

# Utjecaj tienopiridinskog derivata i paklitaksela na postotak matičnih stanica karcinoma dojke

---

Čulić, Karolina

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:171:442740>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-12**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



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

**KAROLINA ČULIĆ**

**UTJECAJ TIENAPIRIDINSKOG DERIVATA I PAKLITAKSELA  
NA POSTOTAK MATIČNIH STANICA KARCINOMA DOJKE**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina:**

**2020./2021.**

**Mentor:**

**prof. dr. sc. Anita Markotić**

**Split, prosinac 2020.**

**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 64. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i na 26. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** prof. dr. sc. Anita Markotić  
**Pomoć pri izradi:** prof. dr. sc. Anita Markotić

**Utjecaj tienopiridinskog derivata i paklitaksela na postotak matičnih stanica karcinoma dojke**

Karolina Čulić, broj indeksa 177

**Naslov rada:** Utjecaj tienopiridinskog derivata i paklitaksela na postotak matičnih stanica karcinoma dojke

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog istraživanja bio je otkriti hoće li primjena novosintetiziranog inhibitora fosfolipaze C (PLC) iz skupine tieno [2,3-*b*] piridina smanjiti postotak matičnih stanica (CSC, od engl. *cancer stem cells*) trostruko negativnog tumora dojke na ispitivanoj MDA-MB-231 staničnoj kulturi. Dodatni cilj je bio, u jednakim uvjetima pokusa, usporediti učinak inhibitora s učincima postojećeg lijeka paklitaksela kao i kombinacije inhibitora i paklitaksela.

**Materijali i metode:** Novosintetizirani inhibitor fosfolipaze C, 3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno [2,3-*b*] kinolin-2-karboksamid, primijenjen je na MDA-MB-231 staničnoj liniji trostruko negativnog karcinoma dojke. Nakon tretmana stanica 2  $\mu$ M inhibitorom PLC i/ili 40 nM koncentracijom paklitaksela tijekom 48 sati, fluorescencije uzoraka imunobojenih protutijelima na CD44 i CD24 izmjerene su protočnom citometrijom.

**Rezultati:** Inhibitor je blago, ali statistički značajno smanjio CSC (s  $99,09 \pm 0,53$  na  $96,78 \pm 1,03$ ). Paklitaksel je izazvao statistički neznajno povećanje postotka CSC. Kombinirani tretman inhibitorom i paklitakselom nije utjecao na postotak CSC.

**Zaključci:** Novosintetizirani tieno [2,3-*b*] piridin smanjuje postotak matičnih stanica u MDA-MB-231 staničnoj liniji trostruko negativnog raka dojke što bi moglo predstavljati novi terapijski pristup TNBC. Kombinirani tretman inhibitorom PLC i paklitakselom nije utjecao na postotak CSC, moguće je da se suprotni učinci paklitaksela i inhibitora međusobno poništavaju.

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

**Rad sadrži:** 53 stranice, 1 tablicu, 7 slika i 53 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:** 14.12.2020.

**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 assistance:** Full prof. Anita Markotić, PhD

**The effect of thienopyridine derivative and paclitaxel on the percentage of breast cancer stem cells**

Karolina Čulić, index number 177

**Diploma thesis title:** The effect of thienopyridine derivative and paclitaxel on the percentage of breast cancer stem cells

**The aim of this study:** The aim of this study was to determine whether the newly synthesized phospholipase C inhibitor from the group of thieno[2,3-*b*]pyridine inhibitors reduces the percentage of triple negative breast cancer stem cells (CSC) on the investigated human cell line MDA-MB-231. An additional aim was, under the same experimental conditions, to compare the effect of the inhibitor with the effects of the existing paclitaxel drug as well as the combination of the inhibitor and paclitaxel.

**Methods:** The newly synthesized phospholipase C inhibitor, 3-amino-5-oxo-N-naphthyl-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-*b*]quinoline-2-carboxamide, was administered to MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell line. After cell treatment with 2  $\mu$ M phospholipase C inhibitor and / or with 40 nM concentration of paclitaxel for 48 hours, fluorescences of immunostained samples with antibodies to CD44 and CD24 were measured by flow cytometry.

**Results:** The inhibitor slightly but statistically significantly reduced the percentage of CSC (from 99,09 $\pm$ 0,53 to 96,78 $\pm$ 1,03). Paclitaxel caused a statistically insignificant increase in the percentage of CSCs. The combined treatment with inhibitor and paclitaxel did not affect the percentage of CSC.

**Conclusion:** The newly synthesized thieno [2,3-*b*] pyridine reduces the percentage of stem cells in the MDA-MB-231 cell line of triple-negative breast cancer which could represent a new therapeutic approach to TNBC. The combined treatment with PLC inhibitor and paclitaxel did not affect the percentage of CSC. Therefore, it is possible that the opposite effects of paclitaxel and inhibitors cancel each other out.

