2021.

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 Tehnology, session no. 8 and Faculty Council of School of Medicine, session no.5
Mentor: Full prof. Anita Markotić, PhD
Technical assistnace: Full prof. Anita Markotić, PhD

Glycoconjugate expression in breast cancer cells after treatment with thienopyridine derivative

Paula Gabrilo, indeks number 174

Diploma thesis title: Glycoconjugate expression in breast cancer cells after treatment with thienopyridine derivative

Objectives: The aim of the study was to determine the effect of phospholipase C inhibitors from the thieno [2,3-*b*] pyridine group on the percentage of epithelial mesenchymal CD44+CD24+, epithelial CD44-CD24+ and luminal epithelial CD44-CD24-cells positive for GM3(NeuAc) glycoconjugate and the average expression of GM3(NeuAc) per cell for each of these subpopulations of triple-negative breast cancer.

Materials and methods: Cells of the MDA-MB-231 line were cultured for 48 h in four ways: without the addition of inhibitors and/or paclitaxel, and with the addition of the inhibitor alone, paclitaxel alone, or a combination with both of these. Flow fluorescence of antibody-stained cell suspensions to CD44, CD24 and GM3(NeuAc) was measured by flow cytometry and the percentage of each cell subpopulation as well as the expression of GM3 (NeuAc) were analyzed.

Results: The phospholipase inhibitor led to an increase in the percentage and expression of GM3(NeuAc) in CD44+CD24+ and the percentage in the CD44-CD24-cell subpopulation. Only in the CD44+CD24+ subpopulation, an increased average expression of GM3(NeuAc) per cell was observed. Combination treatment with paclitaxel increased the percentage of GM3(NeuAc) even more effectively in all subpopulations.

Conclusions: GM3(NeuAc) glycoconjugate belongs to the class of acidic glycosphingolipids and has been described as an inhibitor of signal transduction via fibroblast growth factor receptors. Because the phospholipase inhibitor from this study leads to an increase in the percentage and expression of GM3(NeuAc) in certain subpopulations, it deserves further in vitro and in vivo studies as a possible antitumor agent

Keywords: triple-negative breast cancer, glycoconjugates, thienopyridine derivate, GM3

Thesis contain: 62 pages, 1 table, 16 figures and 45 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Assistant prof. Nikolina Režić Mužinić, PhD
2. Full prof. in permanent position Tatjana Zemunik, MD, PhD
3. Full prof. Anita Markotić, PhD

Defence date: 02.12.2021.

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

Zahvala

Veliko hvala profesorici i mentorici Aniti Markotić na svim savjetima, uloženom trudu te strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada!

Zahvaljujem mojim roditeljima i sestri na potpori i svojoj pruženoj ljubavi. Hvala im što su mi bili oslonac tijekom svih pet godina studija, bez njih to ne bi bilo moguće!

Za kraj, hvala mojim kolegama i prijateljima što su mi uljepšali i olakšali studentske dane te ostavili sjećanja koja ću pamtiti tijekom cijelog života!

POPIS KRATICA:

- AJCC: od engl. *American Joint Commission on Cancer Staging and Results Reporting*
- AKT: gen koji kodira RAC- γ serin/treonin-protein kinazu
- ATP: od engl. *adenosine triphosphate*; adenzin trifosfat
- BL1 I 2: od engl. *basal like*; rak dojke bazalnog tipa
- BRCA 1: tumor supresorski gen
- CNS: od engl. *central nervous system*; središnji živčani sustav
- CSC: od engl. *cancer stem cell*; matična stanica raka
- CMPNeu5Ac: od engl. *cytidine-5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid*; citidin-5'-monofosfo-N-acetilneuraminska kiselina
- DAG: diacil glicerol
- DMEM: od engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, medij za uzgoj stanica
- DMSO: od engl. *dimethyl sulfoxide*; dimetil sulfoksid
- DNA: deoksiribonukleinska kiselina
- EGF: od engl. *epidermal growth factor*; epidermalni faktor rasta
- ER: od engl. *estrogen receptor*; receptor za estrogen
- ERBB2: HER2 (receptor za humani epidermalni faktor)
- FBS: od engl. *fetal bovine serum*; fetalni goveđi serum
- FGF: od engl. *fibroblast growth factor*; faktor rasta fibroblasta
- GM3: engl. *monosialodihexosyl ganglioside*; monosijalodihexozilgangliozid, vrsta gangliozida s jednom sijalinskom kiselinom i dvije heksoze
- GMI: od engl. *geometric mean fluorescence intensity*; geometrijski srednji intenzitet fluorescencije
- GPI: od engl. *glycosylphosphatidylinositol*; glikozilfosfatidil-inozitol
- GSL: glikosfingolipidi
- HER2/neu: od eng. *human epidermal growth factor receptor 2*; receptor za humani epidermalni faktor rasta

- IHC: od engl. *immunohistochemistry*; imunohistokemija
- IM: imunomodulatorni tip raka dojke
- IP3: od engl. *inositol trisphosphate*, inozitol trifosfat
- Ki67: proliferacijski indeks
- LAR: luminalno androgeni receptor
- MAPK: mitogenom aktivirana protein kinaza
- mTOR: od engl. *the mammalian target of rapamycin*; meta rapamicina kod sisavaca
- Neu5Ac: od engl. *N-Acetylneuraminic acid*; N-acetilneuraminska kiselina
- Neu5Gc: od engl. *N-Glycolylneuraminic acid*; N-acetilglikolineuraminska kiselina
- NST: od engl. *not special type*; ne-specijalni tip
- P53: tumorsupresorski protein nazvan po molekulskoj masi od 53 kDa
- PARP: od engl. *poly (ADP-ribose) polymerase*; poli(ADP-riboza) polimeraza
- Pcr: od engl. *pathological complete response*; kompletan patološki odgovor
- PD-L1: od eng. *programmed death-ligand 1*
- PI3K/Akt: od engl. *phosphoinositide 3-kinases*; fosfoinozimid-3-kinaza
- PIP2: od engl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*; fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat
- PLC: eng. *phospholipase C*; fosfolipaza C
- PR: progesteronski receptor
- TNBC: od eng. *triple-negative breast cancer*; trostruko negativni rak dojke
- TNM: T-veličina primarnog tumora, N-proširenost u regionalne limfne čvorove, M-metastaze
- VEGF: od engl. *vascular endothelial growth factor*; faktor rasta vaskularnog endotela
- VHTS: od engl. *virtual high throughput screen*, probir na osnovu računalnog modeliranja

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Stanična razina tumora.....	2
1.2. Ključna obilježja raka.....	4
1.3. Klasifikacija tumora.....	5
1.4. Incidencija tumora.....	6
1.5. Karcinom dojke.....	8
1.5.1 Epidemiologija i etiologija.....	8
1.5.2 Klasifikacija po histološkom nalazu i stupnju proširenosti.....	11
1.5.3 Molekularni subtipovi karcinoma dojke.....	15
1.5.4 Simptomi i dijagnostika karcinoma dojke.....	17
1.5.5 Liječenje s naglaskom na trostruko negativni karcinom dojke.....	18
1.6. Građa i uloga GM3 gangliozida.....	21
1.7. Izražaj CD44 i CD24 na stanicama raka dojke.....	22
2. CILJ I HIPOTEZA.....	24
2.1. Ciljevi istraživanja.....	25
2.2. Hipoteze istraživanja.....	25
3. MATERIJALI I METODE.....	26
3.1. Stanična linija trostruko negativnog karcinoma dojke.....	27
3.2. Novosintetizirani inhibitor.....	27
3.3. Ustroj istraživanja.....	28
3.4. Tretiranje stanica inhibitorom i imunobojenje.....	29
3.5. Analiza izmjerenih fluorescencija s ciljem detekcije pojedinih subpopulacija s biljekom GM3(NeuAc).....	29
3.6. Statistička analiza rezultata.....	31
4. REZULTATI.....	32
4.1. Djelovanje inhibitora na postotak i prosječni izražaj GM3(NeuAc) na CD44+CD24+ subpopulaciji.....	33
4.2. Djelovanje inhibitora na postotak i prosječni izražaj GM3(NeuAc) na CD44-CD24+ subpopulaciji.....	34
4.3. Djelovanje inhibitora na postotak i prosječni izražaj GM3(NeuAc) na CD44-CD24- subpopulaciji.....	36
5. RASPRAVA.....	39
6. ZAKLJUČCI.....	42

7.	CITIRANA LITERATURA.....	44
8.	SAŽETAK.....	49
9.	SUMMARY	51
10.	ŽIVOTOPIS.....	53

1. UVOD

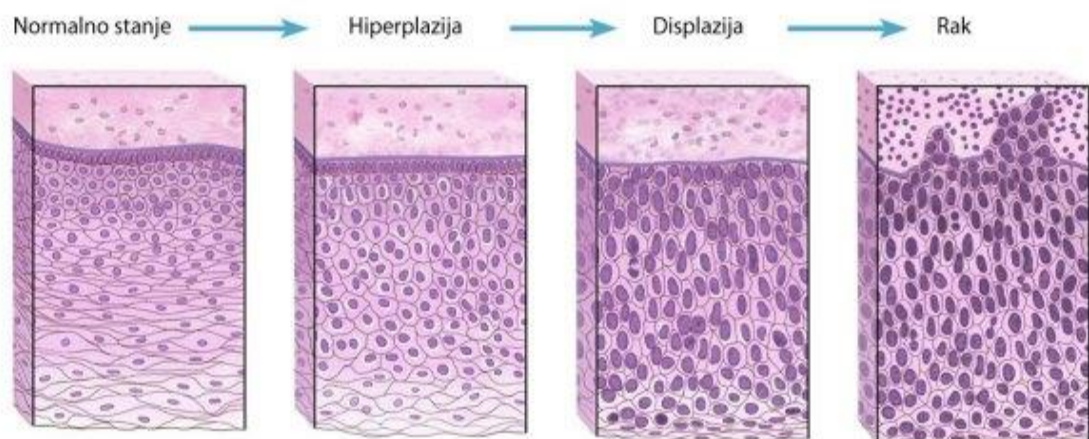
1.1. Stanična razina tumora

Pojam tumor označava patološku tvorbu koja nastaje kao posljedica prekomjerne proliferacije abnormalnih stanica. Još se naziva i neoplazmom (1). Rast tumora nadmašuje i nije usklađen s rastom normalnih tkiva, a nastavlja rasti u prekomjernom obliku i nakon što je uklonjen uzrok te promjene. Monoklonalnog je podrijetla, što znači da nastaje zloćudnom transformacijom samo jedne zdrave stanice. Posljedica je nakupljanja mutacija u genima za rast, diferencijaciju i staničnu smrt koje stanicama raka omogućuju konstantnu proliferaciju i zaobilazanje kontrolnih mehanizama poput programirane stanične smrti. Budući da su promjene koje su odgovorne za zloćudnu pretvorbu stanica uglavnom genske mutacije, možemo reći da je rak u osnovi genska bolest (2).

Mutacije koje se odvijaju u stanicama možemo podijeliti na usputne i pokretačke. Usputne u osnovi nisu značajno bitne za nastanak i progresiju raka. One su posljedica genomske nestabilnosti, čime se povećava stopa vjerojatnosti da će se u istoj stanici raka dogoditi više različitih mutacija u ključnim onkogenima i tumorsupresorskim genima. Suprotno njima, od velike važnosti su pokretačke mutacije koje su funkcionalno i uzročno povezane s nastankom raka. U te mutacije spadaju onkogeni koje možemo definirati kao promijenjenu inačicu normalnih staničnih gena, protoonkogeni. Promjene kojima nastaju onkogeni najčešće imaju dominantan učinak jer je potrebna promjena u samo jednom alelu da bi se očitovao njegov učinak. Oni često kodiraju proteine koji se od normalnih razlikuju po građi i funkciji. Najčešći onkogeni proteini su polipeptidni čimbenici rasta, receptori za čimbenike rasta, unutarstanični signalni proteini, transkripcijski čimbenici i regulator staničnog ciklusa, ciklin D1. Do aktivacije onkogeni može doći zbog mutacija u samom genu, također kao posljedica genske amplifikacije tj. povećanja broja kopija gena, primjerice *HER2/neu* kod raka dojke, te kao posljedica kromosomske translokacije.

Za razliku od onkogeni čija aktivnost dovodi do nastanka raka, postoje i tumorsupresorski geni, geni kod kojih gubitak funkcije ili njihova inaktivacija dovodi do karcinogeneze. Kod ovih gena je nužna inaktivaciju obaju alela da bi ispoljio svoj učinak. Od iznimnog je značaja tumorsupresorski gen *p53*, čije mutacije pridonose kod otprilike 50% svih slučajeva raka i čine ga najčešćom metom genetskih promjena u ljudskim malignomima. Produkt gena je transkripcijski čimbenik *p53*, a aktivira se zbog oštećenja stanične DNA ili drugih poremećaja, potiče apoptozu stanice te zaustavlja stanicu u određenoj fazi staničnog ciklusa. Njegovom inaktivacijom ili promjenom, u diobu ulaze i stanice s oštećenom DNA i samim time povećavaju vjerojatnost nastanka raka (2,3).

Na staničnoj razini nastanak raka možemo promatrati kao proces koji se sastoji od mutacije i selekcije stanica sa sve izraženijim mogućnostima proliferacije, preživljavanja i progresije. Prvi korak je inicijacija, gdje genetička promjena dovodi do proliferacije jedne jedine stanice. Potom se nastavlja progresija tumora nakupljanjem dodatnih mutacija u populaciji stanica. Neke od njih rezultiraju bržim rastom, dovode do selektivne prednosti stanice i njezini potomci s vremenom postaju dominantna populacija u tumoru. Takav proces se naziva klonska selekcija. Budući da nastanku raka doprinosi neograničen broj dioba i od iznimne je važnosti, stanice raka imaju aktivan enzim telomerazu koji produljuje telomere na krajevima kromosoma. Kod normalnih se stanica krajevi kromosoma, telomere, tijekom svake stanične diobe pomalo skrate te kad jednom dosegnu graničnu dužinu, onemogućuju daljnu diobu stanice (2,3). Stanice raka uspješno izbjegnu takav mehanizam. Danas se smatra kako telomeraze imaju ulogu i u drugim načinima stvaranja malignog fenotipa tumorske stanice (Wnt signalni put, poticanje proliferacije stanica, sprječavanje apoptoze) (1).



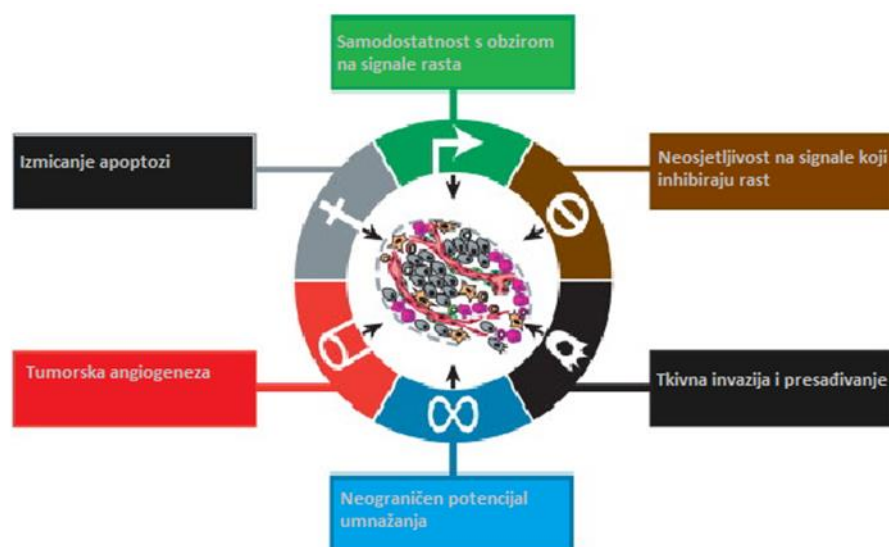
Slika 1. Prikaz stadija razvoja tumora.

Preuzeto sa: <https://www.onkologija.hr/sto-je-rak/>

Datum pristupa: 28.10.2021.

1.2. Ključna obilježja raka

Svaki rak se razlikuje od zdravog tkiva u nekoliko ključnih obilježja koja su zajednička svim tipovima raka; stalni poticaj na staničnu proliferaciju, izbjegavanje usporavanja proliferacije, izbjegavanje apoptoze, gubitak ograničenja proliferacije, razvoj novog krvotoka (angiogeneza), invazija, metastaziranje i kolonizacija udaljenih organa (Slika 2). Dodatne dvije karakteristike obuhvaćaju promjene u staničnom energetskom metabolizmu i izbjegavanje imunskog odgovora (1,2).



Slika 2. Prikaz zajedničkih obilježja svih tipova raka (modificirano prema: Hanahan D i Weinberg RA,2011).

Vjerojatno je najbitnije svojstvo stanica raka njihova mogućnost održavanja kronične proliferacije. Normalno tkivo kontrolira proizvodnju i otpuštanje signala koji potiču rast i napredovanje kroz ciklus rasta i diobe stanice te tako održava vlastitu homeostazu i normalnu funkciju. Poremećajem ovih signala, tumori postaju oni koji kroje svoju sudbinu. Stanice raka mogu steći sposobnost održavanja proliferacije u nekoliko različitih načina: mogu proizvesti same faktore rasta što rezultira autokrinom stimulacijom, a isto tako stanice raka mogu slati signale za rast normalnih stanica koje će uzvratiti čimbenicima rasta za opskrbu stanica raka (4). Istraživanja su pokazala da u dvodimenzijskoj kulturi kontakti stanica-stanica, nastali

unutar populacije normalnih stanica, dovode do suzbijanja daljnje proliferacije, migracija prestane i stanice adheriraju jedna na drugu stvarajući uredan sloj. Za razliku od toga, karakteristika stanica raka je neosjetljivost na ovaj fenomen zvan dodirna inhibicija rasta (3,4).

Bez vlastitog sustava prokrvljenosti tumor može rasti do promjera od otprilike 0,2 mm što mu omogućuje opskrba hranjivim tvarima i kisikom putem difuzije. Kako bi rasli izvan minimalne veličine i metastazirali, tumori moraju potaknuti rast novih krvnih žila (angiogenezu). Rast je induciran aktivacijom čimbenika angiogeneze ili smanjenjem inhibitora angiogeneze. Kao jedan od glavnih faktora angiogeneze tumora koji potiče rast, invaziju i metastaze, je vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*) (2,5). Angiogeneza je iznimno složen proces koji uključuje ekstravazaciju plazma proteina, razgradnju izvanstaničnog matriksa, migraciju i proliferaciju endotelnih stanica te formiranje kapilara (5). Stvaranje novih krvnih žila nije važno samo za rast tumora već i za proces metastaziranja. Kapilare omogućuju ulazak tumorskih stanica u krvožilni sustav s posljedičnom invazijom tumora. Da bi stanice raka dospjele u krvotok, moraju najprije napustiti vlastiti tkivni odjeljak i prijeći bazalnu membranu. To je upravo obilježje koje ih razlikuje od benignih proliferativnih bolesti (2).

Tumorske stanice imaju drugačije metaboličke potrebe od normalnih stanica. I u standardnim uvjetima preferiraju anaerobni metabolički put koji ATP dobiva putem glikolize, umjesto uobičajenog aerobnog puta oksidativne fosforilacije. Upravo zato troše više glukoze, no lakše podnose nepovoljne metaboličke uvjete kao što je hipoksija (1).

1.3. Klasifikacija tumora

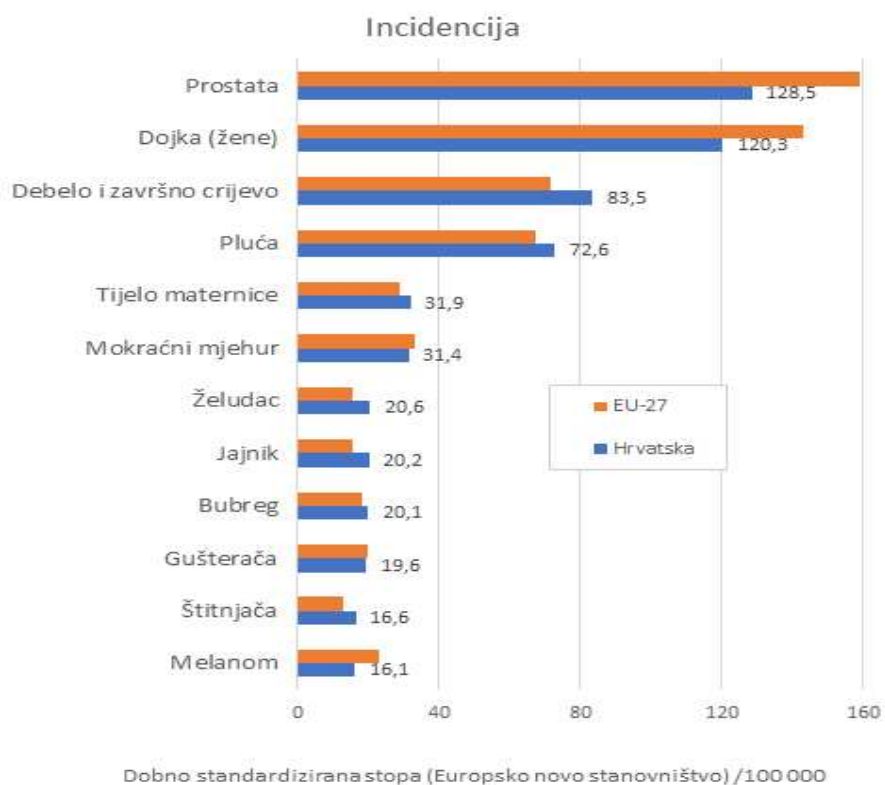
Najvažnije u patologiji raka je razlikovati benigne od malignih tumora. Benigni rastu polagano, njihov rast je ograničen na organ u kojem je nastao, a ne šire se u susjedna tkiva niti udaljene dijelove tijela. Nakon potpunog uklanjanja ne recidivira, pa takvi tumori većinom imaju i više nego dobru prognozu. Na mikroskopskom prikazu relativno su male jezgre, pravilna oblika. Naprotiv, zloćudni tumori rastu mnogo brže i u stanju su proširiti se na susjedna tkiva i čitavo tijelo preko krvotoka. Rast im je infiltrativan, pri čemu razaraju normalno tkivo primarnog organa nastanka. Ne mogu se u cijelosti ukloniti pa često recidiviraju nakon operacije te im je značajno lošija prognoza. Mikroskopski su to atipične stanice pleomorfne jezgre, tj. razlikuju se jedna od druge po obliku i veličini (1).

I benigni i maligni tumori klasificiraju se prema vrsti stanica ili tkiva iz kojih se pojedini tumor razvio. Prema toj raspodjeli histogenetski ih možemo svrstati u nekoliko većih skupina kao što su :

- a) Epitelni tumori
- b) Mezenhimalni tumori (iz vezivnog tkiva, kostiju, mišićja)
- c) Tumori limfocita i hematopoetskih stanica (iz matičnih stanica koštane srži)
- d) Neuralni tumori (iz prekursora živčanih stanica; neuroblastoma)
- e) Tumori potpornih stanica živčanog podrijetla (glijalne stanice CNS-a, moždane ovojnice, periferni živci)
- f) Tumori spolnih stanica (1)

1.4. Incidencija tumora

Rak je jedan od vodećih zdravstvenih problema, nakon kardiovaskularnih bolesti, te se procjenjuje da će se do 2030. godine teret raka povećati za 25%. Kod osoba mlađih od 65 godina najčešći je uzrok smrti te uzrokuje 40% svih smrti u toj dobi (6). Incidencija raka u Hrvatskoj i EU-27 u 2020. godini prikazana je na Slici 3.



Slika 3. Incidencija raka u Hrvatskoj i EU-27 u 2020. godini. Preuzeto sa: Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija i mortalitet od raka u EU-27 zemljama za 2020. godinu.

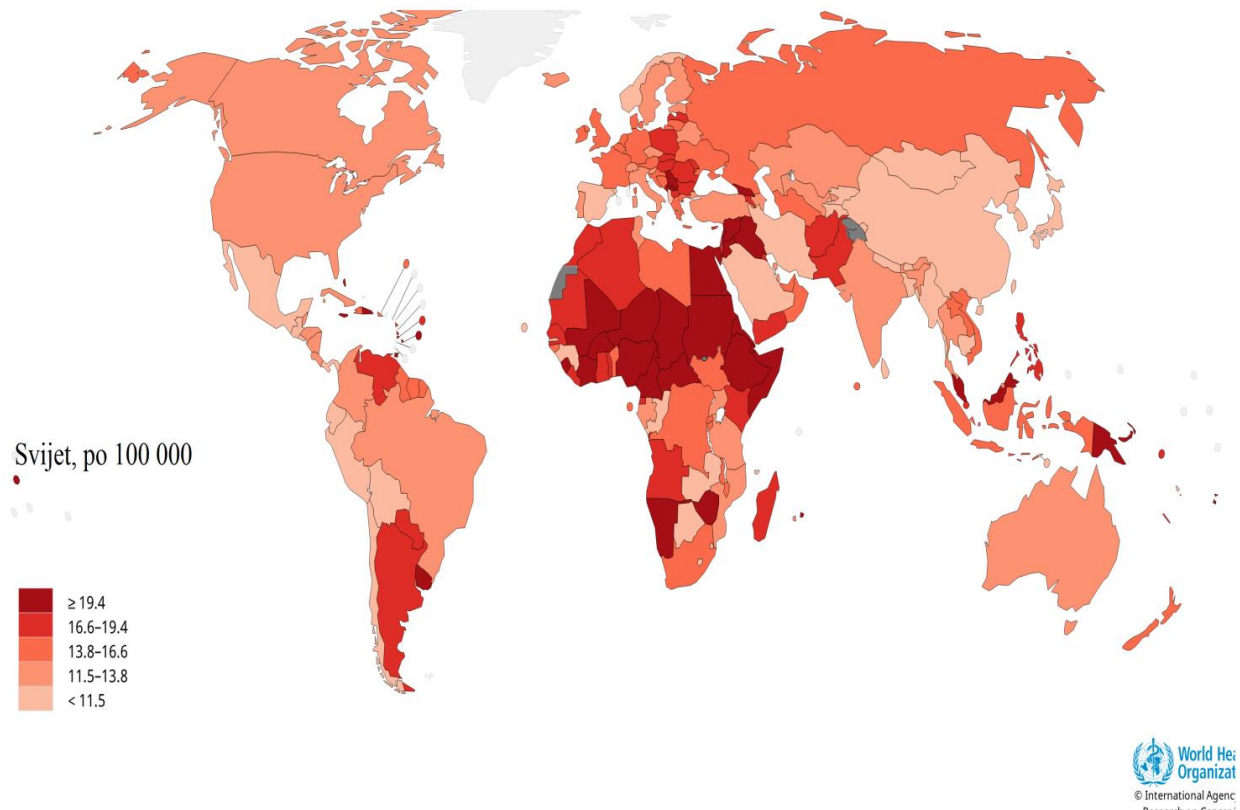
1.5. Karcinom dojke

1.5.1 Epidemiologija i etiologija

Rak dojke jedan je od najčešćih uzroka smrti među tumorima koji pogađaju žene diljem svijeta. Stope smrtnosti se razlikuju u svijetu, no povećavaju se u regijama koje su donedavno imale niske stope bolesti (8). Dostupni podaci sugeriraju da incidencija i smrtnost u zemljama s visokim resursima opadaju, dok se incidencija i smrtnost u zemljama s niskim resursima povećavaju. Ovaj obrazac vjerojatno je posljedica promjene profila čimbenika rizika i razlika u pristupu ranom otkrivanju i liječenju raka dojke (9). U cijelom svijetu važan je uzrok prerane smrtnosti među ženama (7). Čini gotovo 25% tumora u žena i uzrokuje oko 15% smrti zbog raka. Svaka će deveta žena dobiti rak dojke tokom svog života (2). Predstavlja veliki problem javnog zdravstva zbog visokih stopa morbiditeta i mortaliteta, a izvješće EUROSTAT-a pokazuje da je 2015. godine rak dojke činio 1,8% svih smrtnih slučajeva u EU i 3,6% smrti žena (24). Tijekom 25-ogodišnjeg istraživanja, u periodu od 1990. do 2015. godine, Azamjah i suradnici dobili su podatke koji nam pokazuju uzlaznu putanju za Latinsku Ameriku i Karibe s najvećim trendom rasta stope smrtnosti u navedenom razdoblju. Subsaharska Afrika pokazuje blagi pad od 1990. do 1995., dok je tijekom 1995. do 2010. vidljiv beznačajan, ali stalan porast, i sa značajnim povećanjem za 2015. godinu. Za regije s visokim prihodom vidljivo je smanjenje za 2015. godinu (26). Slično je vidljivo na Slici 4. , takav se trend nastavlja i za 2020.godinu.