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

**Thesis contain:** 53 pages, 1 table, 7 figures and 53 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:** 14.12.2020.

**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

*Veliko hvala mojoj mentorici, prof. dr. sc. Aniti Markotić, što ovom mentorstvu pristupa sa velikim žarom i što zahvaljujući njoj moje obrazovanje dobiva jedan lijep i značajan kraj.*

*Hvala Vam!*

*Jednoj posebnoj osobi hvala na strpljenju i ljubavi tijekom svih, a posebno ovih dugih pet godina. Hvala J. !*

*Mojim prijateljima hvala što su cijelo vrijeme uz mene sa riječima ohrabrenja, motivacije i potpore.*

*Najveće i najtoplije hvala mojoj obitelji, na nesebičnoj podršci tijekom cijelog mog obrazovanja. Na tome, što im nikada ništa nije bilo teško jer za njih tada nije moglo biti ničeg važnijeg. Na tome, što su moji prioriteti postajali njihovi, bez iznimke. Na tome, što su svim srcem stajali uz mene na ovom putu. Hvala!*

## POPIS KRATICA

- A2A receptor: adenzinski receptor A2A podskupine
- AJCC: od engl. *American Joint Commission on Cancer Staging and Results Reporting*
- AKT (3): gen koji kodira RAC-  $\gamma$  serin/treonin-protein kinazu
- ALDH1A1: član A1 obitelji aldehid dehidrogenaze
- AR: androgeni receptor
- ATM: serin/treonin protein kinaza, sudjeluje u kontrolnim točkama staničnog ciklusa
- ATOX1- bakarni metalohaperonski protein
- AZD2281: olaparib
- Bcl-2: od engl. *B-cell lymphoma 2*
- BCSC: od engl. *breast cancer stem cell*; matična stanica raka dojke
- BEZ235: dactolisib
- BLBC- rak dojke sličan bazalnom, BLBC (od engl. *basal-like breast cancer*)
- BRCA1/2: tumor supresorski gen
- CDK (4): od eng. *ciklin dependent kinase*; kinaza ovisna o ciklinu
- CD24: od engl. *cluster of differentiation 24*
- CD44: glikoprotein stanične površine uključen u međustanične interakcije, biljeg CSC
- Chk 1,4: od engl. *checkpoint kinase 1,4*
- CK5/6,14: citokeratinb5/6,14
- c-KIT: protoonkogen, kodira tirozin kinazni receptor
- c-Myc: onkogen, regulira staničnu proliferaciju i apoptozu
- CSC: od eng. *cancer stem cell*; matična stanica raka
- CTLA4: od engl. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*; antigen 4 citotoksičnih T-limfocita
- CYP 17 liaza: enzim koji katalizira sintezu androgena
- DAG: diacilglicerol
- 17-DMAG: alvespimicin
- DMEM: od engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, medij za uzgoj stanica
- DNA: deoksiribonukleinska kiselina
- DNMT1: od engl. *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1*
- DMSO: od engl. *dimethyl sulfoxide*; dimetil sulfoksid
- EGF: od engl. *epidermal growth factor*; epidermalni faktor rasta
- EMT: epitelno-mezenhimalni prijelaz
- ER: od engl. *estrogen receptor*; receptor za estrogen

- ERBB2: HER2 (receptor za humani epidermalni faktor)
- EGFR: od engl. *epidermal growth factor receptor*; receptor za epidermalni faktor rasta
- EU: Europska unija
- FBS: od engl. *fetal bovine serum*; fetalni goveđi serum
- FGFR: od engl. *fibroblast growth factor receptor*; receptor za faktor rasta fibroblasta
- FISH: od engl. *fluorescence in situ hybridization*; fluorescentna *in situ* hibridizacija
- FOXC1: od engl. *the forkhead box C1*
- GRB7: od engl. *growth factor receptor-bound protein 7*, kodira ga GRB7 gen
- G2/M: G2, od engl. *second growth phase*, prijelaz iz interfaze u fazu mitoze (M)
- HER2 ili HER2/neu od eng. *human epidermal growth factor receptor 2*; receptor za humani epidermalni faktor rasta
- HSP90: on engl. *heat shock protein 90*, protein toplinskog šoka 90
- IP3-: od engl. *inositol trisphosphate*, inozitol trifosfat
- JAK: od engl. *the Janus kinase*
- LAR: od engl. *luminal androgen receptor*
- MABC: od engl. *molecular apocrine breast cancer*; molekularni apokrini karcinom dojke
- MAPK- mitogenom aktivirana protein kinaza
- MEK: od engl. *mitogen-activated protein kinase kinase enzyme*; enzim koji fosforilira protein kinazu aktiviranu mitogenima
- mTOR: od engl. *the mammalian target of rapamycin*; meta rapamicina kod sisavaca
- MDA-MB-231: stanična linija trostruko negativnog raka dojke
- NOS: od engl. *not otherwise specified*; bez posebne oznake
- Notch: heterooligomerni transmembranski proteinski receptor uključen u stanično signaliziranje
- NPI: Nottinghamski prognostički indeks
- NST: od engl. *not special type*; ne-specijalni tip
- PBS: od engl. *phosphate-buffered saline*; izotonična otopina fosfatnog pufera s NaCl
- PLC: od engl. *phospholipase C*; fosfolipaza C
- p53: tumorsupresorski protein nazvan po molekulskoj masi od 53 kDa određenoj SDA-PAGE metodom
- PALB2: od engl. *partner and localizer of BRCA2*, protein koji zajedno s BRCA2 pomaže održavanje genoma
- PARP: od engl. *poly (ADP-ribose) polymerase*
- pCR: od engl. *pathological complete response*; kompletan patološki odgovor