Smrtnost od raka dojke pomalo se promijenila od 1930-ih do 1970-ih. Poboljšanja u preživljavanju započela su 1980-ih u zemljama s programima ranog otkrivanja, u kombinaciji s različitim načinima liječenja za ovu invazivnu bolest. Preživljavanje raka dojke najmanje 5 godina nakon dijagnoze kreće se od više od 90% u zemljama s visokim dohotkom, do 66% u Indiji i 40% u Južnoj Africi. Rano otkrivanje i liječenje pokazalo se uspješnim u zemljama s visokim dohotkom i trebalo bi se primijeniti u zemljama s ograničenim resursima gdje su dostupni neki od standardnih alata (25). Zato se primjerice incidencija značajno razlikuje od mortaliteta. To je posebice vidljivo na primjeru Afričkih zemalja. Ističu su po visokim stopama smrtnosti od raka dojke, unatoč izričito niskim stopama incidencije (27). Veliki je naglasak na preporuke ranih dijagnostičkih testova, pa tako studije navode smanjenje smrtnosti od 15% do 40% kao posljedice probira, međutim, postoji i zabrinutost oko štetnosti, kao što su pretjerana dijagnoza (5%-54%) i pretjerano liječenje koje dovodi do dugotrajnih komplikacija i lažno negativnih rezultata (6%-46%) (23).

Procijenjena dob- stopa smrtnosti u svijetu u 2020. godini za dojku



Slika 4. Prikaz stope smrtnosti od raka dojke u korelaciji s dobi svjetskog stanovništva za 2020. godinu, Preuzeto sa: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&population_s=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=globe&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&show_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D
D Datum pristupa: 27.10.2021.

Ako govorimo o podacima za rak dojke u žena u RH, prema procjenama Europske komisije, podaci su povoljniji u odnosu na podatke o ukupnom raku. U usporedbi s drugim zemljama, Hrvatska je po ukupnoj smrtnosti od raka dojke kod žena ispod prosjeka EU-27 (16. mjesto). Prema posljednjim objavljenim podacima u Hrvatskoj u 2018. godini zabilježeno je 2845 slučajeva raka dojke (stopa 134,7/100.000), a od ove zloćudne bolesti umrle su u 2020.

godini 722 žene (stopa 34,7/100.000). Petu godinu zaredom, u Republici Hrvatskoj bilježimo pad mortaliteta od raka dojke (25%), što je upravo i cilj nacionalnog programa za rano otkrivanje bolesti. Kod žena ciljne skupine, a koje su se odazvale u Nacionalni program, većina slučajeva raka dojke, njih 51-60%, dijagnosticirano je u lokaliziranom stadiju, kod 22-28% žena bolest je bila regionalno proširena u trenutku dijagnoze, do 2% dijagnosticirano je s udaljenim metastazama i do 19% stadij prilikom dijagnoze nije prijavljen (28).

Epidemiološke studije značajno su pridonijele trenutnom poznavanju okolišnih i genetskih čimbenika rizika raka dojke. Među mnogim čimbenicima koji su utvrđeni, velik dio njih je povezan s estrogenom. Estradiol stimulira mitozu epitelnih stanica dojke te ovaj mitogeni učinak može biti povećan i progesteronom. Ostali čimbenici uključuju rasnu i etničku pripadnost, obiteljsku povijest raka, genetske osobitosti, kao i izloženost određenim faktorima, primjerice izloženost pretjeranoj konzumaciji alkohola i egzogenim hormonima te nedovoljna tjelesna aktivnost (7).

Mlađa dob u menarhi te starija dob u prvoj trudnoći mogu utjecati na rizik raka dojke kroz dugotrajne učinke na razinu spolnih hormona. Što je dulja izloženost hormonu estrogenu tijekom života, rizik se povećava (7). Za svaku godinu kašnjenja menarhe rizik se smanjuje za otprilike 5%. Kod prvog poroda situacija je obrnuta. Naime, rizik se povećava sa što kasnijom dobi prvog rađanja žene. U meta-analizi koju su proveli Ewertz i suradnici u Nordijskim zemljama, žene koje su prvi porod imale u ranim 20-ima su imale 30% manji rizik za rak dojke za razliku od žena čiji je prvi porod bio nakon 35. godine. Isto tako korisnice kombiniranih oralnih kontraceptiva imaju lagano povećan rizik, međutim nakon prestanka upotrebe, 10 godina ili više, nije vidljivo povećanje rizika. S druge strane dojenje djeteta ima zaštitni učinak te smanjuje rizik razvoja. Žene koje su dojile 25 mjeseci i više, imaju 33% manji rizik od žena koje nikad nisu dojile. Također veći broj poroda, 5 ili više doprinosi smanjenju rizika razvoja na pola s obzirom na žene nerotkinje (8). Mutacije u tumor supresorskim genima BRCA1 i BRCA2 iznimno su povezane s rizikom razvoja raka dojke do 70. godine života. Preživljavanje ovisi o stadiju i molekularnom podtipu. Određene studije preporučuju identifikaciju žena s rizikom mutacije BRCA1 i BRCA2 uz upućivanje na genetsko testiranje. Životni stil također ima značajnu ulogu u razvoju zloćudnih promjena dojke. Dokazano je kako su pretilost, sjedilački način života i manjak tjelesne aktivnosti te učestalo konzumiranje hrane bogate nezdravim masnoćama i prerađenim ugljikohidratima povezani s povećanim rizikom za razvoj karcinoma dojke. Pušenje i konzumacija alkohola također su dokazani čimbenici rizika. Sve više istraživanja pokazuje važnu povezanost prehrane i zloćudnih tumora dojke (9,10).

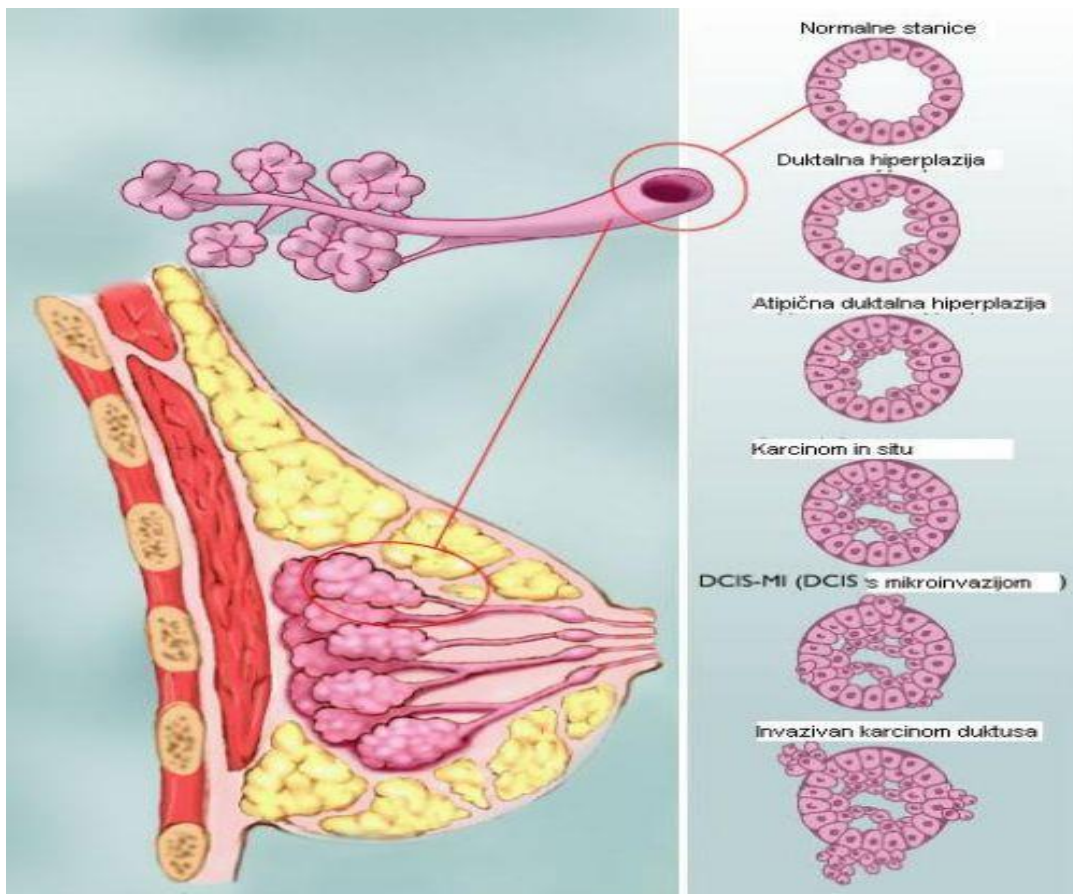
1.5.2 Klasifikacija po histološkom nalazu i stupnju proširenosti

Početak prošlog stoljeća bilo je dovoljno saznanje da je pacijentica oboljela od raka dojke da bi na sve oboljele žene bio primijenjen jednak tretman i isti princip terapije. Tijekom vremena opaženo je da bolesnici s istom vrstom raka imaju različite prognoze i ishode liječenja, te je identificiranje sve većeg broja različitih morfološki varijanti dovelo do rasprave o klasifikaciji raka dojke i samog saznanja kako je svaka abnormalna tvorevina priča za sebe. U današnjici se rak dojke definira kao heterogena bolest s različitim histološkim i biološkim svojstvima zbog genetskih, epigenetskih i transkriptomnih promjena, s različitim kliničkim nalazima i odgovorima na liječenje te s više entiteta. Ova fenotipska razlika utječe na dijagnozu raka dojke, liječenje, a samim time i na prognozu bolesti. S napretkom molekularnih tehnika, kao što je profiliranje ekspresije gena, heterogenost raka dojke je opće prihvaćena. Primjenom klasifikacije postaju moguće ciljane terapije za svaku osobu te individualizirani programi liječenja (11).

Rak dojke se najčešće razvija iz epitela terminalnih duktulo – lobularnih jedinica žljezdanog parenhima - iz žljezdanog parenhima dojke, izvodnih kanalića (njega nazivamo duktalni rak) ili žljezdanih lobula (lobularni rak) (2). Stanice raka koje ostaju unutar bazalne membrane klasificiramo kao *in situ* ili neinvazivan karcinom, a invazivan je onaj u kojem postoji širenje stanica raka izvan bazalne membrane kanala i lobula u okolno susjedno, normalno tkivo. Najčešća podjela invazivnih je na duktalne i lobularne.

Nespecificirani invazivni duktalni karcinom (NST, engl. *not special type*) čini preko 80% svih invazivnih karcinoma dojke. Nastaje u mliječnim kanalićima, potom se širi u okolno tkivo dojke, a tijekom vremena se može proširiti na limfne čvorove i udaljene dijelove tijela. Nema izraženih značajki, pa ga ne možemo svrstati u određenu kategoriju.

Oko 10% opada na invazivni lobularni koji nastaje u mliječnim žlijezdama i širi se na ostatak dojke (10,12). Rjeđe se dijagnosticiraju neki specifični histološki podtipovi raka, primjerice: tubularni, metaplastični, mucinozni, papilarni, mikropapilarni, medularni (2). Ova klasifikacija je bitna budući da tumori specifične vrste imaju bolju prognozu za razliku od nespecificiranog tipa (12).



Slika 5. Prikaz promjena stanica.

Preuzeto sa : <https://www.zdravi-grad-porec.hr/strucne-teme/rano-otkrivanje-raka-dojke/> Datum pristupa: 27.10.2021.

Američki odbor za rak (AJCC) donosi dvije glavne skupine za stadije raka dojke: anatomsku, koja se definira veličinom tumora (T), statusom limfnih čvorova (N) i udaljenim metastazama (M); i prognostičku, koja uključuje TNM i status biomarkera tj. estrogenskog (ER), progesteronskog (PR) i receptora humanog epidermalnog faktora rasta (HER-2) (20). Stadij tumora pomaže liječniku da odredi liječenje koje određeni pacijent treba. Liječenje također ovisi o tipu raka tj. vrsti stanica iz kojih je nastao, lokalizaciji, ostalim zdravstvenim stanjima pacijenta te izražaju receptora (21). Kao što je vidljivo i u tablici 1., na temelju veličine tumora svrstavamo ga u određenu kategoriju, pa tako T1 označava tvorbu od 2 cm ili manje, T2 između 2 i 5 cm, T3 veći od 5 cm i T4 veličina koja se proširila sve do zida prsnog koša ili kože. Najčešće metastaze (M) su na mozak, pluća, jetra i kosti (21).

Tablica 1. TNM klasifikacija raka dojke i pridruženi stadiji

Preuzeto iz Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Klinička onkologija,3., obnovljeno i dopunjeno izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2018. str 207-208.

Tis (DCIS)	Duktalni karcinom <i>in situ</i>
Tis (Paget)	Pageova bolest bradavice nepovezana s invazivnim karcinomom i/ili DCIS u podležećem parenhimu
T1	Tumor ≤ 20 mm u najvećem promjeru
T1mi	Tumor ≤ 1 mm u najvećem promjeru
T1a	Tumor > 1 mm, ali ≤ 5 mm u najvećem promjeru
T1b	Tumor >5 mm, ali ≤ 10 mm
T1c	Tumor > 10 mm, ali ≤ 20 mm u najvećem promjeru
T2	Tumor > 20 mm, ali ≤ 50 mm u najvećem promjeru
T3	Tumor > 50 mm u najvećem promjeru
T4	Tumor bilo koje veličine s direktnom invazijom stijenke prsnog koša i/ili kože (ulceracija ili makroskopski kožni čvorovi)
T4a	Ekstenzija umora na stijenku prsnog koša, invazija ili adherencija pektoralnog mišića u odsutnosti invazije, struktura stijenke prsnog koša ne kvalificira se kao T4
T4b	Ulceracija i/ili ipsilateralni makroskopski satelitski čvor i/ili edem (uključujući izgled narančine kore) 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 ITCs (od eng. <i>isolated tumour cells</i> , izolirane tumorske stanice)
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 $\leq 2,0$ mm)
N1a	Metastaze u 1-3 aksilarna limfna čvora, najmanje 1 metastaza $> 2,0$ mm

N1b	Metastaze u ipsilateralne interne mamarne limfne čvorove čuvare, isključujući ITCs
N1c	N1a i N1b
N2a	Metastaza u 4-9 aksilarnih limfnih čvorova (najmanje 1 tumorski depozit > 2,0 mm)
N2b	Metastaza klinički detektirane u internim marnim limfnim čvorovima, s ili bez mikroskopske potvrde, s patološkim negativnim aksilarnim limfnim čvorovima
N3a	Metastaza u 10 ili više 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 marni 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 kliničkim ili slikovnim metodama i/ili histološki dokazana metastaza > 0,2 mm

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	N0	
Stadij IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	
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

1.5.3 Molekularni subtipovi karcinoma dojke

Na temelju tehnike genske postrojbe (engl. *microarray*) karcinomi dojke se svrstavaju u posebne molekularne subtipove od kojih svaki ima različitu prognozu, budući da bolest sadrži različite obrasce ekspresije gena. Razvoj i korištenje genomskog profiliranja doveo je do razvoja sustava klasifikacije raka čija je osnova biologija tumora, a ne morfologija (1,11). Glavni klinički parametri i patološki markeri su receptor estrogena (ER) te receptori progesterona (PR) i humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2). Svi se oni rutinski koriste za prognostička predviđanja, odabir tretmana i za uključivanje pacijenata u klinička ispitivanja. Još se navodi proliferacijski indeks (Ki-67) koji doprinosi ovoj klasifikaciji (13).

Karakterizirani podtipovi raka dojke su luminalni A, luminalni B, HER-2 pozitivan, bazalni te posljednji otkriven, niskog sadržaja kladina (eng. *Claudin-low*). Svaki od njih ima različite značajke vezane uz njihovu incidenciju, faktore rizika, prognozu i osjetljivost na terapiju (13).

Luminalni A nastaje iz luminalnih stanica kanalića, a pokazuje najbolji ishod liječenja i prognozu. Vezano uz ekspresiju, on je ER i PR pozitivan, HER-2 negativan, a proliferacijski indeks mu je nizak ($\leq 20\%$ stanica). Luminalni B je ER, PR pozitivan, visokog proliferacijskog indeksa ($> 20\%$ stanica u proliferaciji), a može biti HER-2 pozitivan ili negativan (1). Predstavlja vrlo čest podtip, a čini se kako kemoterapija i endokrina terapija nisu dovoljne za većinu ovih bolesnika (13). Lošije od luminalnog A odgovara na terapiju tamoksifenom i inhibitorom aromataze, kao što mu je i prognoza liječenja na niskom nivou (11).

Prekomjerna ekspresija HER-2 receptora prisutna je otprilike u 20-30% tumora dojke. Povezujemo ga s agresivnijom bolešću, većom stopom recidiva te smanjenim očekivanim periodom preživljenja (14). Receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER-2) je tirozinska protein kinaza erbB-2, kodiran genom ERBB2, koja je u normalnim okolnostima

uključena u proces proliferacije i diobe stanica dojke. Prekomjerna ekspresija ovog onkogeno ima glavnu ulogu u rastu i napredovanju nasilnih vrsta raka dojke. Ovaj protein djeluje kao važan biomarker i cilj terapije za oko 30% oboljelih od raka dojke (16). Povezanost receptora HER-2 s karcinom dojke doveo je do poboljšanja terapije koja specifično cilja na taj receptor. Jedan od njih je trastuzumab, specifično humanizirano monoklonsko protutijelo na HER-2 protein, odobren za liječenje 1998. godine za rani stadij tumora dojke. Vezivanjem na izvanstaničnu domenu receptora inhibira dimerizaciju receptora, nizvodne putove prijenosa signala te dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa, indukcije apoptoze i inhibicije angiogeneze. Lapatinib je selektivni inhibitor tirozin- kinazne aktivnosti HER-2. Na taj način potiskuje autofosforilaciju tirozina i time nizvodne putove kao što su MAPK/Erk1/2 (mitogenom aktivirana protein kinaza) i PI3K/Akt (engl. *phosphoinositide 3-kinases*; fosfoinozimid-3-kinaza) putovi. Koristi se u uznapredovalom karcinomu dojke, kao monoterapija ili u kombinaciji s trastuzumabom i ostalim agensima (16).

Trostruko negativni (TNBC, engl. *triple negative breast cancer*) je najrazličitiji i ima još nekoliko podtipova. Kako mu sam naziv govori, njegova ekspresija pokazuje negativnost na ER, PR i HER-2 receptore (13,15). Pogađa najčešće mlade žene te je povezan s BRCA1 mutacijama. Također, Shah i suradnici u svom istraživanju su potvrdili da je kod ove vrste raka, mutacija gena *p53* bila najčešća, 53,8% (19). Vrlo je agresivnog tipa i nepredvidivog odgovora. Ima kliničke značajke koje uključuju visoku invazivnost, visok metastatski potencijal, sklonost recidivu i lošu prognozu. Epidemiološki podatci pokazuju da se uglavnom javlja u žena u predmenopauzi, mlađih od 40 godina, a poglavito žena crne rase (17). U usporedbi s drugim podtipovima raka dojke, vrijeme preživljavanja s TNBC je kraće, a stopa smrtnosti unutar prvih 5 godina nakon dijagnoze je 40%. Čak 46% pacijentica imat će udaljene metastaze, najčešće pluća i CNS. Budući da nemaju ekspresiju niti jednog od navedenih receptora, ne odgovaraju na endokrinu terapiju (18). Dijagnoza uključuje testiranje statusa na ER, PR i HER-2 kako bi se specificirala terapija. Za određivanje koristimo imunohistokemiju (IHC) i *in situ* hibridizaciju (19). Podtipovi ovog raka su luminalni androgeni receptor (LAR), mezenhimalni, imunomodulatorni (IM) i bazalni tipovi (BL1 i BL2). LAR je obogaćen genima uključenim u hormonsku signalizaciju, sintezu steroida i metabolizam androgena/estrogena. Bolesnici pokazuju kraće preživljavanje bez recidiva, a kao moguća terapija se spominje antagonist androgenih receptora (bikalutamid, flutamid, enzalutamid). M i MSL podtipove karakterizira pozitivan odgovor na fosfoinozimid 3-kinazu (PI3K) metu djelovanja inhibitora rapamicina (mTOR). Za razliku od M podtipa, koji pokazuje prekomjernu ekspresiju gena za proliferaciju,

podtip MSL obogaćen je genima povezanim s mezenhimskim matičnim stanicama i pokazuje regulaciju gena uključenih u angiogenezu i putove faktora rasta. BL1 i BL2 osjetljivi su na agense koji imaju utjecaj na oštećenje DNA, primjerice cisplatin (15).

U jednom američkom istraživanju, koje su objavili Millikan i suradnici, navodi se kako su dulje dojenje, veći broj djece i sve broj mjeseci dojenja po djetetu bili povezani sa smanjenim rizikom od bazalnog raka dojke, ali ne i luminalnog A. Time opet potvrđujemo raznolikost tipova raka (13).

1.5.4 Simptomi i dijagnostika karcinoma dojke

Rak dojke se najčešće očituje kao bezbolan čvor u dojci koji se drugačije osjeti nego ostalo tkivo dojke pod prstima. Osim navedenog, mogu se pojaviti promjene u veličini, obliku i izgledu dojke, uvlačenje bradavice, promjena boje kože, crvenilo ili naborana koža poput narančine kore te smečkasto-krvavi iscjedak iz dojke. Naravno, svi ovi znakovi i simptomi mogu biti izazvani drugim stanjima u dojci te njihovo postojanje ne znači nužno da žena ima rak. Važno je istaknuti da na pojavu prvih simptoma ne treba čekati te oni nikako ne mogu zamijeniti redovite rutinske mamografske i ultrazvučne preglede koji mogu otkriti rak u ranom stadiju bolesti (22). Kod uznapredovalijih tumora, zahvaćanje regionalnih limfnih čvorova se uglavnom može palpirati. Katkad može biti prisutan edem ruke kao odraz zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova tumorom. Specifičnu kliničku sliku ima inflamacijski ili upalni rak dojke sa simptomima upaljene, crvene i otečene dojke i kože poput narančine kore. Takva klinička slika posljedica je širenja raka u limfatične prostore dojke i kože s posljedičnom upalom (2).

Budući da danas postoje suvremene dijagnostičke tehnike, uz redovitu samokontrolu dojki, rak dojke trebao bi se otkriti u pretkliničkom stadiju. Detekcija primarnog tumora dojke većeg od 2 cm smatra se dijagnostičko – preventivskim neuspjehom (2). Dijagnostika se sastoji od kliničkog pregleda, mamografije, ultrazvučnog pregleda, biopsije te magnetne rezonance dojki. Klinički pregled obuhvaća razmatranje vizualnih nepravilnosti na koži dojke te palpaciju unutrašnjom stranom prstiju. Mamografija je radiološka dijagnostička pretraga u kojoj se koristimo x- zrakama niskih energija i omogućava uvid u unutrašnju strukturu dojke. Koristi se za ranu detekciju kod onih nepalpabilnih tumora te za potvrdu palpabilnog nalaza. Zlatni je

standard u dijagnostici i ovakvom metodom se može otkriti rak dojke u ranom stadiju, kada još nema simptoma ni znakova bolesti. Preporuka je da svaka žena napravi prvi mamogram s 40 godina, a onda je treba ponavljati svake dvije, tri godine. Naime, prije 40. godine mamografija dojki mogla bi dati nepouzdana rezultate dok se zbog mijenjanja dojki nakon 40. povećava količina masnog tkiva (koje je na rendgenskoj snimci tamno), a smanjuje količina žljezdanog (bijeke boje). Na tamnoj površini (masnoća) svaka sumnjiva tvorevina (bijeke boje) savršeno je vidljiva. Ultrazvučni je pregled metoda izbora kod mlađih žena (ispod 40 godina). Trebalo bi ga obavljati barem jednom godišnje. Manje je specifičan i senzitan od mamografije u postavljanju rane dijagnoze raka dojke, osobito u slučaju postmenopauzalnih žena. Razlog je već spomenuti. Starenjem u žena dolazi do masne pretvorbe tkiva dojke nakon menopauze, a ultrazvuk ne prodire dobro kroz masno tkivo. Biopsija podrazumijeva uzimanje uzorka tkiva dojke na temelju koje se utvrđuje jesu li stanice malignog ili benignog podrijetla, agresivnost raka, postojanje hormonskih te drugih receptora i ostale karakteristike. Jedini je način da se postavi konačna dijagnoza karcinoma. Postoji nekoliko vrsta ovisno o veličini i lokalizaciji promjene u dojci. Magnetna rezonanca dojke (MRI) korisna je u slučaju sumnje na multicentrični tumor kod mlađih žena. Pomoću magneta, radiovalova i računala izrađuje se niz detaljnih slika. Preporuča se kod žena koje imaju visoki rizik razvoja raka dojke (pozitivna obiteljska anamneza, mutacije gena BRCA1 i BRCA2, određeni genetski sindromi) (2,22).

1.5.5 Liječenje s naglaskom na trostruko negativni karcinom dojke

Stope preživljavanja raka dojke značajno su se povećale u posljednjih godina zbog kombinacije poboljšanih mogućnosti liječenja i povećanog otkrivanja tumora u ranoj fazi. Više od 90% karcinoma dojke nije metastatsko u trenutku postavljanja dijagnoze. Terapija je znatno napredovala. Koncepti terapije se moraju odlučivati u multidisciplinarnom okruženju, uzimajući u obzir molekularni podtip kao i ostale već spomenute značajke tumora. Za osobe koje nemaju metastatsku bolest, terapijski ciljevi su eradicacija tumora i sprječavanje recidiva. Trostruko negativan karcinom dojke ima 85% 5-godišnje preživljenje raka dojke u stadiju I naspram 94% do 99% za pozitivne hormonske receptore i pozitivne na ERBB2. Sustavna terapija za nemetastatski karcinom dojke određena je samim podtipom raka: pacijentice s tumorima pozitivnim na hormonske receptore primaju endokrinu terapiju, a manjina također prima kemoterapiju; bolesnici s ERBB2-pozitivnim tumorima primaju ERBB2 ciljana antitijela

ili terapiju inhibitorima u kombinaciji s kemoterapijom; a bolesnici s trostruko negativnim tumorima primaju kemoterapiju. Lokalna terapija za sve bolesnice s nemetastatskim karcinomom dojke sastoji se od kirurške resekcije. Metastatski rak dojke liječi se prema podtipu, s ciljem produljenja života, ublažavanja simptoma i održavanja kvalitete života (29).