- PD-1: od engl. *programmed cell death protein 1*; protein programirane smrti 1
- PD-L1: od eng. *programmed death-ligand 1*
- PI3K: od engl. *phosphoinositide 3-kinases*; fosfoinozimid-3-kinaza
- PIK3CA: od engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*; katalitička podjedinica alfa fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat 3-kinaze
- PKC: od engl. *protein kinase C*; protein kinaza C
- PIP2: od engl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*
- PLC: eng. *phospholipase C*; fosfolipaza C
- PR: eng. *progesterone receptor*; receptor za progesteron
- PTEN: od engl. *phosphatase and tensin homolog*, tumor supresorski gen
- RNA: ribonukleinska kiselina
- Ras: od engl. *rat sarcoma*; protoonkogen, nazvan po otkriću transformirajućeg načela virusa štakorskog sarkoma
- SAR: od engl. *structure-activity relationship*, povezanost aktivnosti i građe
- Src-1: od engl. *steroid receptor coactivator-1*; protoonkogen tirozinska proteinkinaza
- STAT: od engl. *signal transducers and activators of transcription*, prenositelji signala i aktivatori prijepisa gena
- SZO: Svjetska zdravstvena organizacija
- TDP1: od engl. *tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1*; tirozil DNA fosfodiesteraza 1
- TNBC: od eng. *triple-negative breast cancer*; trostruko negativni rak dojke
- TNM klasifikacija: klasifikacija stupnja proširenosti tumora; T-veličina primarnog tumora; N-proširenost u regionalne limfne čvorove; M-metastaze
- TGF-  $\beta$ : od engl. *transforming growth factor  $\beta$* ; transformirajući čimbenik rasta  $\beta$
- TP53: p53, protoonkogen
- UICC: od engl. *International Union Against Cancer*
- VEGFR: od engl. *vascular endothelial growth factor receptor*; receptor za faktor rasta vaskularnog endotela
- WEE1: tirozin kinaza, regulator ulaska stanice u mitozu
- vHTS: od engl. *virtual high throughput screen*, probirom na osnovu računalnog modeliranja
- WNT: od engl. *wingless-related integration site*, glikoproteini izvanstaničnog matriksa koji se vezuje za neke od receptora sparene s G proteinima



# SADRŽAJ

ZAHVALE

POPIS KRATICA

1. UVOD .....	1
1.1. Zloćudni tumori .....	2
1.1.1. Biologija raka i genska osnova .....	3
1.2. Rak dojke .....	4
1.2.1. Etiologija i epidemiologija .....	5
1.2.2. Histološka klasifikacija tumora dojke .....	9
1.2.3. Molekularna klasifikacija .....	10
1.3. Gradus tumora dojke i klasifikacija stupnja proširenosti tumora .....	12
1.4. Trostruko negativni rak dojke .....	14
1.4.1. Kemoterapijske opcije i ciljna terapija .....	15
1.5. Matične stanice raka .....	18
2. CILJ I HIPOTEZA .....	19
2.1. Ciljevi istraživanja .....	20
2.2. Hipoteza istraživanja na staničnim modelima raka .....	20
3. MATERIJALI I METODE .....	21
3.1. Stanična linija i novosintetizirani inhibitor .....	22
3.2. Ustroj istraživanja .....	23
3.3. Određivanje matičnih stanica .....	24
3.4. Statistička analiza rezultata pokusa na staničnim linijama raka .....	25
4. REZULTATI .....	26
4.1. Djelovanje inhibitora na postotak matičnih stanica raka .....	27
5. RASPRAVA .....	28
6. ZAKLJUČCI .....	31
7. CITIRANA LITERATURA .....	33
8. SAŽETAK .....	39
9. SUMMARY .....	41
10. ŽIVOTOPIS .....	43