Zbog nedostatka receptora na koje bi djelovala endokrina terapija, kemoterapija je jedino dostupno sustavno liječenje TNBC-a, te se stoga preporučuje adjuvantna kemoterapija za bolesnike s TNBC-om. Većina smjernica preporučuje kemoterapiju temeljenu na antraciklin-taksanu za stadij I–III TNBC. Određeni dio pacijenata s TNBC dobro reagira na standardne kombinacije kemoterapije i pacijenti koji postignu patološki potpuni odgovor (pCR, engl. *pathological complete response*) nakon neoadjuvantne kemoterapije imaju izvrsno dugotrajno preživljenje. Međutim, unatoč postizanju viših stopa pCR-a s konvencionalnom kemoterapijom, TNBC fenotip je povezan s većim stopama relapsa od karcinoma dojke pozitivnog na hormonske receptore i HER2-pozitivnog (19).

Lokalna terapija za rak dojke, kao što je operacija i zračenje, primjenjuju se na sličan način za sve tipove raka dojke i ne postoje specifične preporučene smjernice za lokalno liječenje TNBC. Tijekom posljednjeg desetljeća, stopa mastektomije u SAD-u je u porastu, a slično je i kod TNBC-a. Nedavne studije pokazuju kako se više od 50% žena s operabilnim TNBC-om odlučuje podvrgnuti mastektomiji (19).

Angiogeneza se smatra važnom terapijskom metom kod liječenja raka. Potencijalni način djelovanja na angiogenezu je preko inhibicije VEGF-a (engl. *vascular endothelial growth factor*, vaskularni endotelni faktor rasta). Od lijekova ove klase, najviše je kod raka dojke proučavan bevacizumab. Ispitivanja koja su kemoterapiji dodavala bevacizumab ili sorafenib (oralni inhibitor multikinaze, s antiproliferativnim ili antiangiogenim djelovanjem, odnosno), pokazala su naznaku veće koristi u bolesnika s TNBC. Nažalost, randomizirane studije adjuvansa bevacizumaba nisu uspjele pokazati poboljšanje ukupnog preživljenja u bolesnika s TNBC, a kod antiangiogenetskog agensa otkrivena je toksičnost umjerenih doza (19,30).

Postoje brojni klinički i *in vitro* dokazi da su stanice s nedostatkom BRCA1 osjetljive i na agense platine. U studiji faze II, monoterapija cisplatinom dala je impresivnu stopu odgovora od 80% kod metastatskog karcinoma dojke povezanog s mutacijom BRCA1. U randomiziranom ispitivanju faze III, uspoređivani su karboplatin i docetaksel. Međutim, u TNBC-u povezanom s BRCA mutacijom, karboplatin je dao bolju stopu odgovora i preživljenje bez napredovanja bolesti u usporedbi s docetakselom (19).

U usporedbi s drugim podtipovima raka dojke, pacijentice s TNBC uvijek su imale najgore podatke o ukupnom preživljenju i prognozi liječenja. Naprednim istraživanjima i izvanrednim genomskim i molekularnim otkrićima dolazi se do inovativnih terapija. Trenutno su dva PARP, poli(ADP-riboza)polimeraza inhibitori (olaparib i talazoparib) kao i jedno anti-PD-L1 monoklonsko protutijelo (atezolizumab, u kombinaciji s kemoterapijom) odobreni u određenim subpopulacijama bolesnika s metastatskim TNBC (mTNBC), što je ovu bolest konačno dovelo u eru personalizirane medicine (30). PD-1 je antigen izražen na aktiviranim T stanicama, pro-B stanicama, prirodnim stanicama ubojicama i dendritičkim stanicama. Pretklinički podaci podupiru koncept da blokada imunoloških kontrolnih točaka može biti učinkovita strategija liječenja TNBC-a (19). PARPi i nab-paklitaksel/atezolizumab čine osnovu u liječenju oko 50% pacijenata s mTNBC. PARPi su odobreni kao prva ili sljedeća linija liječenja isključivo za pacijente s gBRCA mutacijama (30). Kao monoterapija, PARPi je pokazao ograničenu aktivnost u karcinomu dojke koji nije povezan s mutacijom BRCA (19). Pokušava se dodatno proširiti njihova upotreba na pacijente sa somatskim BRCA mutacijama. Kombinacija PARPi i anti-PD-1 izgleda prilično učinkovita u pretkliničkim modelima, iako su još uvijek potrebni dodatni podaci o sigurnosti i učinkovitosti kako bi se došlo do čvrstih zaključaka za njihovu buduću korisnost kod pacijenata s mTNBC.

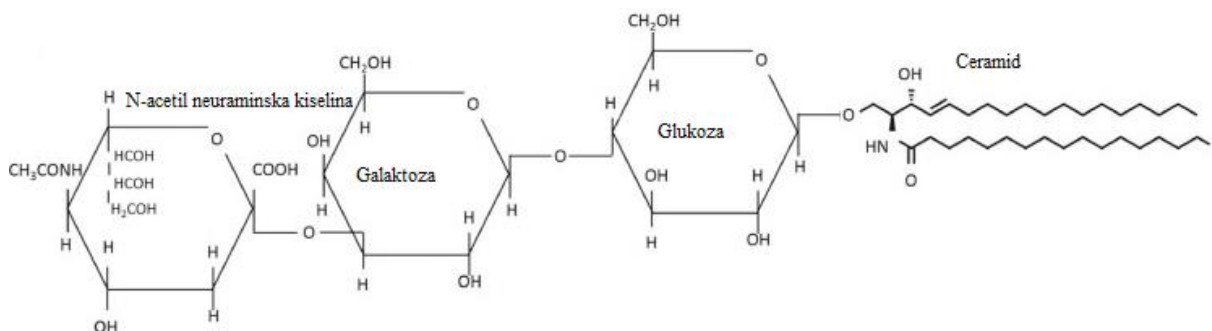
Jedne od obećavajućih meta antitumorskih agensa su PI3K (fosfoinozimid 3-kinaza) i nizvodne signalizacijske komponente AKT (serin/treonin-protein kinaze) i mTOR (engl. *the mammalian target of rapamycin*; meta rapamicina kod sisavaca). Dvije randomizirane studije faze II procjenjuju inhibitore AKT u kombinaciji s paklitakselom kao lijekom za mTNBC. Budući da prema imunohistokemiji, otprilike 10% – 15% TNBC izražava AR, istraživanja se usmjeravaju i na tu potencijalnu metu. Pretklinički podaci pokazuju da farmakološka inhibicija AR bikalutamidom uvelike smanjuje vitalnost stanica i rast tumora. Nedavna studija izvijestila je o ohrabrujućoj aktivnosti novog lijeka sljedeće generacije usmjerenog na androgene, enzalutamida, u AR+ TNBC. Osim ovisnosti o AR-u, stanične linije LAR TNBC obično sadrže aktivirajuću mutaciju u domeni kinaze PI3K i pokazuju osjetljivost na inhibitore PI3K. Stoga se kombinacija antiandrogena i inhibitora PI3K također istražuje u fazi I/II.

Genomski i molekularni podaci, akumulirani tijekom posljednjih nekoliko godina, uspjeli su osigurati nekoliko ciljanih terapija za različite podskupine mTNBC-a. Neke od ovih novih terapija već su promijenile način liječenja pacijenata, dok mnogi drugi i dalje prolaze kroz napredne faze kliničkog razvoja. Identifikacija učinkovitih lijekova ostaje pravi izazov za budućnost liječenja (30).

1.6. Građa i uloga GM3 gangliozida

Glikosfingolipidi (GSL) su smješteni u vanjskom jednosloju plazma membrane, gdje tvore lipidne mikrodomene koje služe za regulaciju trans-membranske transdukcije signala. Kod sisavaca, složeni GSL se razlikuju po broju i/ili vrsti šećera, a vjeruje se da raznolikost glikanskih struktura u GSL-ima određuje specifične funkcije stanica. Glikanski dijelovi GSL sintetiziraju se na luminalnoj strani Golgijevog aparata pomoću višestrukih Golgijevih glikoziltransferaza (31).

Gangliozidi su glikosfingolipidi (ceramid + oligosaharid) s najmanje jednim ostatkom sijalinske kiseline u svojoj strukturi (Slika 6.). Dvije glavne varijante sijalinske kiseline kod sisavaca su N-acetilneuraminska kiselina (Neu5Ac) i N-glikolineuraminska kiselina (Neu5Gc) (32). Međutim, Neu5Gc-siajlokonjugati su odsutni u ljudskim normalnim tkivima jer je gen koji kodira CMP-Neu5Ac hidrosilazu nepovratno inaktiviran. Odsutnost enzima odgovornog za pretvorbu CMP-Neu5Ac u CMP-Neu5Gc dovodi do potpunog izostanka Neu5Gc u zdravim ljudskim tkivima. Međutim, pokazalo se da je Neu5Gc izražen na glikoproteinima i gangliozidima u karcinomu dojke (33).



Slika 6. Građa GM3(NeuAc). Preuzeto i modificirano prema Labrada i suradnici. GM3(Neu5Gc) ganglioside: an evolution fixed neoantigen for cancer immunotherapy (32).

Uloga GM3 je inhibicija tirozin kinaze povezane s epidermalnim i fibroblastnim receptorima faktora rasta (EGF i FGF receptori). Na taj način je vidljiv utjecaj na inhibiciju proliferacije malignih stanica (33).

1.7. Izražaj CD44 i CD24 na stanicama raka dojke

Fenotipski, ovisno o izražaju molekula CD44 i CD24, stanice možemo podijeliti na 4 populacije. U ovom diplomskom ću se baviti trima fenotipovima; epitelno mezenhimalne CD44+CD24+, epitelno luminalne CD44-CD24+ te epitelne CD44-CD24-.

CD24 je molekula stanične adhezije koja je uključena u progresiju metastatskog tumora različitih solidnih tumora, a prekomjerno je eksprimiran u višestrukim ljudskim vrstama raka. CD24 je mali glikoprotein od 27 aminokiselina na vanjskoj površini stanične membrane i pričvršćen je na staničnu membranu pomoću sidra za glikozilfosfatidil-inozitol (GPI), stoga je uključen u staničnu adheziju (36). Osim toga, ekspresija CD24 identificirana je kao prognostički čimbenik u različitim ljudskim malignim tumorima. CD44 je transmembranski glikoproteinski receptor, a njegova ekspresija je pojačana kod agresivnih karcinoma i usko je povezana s metastazama raka i rezistencijom na kemoterapiju. CD44 sudjeluje u rastu tumora, diferencijaciji, adheziji i preživljavanju. U studiji Zoua i suradnika(34), CD44 je bio prekomjerno izražen u bolesnika s TNBC, osobito u onih s metastazama u limfnim čvorovima, dok se u studiji Wang i suradnika, CD24 spominje kao marker koji ukazuje na invazivnost. Bolesnice s rakom dojke s povišenom ekspresijom CD24 imale su 1,48 puta veći rizik za lošu prognoze u usporedbi s pacijentima bez visoke ekspresije CD24. Utvrđeno je da prekomjerna ekspresija ukupnog CD24 korelira s lošim preživljenjem (34,37).

Da bi se istražila osnovna svojstva različitih podtipova, u studiji Moona i suradnika, usporedila se ekspresija CD44, CD24 u četiri stanične linije raka dojke kod ljudi pomoću analize protočne citometrije i imunološkog bojenja: MCF-7 (luminali A), SK-BR-3 (HER2-OE), MDA-MB-468 (bazalni epitel) i MDA-MB-231 (bazalni mezenhim, trostruko negativan). Najzloćudnija bazalna mezenhimska stanična linija MDA-MB-231 uglavnom je pokazivala CD44+CD24- obilježje. Također je otkriveno da su luminalna A stanična linija MCF-7 i HER2-OE stanična linija SK-BR-3 uglavnom sastavljene od stanica koje nose fenotip CD44CD24+, dok je bazalna epitelna stanična linija MDA-MB-468 uglavnom pokazala CD44+CD24+. Međutim, teško je procijeniti malignitet ovih staničnih linija samo na temelju tradicionalnog matičnog biljega CD44+CD24- (36).

U još jednoj studiji, Qiao i suradnici su proučavali CD44-CD24- stanice. Rezultati su pokazali da je veća učestalost CD44-CD24- stanica povezana s odgođenim postoperativnim metastazama raka dojke. Nadalje, CD44-CD24- stanice trostruko negativnog raka dojke

(TNBC) spontano su se pretvorile u CD44+CD24- karcinomske matične stanice (CSC) sa sposobnošću samoobnavljanja, diferencijacije, tumorigenosti i metastaziranja u plućima *in vitro* i na modelima imunodeficientnih miševa (39).

2. CILJ I HIPOTEZA

2.1. Ciljevi istraživanja

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

1. postotak epitelno mezenhimalnih CD44+CD24+, epitelnih CD44-CD24+ i luminalno epitelnih CD44-CD24- stanica pozitivnih na GM3(NeuAc)
2. prosječni izražaj GM3(NeuAc) po jednoj CD44+CD24+, 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. povećati postotak epitelno mezenhimalnih CD44+CD24+, epitelnih CD44-CD24+ i luminalno epitelnih CD44-CD24- stanica pozitivnih na GM3(NeuAc)
2. povećati prosječni izražaj GM3(NeuAc) po jednoj CD44+CD24+, CD44-CD24+ i CD44-CD24- stanici.

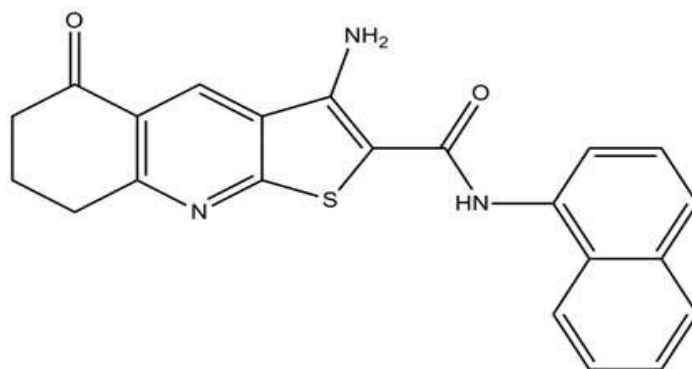
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Stanična linija trostruko negativnog karcinoma dojke

U istraživanju je korištena stanična linija trostruko negativnog raka dojke MDA-MB-231. Stanice su uzgajane u inkubatoru koji održava temperaturu od 37 °C i 5% CO₂. Kao hranjivi medij za stanice korišten je DMEM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) s 10% fetalnog goveđeg seruma, FBS (od eng. *fetal bovine serum*) (EuroClone, Milano, Italija). U medij je dodavan i 1% antibiotik (EuroClone, Milano, Italija) s ciljem sprječavanja moguće kontaminacije kultura stanica bakterijama.

3.2. Novosintetizirani inhibitor

Tieno[2,3-*b*]piridini su otkriveni probirom računalnim modeliranjem, metodom vHTS (engl. *virtual high throughput screen*), kao mogući inhibitori fosfolipaze C (38). Koncentracija od 2 μM koncentracija inhibitora djelovala je citotoksično na MDA-MB-231 stanice, uzrokujući apoptozu te sniženje postotka subpopulacije matičnih stanica (CD44+CD24-) (33).

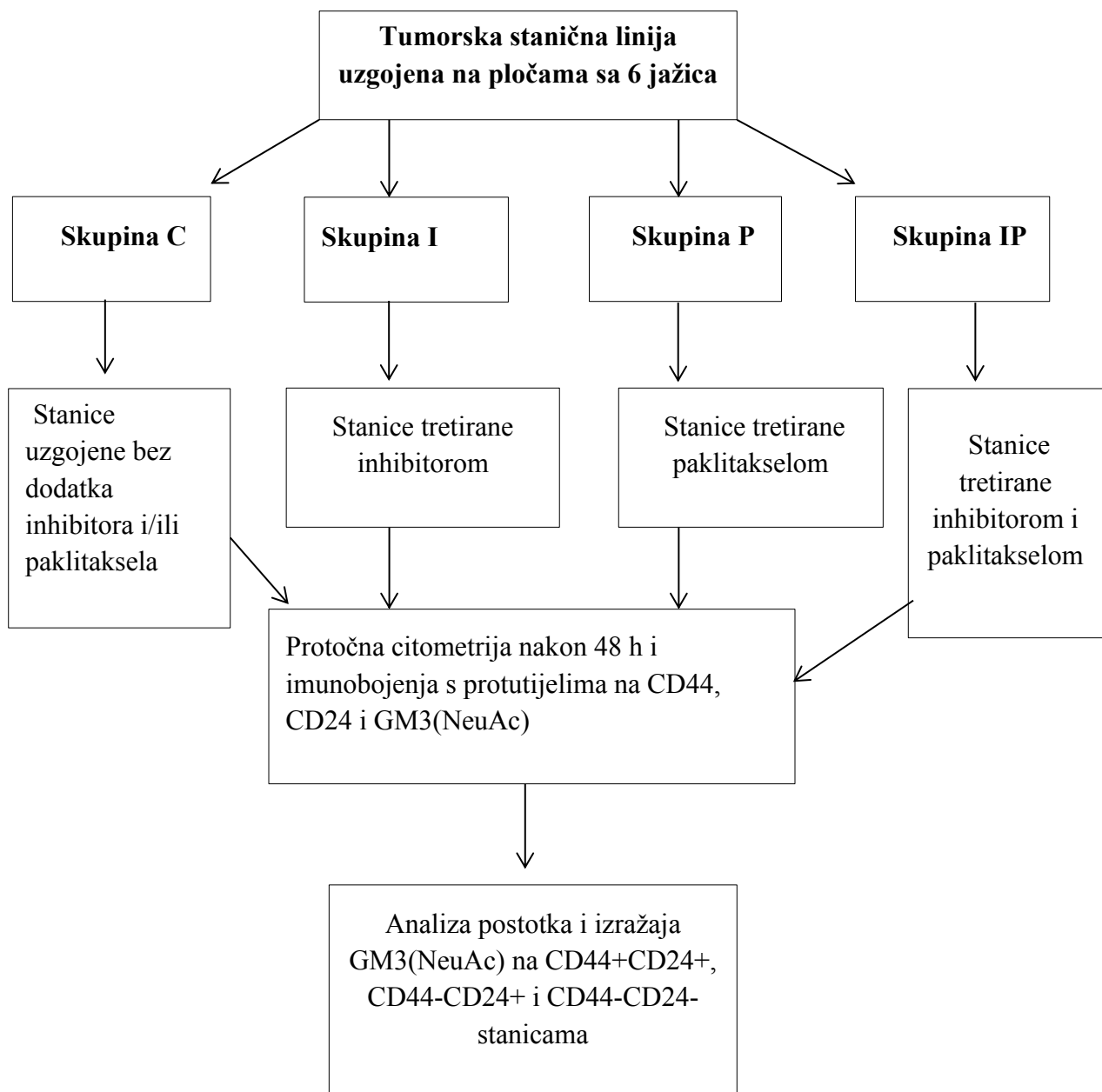


Slika 7. Molekulska građa inhibitora fosfolipaze C, 3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno) [2,3-*b*] kinolin-2-karboksamid.

Inhibitor je slabo topljiv u vodi zbog svojih aromatskih prstenova. Stoga je prvo bio otopljen u dimetil sulfoksidu DMSO-u (od engl. *dimethyl sulfoxide*) a potom je razrijeđen PBS-om do koncentracije od 2 μ M.

3.3. Ustroj istraživanja

Hodogram istraživanja prikazan je na Slici 8.



Slika 8. Hodogram istraživanja.

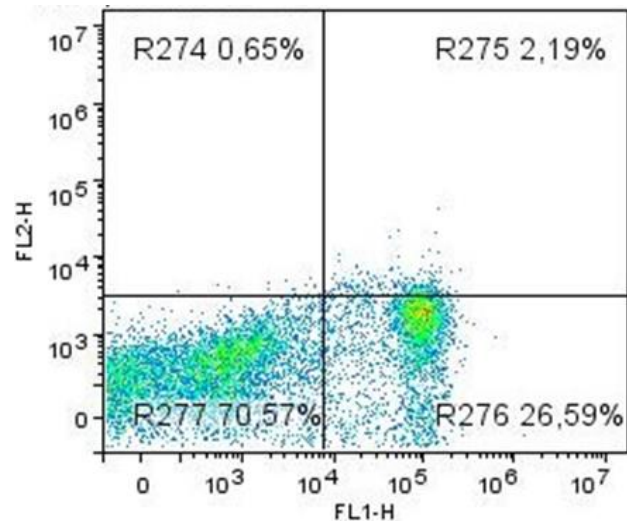
3.4. Tretiranje stanica inhibitorom i imunobojenje

Stanice su nasadene u triplikatu na ploče sa šest jažica. U svaku jažicu dodano je 2 ml hranjivog medija DMEM te je nakon 12h provjereno jesu li stanice adherirale za donju plohu jažica. Isisan je medij iz jažica te potom u 3 jažice dodan isti medij s 2 μ M koncentracijom inhibitora. U preostale 3 jažice dodan je medij bez inhibitora. Sve je inkubirano tijekom 48h. Potom je uklonjen medij iz svih jažica te je dodana otopina tripsina. Tripsin proteolitički cijepa peptidne veze proteina i proteoglikana kojima su stanice čvrsto adherirane za donju plohu jažica. Potom se ponovo dodaje medij koji uvijek u sebi sadrži 10% fetalnog govedeg seruma. U serumu je prisutan α 1-anti-tripsin koji zaustavlja moguće nepoželjno djelovanje tripsina na stanice nakon njihova odvajanja od jažica. Stanice se prenose u epruvete i centrifugiranjem se uklanja višak medija. Potom se u epruvete dodaje otopina Fc receptora (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). Fc receptor veže se za različite molekule na površini stanica. Ukoliko bi te molekule bile slobodne, nespecifično bi vezale protutijela za biljege koji se istražuju. Time bi preostalo manje protutijela za biljege koje istražujemo te vjerojatno ne bi bilo moguće detektirati sve prisutne biljege od interesa. Imunobojenje protutijelima na CD44 i CD24 dobivena je mogućnost odabiranja triju različitih subpopulacija od interesa za ovu studiju: CD44+CD24-, CD44-CD24+ i CD44-CD24-. Za CD44 protutijelo kovalentno je vezan kromogen FITC (BD Biosciences) a za protutijelo na CD24 kromogenom PE (eBioscience) te su mjerene njihove fluorescencije nakon ekscitacije laserom protočnog citometra. Primarno protutijelo na GM3(NeuAc) (Cosmo Bio Co., Tokyo, Japan) bilo je neobilježeno kromogenom. Stoga je njegovo vezivanje detektirano posredno, pomoću sekundarnog protutijela konjugiranog s kromogenom eFluor 660 (eBioscience, Inc., San Diego, CA, SAD).

3.5. Analiza izmjerenih fluorescencija s ciljem detekcije pojedinih subpopulacija s biljegom GM3(NeuAc)

Protočni citometar služi prvenstveno za tzv. akviziciju uzoraka, tj. spremanje dobivenih podataka izmjerenih fluorescencija. Analiza dobivenih podataka provedena je programom FlowLogic (Inivai, Mentone, Victoria, Australija). Prvo su birane pojedine subpopulacije stanica raka iz točkastog dijagrama (engl. *dot-plot*, gdje svaka točka predstavlja jednu stanicu)

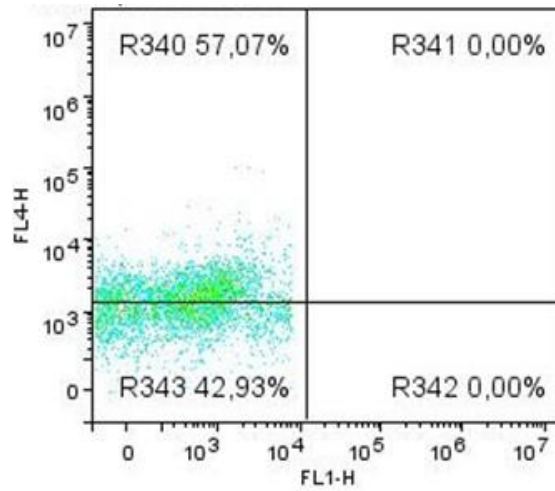
s koordinatama CD24 naspram CD44, odnosno FL2-H naspram FL1-H. Kanal citometra FL1, obzirom na svoje filtere za određene valne duljine, detektira FITC kromogen vezan za protutijelo na CD44, a kanal FL2 detektira PE kromogen od anti-CD24. (Slika 9).



Slika 9. Raspored subpopulacija po kvadrantima: u R274 kvadrantu nalaze se CD44-CD24+, u R275 su CD44+CD24+ dok se u R277 nalaze CD44-CD24- stanice.

Potom je provedeno tzv. gejtanje (engl. *gate*, vrata) tako da samo jedan po jedan kvadrant uzimamo kao vrata za pojedinu subpopulaciju koja se nadalje analizira u točkastom dijagramu s koordinatama FL-4 naspram FL-1. U FL-4 kanalu mjerena je fluorescencija kromogena kovalentno vezanog za sekundarno protutijelo na GM3(NeuAc). Primjerice, na Slici 10, koja je generirana iz kvadranta R277 prethodne slike, u kvadrantu R340 nalazi se 57,07% GM3(NeuAc) pozitivnih stanica iz subpopulacije CD44-CD24-.

Uz postotak GM3(NeuAc) stanica određivan je i prosječni izražaj GM3(NeuAc) po jednoj stanici izražen parametrom geometrijske srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije, GMI (od engl. *geometric mean fluorescence intensity*) kromogena eFluor660, kovalentno vezanog za sekundarno protutijelo kojim je u pokusu detektirano primarno protutijelo na GM3(NeuAc).



Slika 10. Postotak GM3(NeuAc)+CD44-CD24- stanica (kvadrant R340).

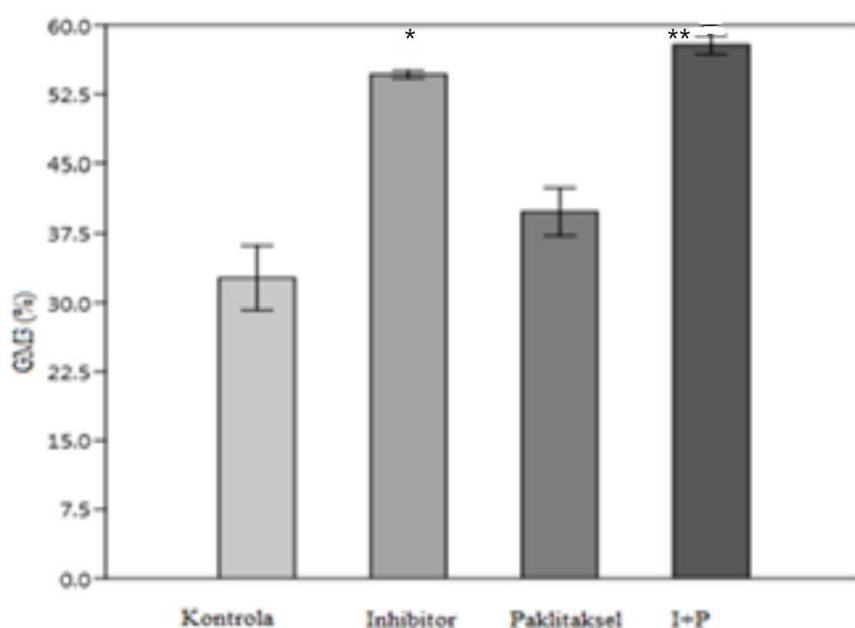
3.6. Statistička analiza rezultata

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 i prosječni izražaj GM3(NeuAc) na CD44+CD24+ subpopulaciji

Analizom na protočnom citometru, na ovoj staničnoj liniji, ustanovljeno je povećanje postotka GM3(NeuAc), inhibitora tirozin kinaze. Inhibitor fosfolipaze je doveo do statistički značajnog porasta postotka ($p=0,023$), dok paklitaksel nije pokazao značajan utjecaj. Do najvećeg povećanja postotka GM3(NeuAc) došlo je djelovanjem kombinacije inhibitora i paklitaksela ($p=0,0023$) (Slika 11).



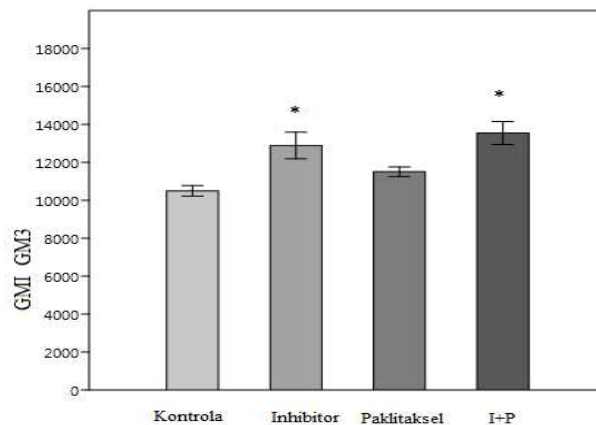
Slika 11. Postotak GM3(NeuAc) na CD44+CD24+ staničnoj subpopulaciji nakon tretmana inhibitorom, paklitakselom i njihovom kombinacijom.

$p^* < 0,05$

$p^{**} < 0,01$

Kod prosječnog izražaja GM3(NeuAc) po jednoj CD44+CD24+ stanici vidljiv je statistički značajan porast kod skupine tretirane inhibitorom. Ekspresija GM3(NeuAc) po svakoj stanici se prezentira uz pomoć GMI (engl. *geometric mean fluorescence intensity*,

geometrijski srednji intenzitet fluorescencije). GMI kod skupine s inhibitorom je iznosio 12156 naspram kontrolne skupine 10289 ($p=0,033$). Skupina tretirana paklitakselom imala je nepromijenjen izražaj GM3(NeuAc), dok je skupina tretirana kombinacijom ponovno pokazala najveći porast. GMI je kod kombinacije iznosio 13274 ($p=0,01$) (Slika 12).

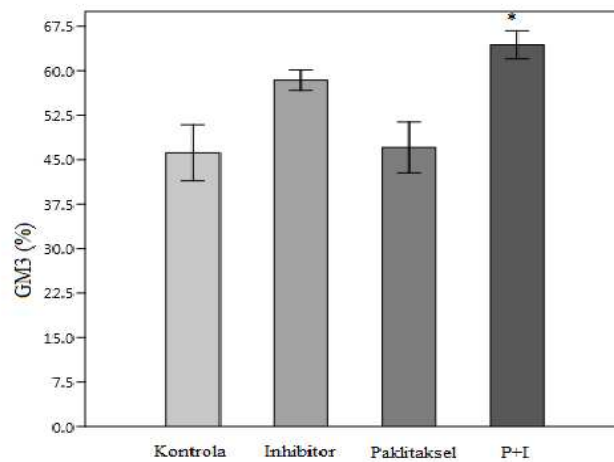


Slika 12. Izražaj (GMI) GM3(NeuAc) po jednoj CD44+CD24+ stanici nakon tretmana inhibitorom, paklitakselom i njihovom kombinacijom.

$p^* < 0,05$

4.2. Djelovanje inhibitora na postotak i prosječni izražaj GM3(NeuAc) na CD44-CD24+ subpopulaciji

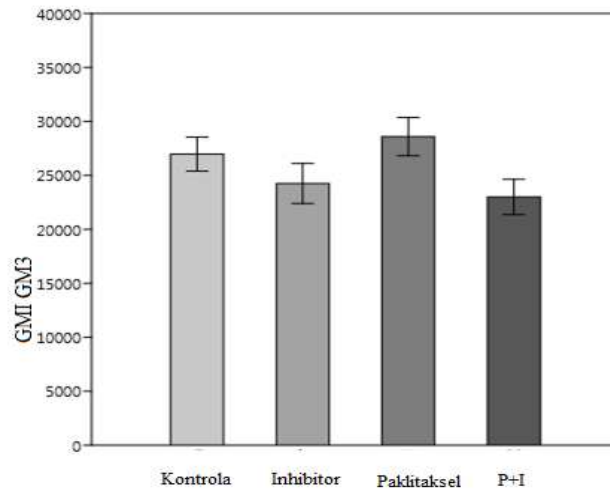
Kod CD44-CD24+ subpopulacije, inhibitor i kombinacija inhibitora s paklitakselom uzrokovali su povećanje postotka GM3(NeuAc), inhibitor bez ($p=0,07$), a kombinacija sa statističkom značajnošću ($p=0,026$). Sam paklitaksel nije doveo do promjene postotka GM3(NeuAc) u ovoj populaciji (Slika 13).



Slika 13. Postotak GM3(NeuAc) na CD44-CD24+ staničnoj populaciji nakon tretmana inhibitorom, paklitakselom i njihovom kombinacijom.

$p^* < 0,05$

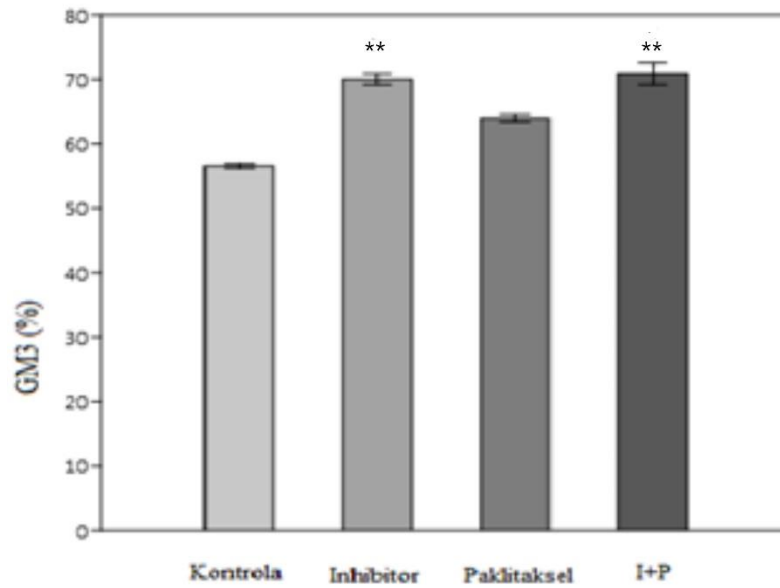
Prosječni izražaj GM3(NeuAc) po jednoj CD44-CD24+ stanici se beznačajno smanjio kod skupine tretirane inhibitorom i njegovom kombinacijom s paklitakselom. Kod skupine s paklitakselom, GMI je porastao na 28587, naspram kontrolne skupine 26968, međutim statistički beznačajano (Slika 14).



Slika 14. Prosječni izražaj GM3(NeuAc) po jednoj CD44-CD24+ stanici nakon tretmana inhibitorom, paklitakselom i njihovom kombinacijom.

4.3. Djelovanje inhibitora na postotak i prosječni izražaj GM3(NeuAc) na CD44-CD24- subpopulaciji

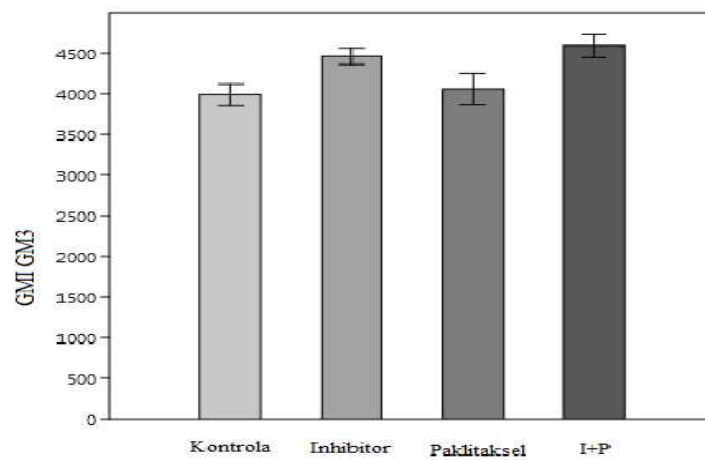
Inhibitor, kao i njegova kombinacija s paklitakselom, doveli su do povećanja postotka GM3(NeuAc) na CD44-CD24- subpopulaciji ($p=0,001$). Sam paklitaksel nije doveo do značajnog porasta (Slika 15).



Slika 15. Postotak GM3(NeuAc) na CD44-CD24- staničnoj populaciji nakon tretmana inhibitorom, paklitakselom i njihovom kombinacijom.

$p^{**}<0,01$

Prosječni izražaj GM3(NeuAc) se na ovoj staničnoj populaciji nije statistički značajno razlikovao od kontrolne skupine za sva tri primijenjena tretmana. GMI je za kontrolnu skupinu iznosio 3952. Kod inhibitora je ta vrijednost narasla do 4449, a kombinacija inhibitora i paklitaksela 4342 (Slika 16).



Slika 16. Prosječni izražaj GM3(NeuAc) po jednoj CD44-CD24- stanici nakon tretmana inhibitorom, paklitakselom i njihovom kombinacijom.

5. RASPRAVA

Trostruko negativni karcinom dojke predstavlja najagresivniji molekularni podtip među tumorima dojke. Unatoč napretku u temeljnoj biologiji tumora, klinički ishodi za TNBC i dalje ostaju loši. Medijan ukupnog preživljenja pacijenata s metastatskim TNBC je otprilike osamnaest mjeseci (40). Kliničke značajke kojima ga možemo opisati uključuju visoku invazivnost, visok metastatski potencijal, sklonost recidivu i lošu prognozu. Epidemiološki podatci pokazuju da se uglavnom javlja u žena u predmenopauzi, mlađih od 40 godina, a posebice žena crne rase (17).

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti hoće li se nakon primjene inhibitora fosfolipaze C, samog ili u kombinaciji s paklitakselom na staničnoj liniji MDA-MB-231 povećati postotak epitelno mezenhimalnih CD44+CD24+, epitelnih CD44-CD24+ i luminalno epitelnih CD44-CD24- stanica pozitivnih na GM3(NeuAc) te prosječni izražaj GM3(NeuAc) po jednoj stanici za svaku ovu subpopulaciju.

Novosintetizirani spoj iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina, 3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno) [2,3-*b*] kinolin-2-karboksamid, čiji učinak je istraživan u ovom diplomskom radu, djeluje kao inhibitor fosfolipaze C (41,42). Različiti vanjski podražaji, hormoni i faktori rasta pospješuju aktivaciju izuzima fosfolipaze C što uzrokuje cijepanje lipidnog fosfatidilinozitol 4,5-bifosfata (PIP2, engl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) na sekundarne glasnike diacilglicerol (DAG, *diacylglycerol*) i inozitol trifosfat (IP3, engl. *inositol 1,4,5-trisphosphate*). Potom sekundarni glasnici kontroliraju brojne signalne kaskade kroz mobilizaciju unutarstaničnih zaliha Ca²⁺ i aktivaciju protein kinaze C. Poremećena regulacija fosfolipaze C doprinosi proliferaciji stanica raka te je upravo zato ona cilj različitih antitumorskih agensa (42). Uz inhibitor fosfolipaze, korišten je još i paklitaksel. To je prvi identificirani spoj čija je uloga stabilizacija mikrotubula i smatra se najznačajnijim napretkom u kemoterapiji u posljednja dva desetljeća, sa širokim spektrom djelovanja na različite vrste tumora (43). Stabiliziranjem mikrotubula blokira napredovanje staničnog ciklusa, ulazak stanica u mitozu i inhibira rast stanica raka (44).

Pojedinačnim djelovanjem navedenih agensa i njihovom kombinacijom pokušalo se ustanoviti dolazi li do povećanja molekule GM3(NeuAc) iz porodice glikosfingolpida. Glikosfingolipidi se sastoje od hidrofobnog ceramida i hidrofilnih ostataka ugljikohidrata te su važna komponenta staničnih plazma membrana. Reguliraju brojne stanične procese kao što su adhezija, proliferacija, apoptoza, prepoznavanje, modulacija puteva prijenosa signala i metastaziranje raka (33). U ovom diplomskom radu istraživan je kiseli glikosfingolipid ili ganglioizid GM3(NeuAc). Promjena sadržaja GM3(NeuAc) u staničnim membranama inhibira tirozin kinaznu aktivnost receptora faktora rasta fibroblasta (FGF), a koji je uključen u

patogenezu raka. Niska razina GM3(NeuAc) aktivira, a visoka inhibira prijenos signala FGF. FGF može povećati aktivnost PLC- δ i poboljšati staničnu proliferaciju. Stoga se može pretpostaviti da nakon tretmana inhibitorom, povećani GM3(NeuAc) u plazma membranama stanica TNBC-a doprinosi inhibiciji FGF signalizacije i time smanjuje progresiju raka (33,42).

Imunobojenje protutijelima na CD44 i CD24 je omogućilo odabiranje triju različitih subpopulacija od interesa te je uz pomoć protutijela na GM3(NeuAc) se određen postotak stanica koje eksprimiraju navedeni glikosfingolipid. Analizom na protočnom citometru je ustanovljeno da, kod populacije CD44+CD24+, inhibitor fosfolipaze i njegova kombinacija s paklitakselom dovode do statistički značajnog porasta postotka GM3(NeuAc), dok sam paklitaksel nije pokazao utjecaj. Gledajući prosječni izražaj po stanici (GMI), odziv subpopulacije bio je isti kao i za postotak GM3(NeuAc). Kod subpopulacije CD44-CD24+ stanica, utvrđeno je da je samo kombinacija inhibitora i paklitaksela dovela do statistički značajnog rezultata. Kad je riječ o izražaju GM3(NeuAc) po stanici, tu nema promjena u niti jednoj od skupina naspram kontrolne. U trećoj subpopulaciji, CD44-CD24-, inhibitor i njegova kombinacija s paklitakselom su povećali postotak a prosječni izražaj po stanici ostao je statistički nepromijenjen nakon sva tri primijenjena tretmana.

U sličnom istraživanju koje je provedeno 2017.godine također se bavilo utjecajem inhibitora, iz ovog diplomskog, na trostruko negativne matične stanice raka, CD44+CD24- (CSC, engl. *cancer stem cells*). Dokazano je smanjenje CSC subpopulacije stanica, utjecaj na apoptozu te povećanje izražaja GM3 u toj liniji (42). Li i suradnici su pokazali da su matične CD44+CD24- stanice pacijenata više tumorogene od CD44+CD24+ stanica karcinoma dojke nakon njihove implantacije u masne jastučice dojke imunodeficientnih miševa s dijabetesom, bez pretilosti (35). Međutim, najnovija istraživanja pokazuju da se ne smije zanemariti razvijanje učinkovitih terapija i za tri subpopulacije istraživane u ovom diplomskom radu, a koje nemaju svojstva matičnih tumorskih stanica (39). Stoga bi idealan inhibitor bio onaj koji bi učinkovito ciljao četiri (CD44+CD24+, CD44+CD24-, CD44-CD24+ i CD44-CD24-) subpopulacije trostruko negativnog karcinoma dojke. Novosintetizirani 3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno) [2,3-*b*] kinolin-2-karboksamid, sam ili u kombinaciji s paklitakselom, djeluje na barem jedan ispitivani parametar kod sve četiri subpopulacije pa je njegovo djelovanje važno dodatno istražiti na *in vitro* i *in vivo* modelima.

6. ZAKLJUČCI

- 1.** Tretman inhibitorom fosfolipaze doveo je do porasta postotka GM3(NeuAc) u CD44+CD24+ i CD44-CD24- staničnim subpopulacijama stanične linije MDA-MB-231 trostruko negativnog raka dojke, dok na liniju CD44-CD24+ nije imao statistički značajan utjecaj.
- 2.** Tretman kombinacijom inhibitora i paklitaksela pokazao je najveće povećanje postotka GM3(NeuAc) pozitivnih stanica unutar svih triju ispitivanih subpopulacija.
- 3.** Prosječni izražaj GM3(NeuAc) kod CD44+CD24+ subpopulacije je bio povećan, a kod ostalih dviju subpopulacija nepromijenjen nakon tretmana inhibitorom fosfolipaze.

7. CITIRANA LITERATURA

1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija, 5.izdanje, prerađeno i dopunjeno izdanje. Medicinska naklada, Zagreb, 2018.str.149-173
2. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Klinička onkologija,3., obnovljeno i dopunjeno izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2018.str. 3-22
3. Cooper, G. M., Hausman, R. E. Stanica molekularni pristup, 5 izdanje,Zagreb,Medicinska naklada,2010.,str.726-760
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
5. Detmar M. Tumor angiogenesis. J Investig Dermatol Symp Proc. 2000 Dec;5(1):20-3.
6. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija i mortalitet od raka u EU- 27 zemljama za 2020. godinu. [Internet]. 2020. [citirano 21.09. 2021.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>
7. Coughlin SS. Epidemiology of Breast Cancer in Women. Adv Exp Med Biol. 2019;1152:9-29.
8. Timothy J Key, Pia K Verkasalo, Emily Banks. Epidemiology of breast cancer. The Lancet Oncology. Volume 2, Issue 3,2001;133-140
9. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. Prog Mol Biol Transl Sci. 2017;151:1-32.
10. Poliklinika Mazalin. Karcinom dojke [Internet]. Zagreb : 2019., [citirano 23.10.2021.]. Dostupno na: <https://poliklinika-mazalin.hr/blog/karcinom-dojke/>
11. Eliyatkin N, Yalçın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. J Breast Health. 2015;11(2):59-66.
12. Sainsbury J R C, Anderson T J, Morgan D A L. Breast cancer BMJ 2000; 321 :745
13. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, Díez M, Viladot M, Arance A, Muñoz M. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. Breast. 2015 Nov;24 Suppl 2:S26-35.
14. Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. Chemother Res Pract. 2012;2012:743193
15. Sporikova Z, Koudelakova V, Trojanec R, Hajduch M. Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. Clin Breast Cancer. 2018 Oct;18(5):e841-e850.

16. Lee YM, Oh MH, Go JH, Han K, Choi SY. Molecular subtypes of triple-negative breast cancer: understanding of subtype categories and clinical implication. *Genes Genomics*. 2020 Dec;42(12):1381-1387.
17. Asif HM, Sultana S, Ahmed S, Akhtar N, Tariq M. HER-2 Positive Breast Cancer - a Mini-Review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(4):1609-15.
18. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*. 2020 Jun 9;22(1):61
19. Sharma P. Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist*. 2016 Sep;21(9):1050-62
20. Teichgraber DC, Guirguis MS, Whitman GJ. Breast Cancer Staging: Updates in the AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition, and Current Challenges for Radiologists, From the AJR Special Series on Cancer Staging. *AJR Am J Roentgenol*. 2021 Aug. 217 (2):278-290. [Medline].
21. Cancer research UK. TNM staging for breast cancer [Internet]. 2020., [citirano 27.10.2021.]. Dostupno na: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/tnm-staging>
22. ZZJZDNZ.hr. Rak dojke. Prevencija raka [Internet]. [citirano 27.10.2021.] Dostupno na: <https://www.zzjzdnz.hr/hr/zdravlje/prevencija-raka/1321>
23. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;151:1-32.
24. Dafni U, Tsourti Z, Alatsathianos I: Breast Cancer Statistics in the European Union: Incidence and Survival across European Countries. *Breast Care* 2019;14:344-353
25. WHO. Breast cancer. [Internet].2021.,[citirano 27.10.2021.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
26. Azamjah N, Soltan-Zadeh Y, Zayeri F. Global Trend of Breast Cancer Mortality Rate: A 25-Year Study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019 Jul 1;20(7):2015-2020
27. Sopik, V. International variation in breast cancer incidence and mortality in young women. *Breast Cancer Res Treat* 186, 497–507 (2021)
28. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Listopad- mjesec borbe protiv raka dojke [Internet]. 2021. [citirano 28.10.2021.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/listopad-mjesec-borbe-protiv-raka-dojke-2/>
29. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*. 2019;321(3):288–300.

30. Azim HA, Ghosn M, Oualla K, Kassem L. Personalized treatment in metastatic triple-negative breast cancer: The outlook in 2020. *Breast J.* 2020 Jan;26(1):69-80
31. Uemura S. [The regulation of ganglioside GM3 synthesis]. *Yakugaku Zasshi.* 2012;132(8):895-901. Japanese.
32. Labrada M, Dorvignit D, Hevia G, Rodríguez-Zhurbenko N, Hernández AM, Vázquez AM, Fernández LE. GM3(Neu5Gc) ganglioside: an evolution fixed neoantigen for cancer immunotherapy. *Semin Oncol.* 2018 Jan;45(1-2):41-51.
33. Marijan S, Markotić A, Mastelić A, Režić-Mužinić N, Pilkington LI, Reynisson J, Čulić VČ. Glycosphingolipid expression at breast cancer stem cells after novel thieno[2,3-*b*]pyridine anticancer compound treatment. *Sci Rep.* 2020 Jul 17;10(1):11876.
34. Zou W, Yang Y, Zheng R, Wang Z, Zeng H, Chen Z, Yang F, Wang J. Association of CD44 and CD24 phenotype with lymph node metastasis and survival in triple-negative breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2020 May 1;13(5):1008-1016
35. 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. *Sci Rep.* 2017 Oct 23;7(1):13856.
36. Moon YW, An HJ, Koo JS, Kim GM, Han H, Park S, Kim SI, Park HS, Kim S, Kim SK, Lee SA, Hwang S, Son GW, Sohn J. CD44/CD24 and aldehyde dehydrogenase 1 in estrogen receptor-positive early breast cancer treated with tamoxifen: CD24 positivity is a poor prognosticator. *Oncotarget.* 2017 Dec 21;9(2):2622-2630.
37. Wang Z, Wang Q, Wang Q, Wang Y, Chen J. Prognostic significance of CD24 and CD44 in breast cancer: a meta-analysis. *Int J Biol Markers.* 2017 Mar 2;32(1):e75-e82.
38. Reynisson, J. et al. The identification of novel PLC-gamma inhibitors using virtual high throughput screening. *Bioorgan. Med.Chem.* 2009, 17, 3169.
39. Qiao X, Zhang Y, Sun L, Ma Q, Yang J, Ai L, Xue J, Chen G, Zhang H, Ji C, Gu X, Lei H, Yang Y, Liu C. Association of human breast cancer CD44-/CD24- cells with delayed distant metastasis. *Elife.* 2021 Jul 28;10:e65418
40. Vagia E, Mahalingam D, Cristofanilli M. The Landscape of Targeted Therapies in TNBC. *Cancers (Basel).* 2020 Apr 8;12(4):916.
41. 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.
42. Mastelić A, Čikeš Čulić V, Režić Mužinić N, Vuica-Ross M, Barker D, Leung EY, Reynisson J, Markotić A. Glycophenotype of breast and prostate cancer stem cells

treated with thieno[2,3-*b*]pyridine anticancer compound. *Drug Des Devel Ther.* 2017 Mar 14;11:759-769.

43. Huang W, Barrett M, Hajicek N, Hicks S, Harden TK, Sondek J, Zhang Q. Small molecule inhibitors of phospholipase C from a novel high-throughput screen. *J Biol Chem.* 2013 Feb 22;288(8):5840-8.
44. Alqahtani FY, Aleanizy FS, El Tahir E, Alkahtani HM, AlQuadeib BT. Paclitaxel. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.* 2019;44:205-238.
45. Zhu L, Chen L. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. *Cell Mol Biol Lett.* 2019 Jun 13;24:40.

8. SAŽETAK

Ciljevi: Cilj istraživanja bio je utvrditi učinak primjene inhibitora fosfolipaze C iz skupine tieno[2,3-b] piridina na postotak epitelno mezenhimalnih CD44+CD24+, epitelnih CD44-CD24+ i luminalno epitelnih CD44-CD24- stanica pozitivnih na glikokonjugat GM3(NeuAc) te prosječni izražaj GM3(NeuAc) po jednoj stanici za svaku od navedenih subpopulacija trostruko negativnog karcinoma dojke.

Materijali i metode: Stanice MDA-MB-231 linije kultivirane su tijekom 48h na četiri načina: bez dodatka inhibitora i/ ili paklitaksela, te uz dodatak samog inhibitora, samog paklitaksela ili njihove kombinacije. Metodom protočne citometrije izmjerena je fluorescencija suspenzija stanica imunobojenih protutijelima na CD44,CD24 i GM3(NeuAc) te analiziran postotak pojedine stanične subpopulacije kao i izražaj GM3(NeuAc).

Rezultati: Inhibitor fosfolipaze je doveo do porasta postotka i izražaja GM3(NeuAc) u CD44+CD24+ te postotka u CD44-CD24- staničnoj subpopulaciji. Samo kod CD44+CD24+ subpopulacije, zapažen je povećani prosječni izražaj GM3(NeuAc) po jednoj stanici. Kombinirani tretman s paklitakselom još je učinkovitije povećao postotak GM3(NeuAc) na svim subpopulacijama.

Zaključci: GM3(NeuAc) glikokonjugat pripada klasi kiselih glikosfingolipida te je opisan kao inhibitor prijenosa signala putem receptora za faktor rasta fibroblasta. Budući da inhibitor fosfolipaze iz ovog istraživanja dovodi do porasta postotka i izražaja GM3(NeuAc) u određenim subpopulacijama zaslužuje daljnja *in vitro* i *in vivo* istraživanja kao mogući antitumorski agens.

9. SUMMARY

Objectives: The aim of the study was to determine the effect of phospholipase C inhibitors from the thieno [2,3-*b*] pyridine group on the percentage of epithelial mesenchymal CD44+CD24+, epithelial CD44-CD24+ and luminal epithelial CD44-CD24-cells positive for GM3 (NeuAc) glycoconjugate and the average expression of GM3(NeuAc) per cell for each of these subpopulations of triple-negative breast cancer.

Materials and methods: Cells of the MDA-MB-231 line were cultured for 48 h in four ways: without the addition of inhibitors and/or paclitaxel, and with the addition of the inhibitor alone, paclitaxel alone, or a combination with both of these. Flow fluorescence of antibody-stained cell suspensions to CD44, CD24 and GM3(NeuAc) was measured by flow cytometry and the percentage of each cell subpopulation as well as the expression of GM3(NeuAc) were analyzed.

Results: The phospholipase inhibitor led to an increase in the percentage and expression of GM3(NeuAc) in CD44+CD24+ and the percentage in the CD44-CD24-cell subpopulation. Only in the CD44+CD24+ subpopulation, an increased average expression of GM3(NeuAc) per cell was observed. Combination treatment with paclitaxel increased the percentage of GM3 (NeuAc) even more effectively in all subpopulations.

Conclusions: GM3(NeuAc) glycoconjugate belongs to the class of acidic glycosphingolipids and has been described as an inhibitor of signal transduction via fibroblast growth factor receptors. Because the phospholipase inhibitor from this study leads to an increase in the percentage and expression of GM3(NeuAc) in certain subpopulations, it deserves further *in vitro* and *in vivo* studies as a possible antitumor agent.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI:

Ime i prezime: Paula Gabrilo

Datum i mjesto rođenja: 08.04.1997., Split

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Kraj 84, Dicmo

E-mail: pgabrilo10@gmail.com

Telefon: +385 95 768 1694

OBRAZOVANJE:

2004.-2012. Osnovna škola "Ante Starčević", Dicmo

2012.-2016. IV gimnazija "Marko Marulić", Split

2016.-2021. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: Farmacija (integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij)

2020.-2021. Privatna jezična gimnazija "Pitagora" (diploma C1 engleski jezik)

RADNO ISKUSTVO:

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

22.02.2021-28.08.2021. Stručno osposobljavanje; Ljekarne SDŽ, Solin

Galenski laboratorij

Analitički laboratorij

VOLONTERSKO ISKUSTVO:

Član CPSA-e (Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske)

POSEBNE VJEŠTINE:

Jezici: talijanski i engleski jezik

Rad na računalu: MS Office, Eskulap 2000

Vozačka dozvola: B kategorija