## **1. UVOD**

## 1.1. Zloćudni tumori

Pojam tumor označava abnormalnu, patološku nakupinu tkiva, bilo malignu ili benignu. Naziva se još i novotvorinom ili neoplazmom. Maligne promjene su one kancerogene ili zloćudne, dok su benigne dobroćudne. Benigni tumori ostaju u području organa u kojem su nastali i oštro su ograničeni. Rak je općeniti naziv za zloćudne tumore. Njihov rast je puno brži, rastu infiltracijski i tako se šire u okolna tkiva, a mogu se proširiti i u druge dijelove tijela. Pojam karcinom podrazumijeva zloćudne promjene odnosno bolesti epitelnih stanica koje oblažu unutarnje slojeve organa i tkiva i nalaze se na njihovoj površini. Tumori koji nastaju iz epitela žljezdanih vodova i žlijezda su adenomi, a maligni tumori žljezdanog porijekla kao što su karcinomi epitelnih dijelova dojke nazivaju se adenokarcinomima (1).

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, broj oboljelih od raka u kontinuiranom je porastu. Jedan od razloga je duži životni vijek, međutim, iako se to najčešće pripisuje starenju stanovništva, dobno standardizirana stopa incidencije pokazuje porast koji nije ovisan o trendu starenja stanovništva. Rak je u Hrvatskoj drugi uzrok smrti (27 % smrtnosti) nakon kardiovaskularnih bolesti. Najčešći oblici raka u 2017. godini, poredani od najveće incidencije prema manjoj, kod muškaraca su: rak prostate, pluća, debelog crijeva, mokraćnog mjehura, želuca, bubrega i melanom. Kod žena je najčešći karcinom dojke pa kolorektuma, pluća, maternice, štitnjače, jajnika, jajovoda i adneksa te rak gušterače. Muškarci najviše umiru od raka pluća, debelog crijeva i prostate, a žene od raka debelog crijeva, pluća i raka dojke (2). Prema svjetskom populacijskom istraživanju CONCORD-3, u kojem je sudjelovala i Hrvatska, preživljenje od raka poboljšava se u svijetu, ali se razlikuje ovisno o sijelima raka. Ipak, Hrvatska je s preživljenjem od raka debelog crijeva i dojke u donjoj trećini zemalja Europe (3).

### 1.1.1. Biologija raka i genska osnova

Zloćudna pretvorba je model po kojem se ponašaju sve stanice raka, a podrazumijeva gubitak sposobnosti prikladnog odgovora stanica na stanično signaliziranje u određenom trenutku. Stanice se uobičajeno mijenjaju u zloćudne genskim mutacijama zbog čega se rak opisuje i kao genska bolest. Posljedica zloćudne preobrazbe stanica je njihova nekontrolirana dioba i formiranje nakupine koju nazivamo rak. Mutacije mogu biti nasljedne, ali češće su somatske (djelovanje mutagena na somatske stanice ili pogreške prilikom DNA replikacije). Dijelimo ih još i na pokretačke (unutar gena koji su povezani s rakom npr. tumorsupresorski geni, onkogeni), kao i usputne koje nisu toliko važne za sam nastanak raka. Onkogeni nastaju kada se promijene normalni geni stanice koji reguliraju rast, proliferaciju, diobu stanice i diferencijaciju. Time se i sam život stanice promijeni tako da proteinski produkti protoonkogeni (normalnih staničnih gena) ili oni sami postaju aktivniji. Primjer aktivacije onkogeni je genska amplifikacija HER2/neu kod tumora dojke. Tumor supresorski geni razlikuju se od onkogeni utoliko što su kod njih inaktivacija ili kompletni gubitak gena ili njihovih produkata neposredno povezani s nastankom raka. Najčešće je potrebna inaktivacija obaju alela, a do nje mogu dovesti, uz mutacije, i epigenetičke promjene. Primjer ovog slučaja je p53, tumor supresorski gen koji osigurava popravak oštećene DNA prije replikacije ili apoptozu stanice kada nije moguće izvršiti popravak. Njegovom inaktivacijom ili gubitkom, stanica s oštećenom DNA ulazi u fazu diobe što može dovesti do nastanka raka, a ima važnu ulogu i u angiogenezi tumora. Kod raka je čest izostanak regulacije faza staničnog ciklusa uzrokovan promijenjenim genima. Sve ovo vodi ka genomskoj nestabilnosti koja je važna odlika raka i omogućuje mu daljnje napredovanje, zbog veće vjerojatnosti da će u jednoj stanici doći do više mutacija. Mutacije koje bi inaktivirale gene skrbnike, koji inače čuvaju stabilnost genoma, idu u prilog nastanku raka. Primjer ovih gena su BRCA1 i BRCA2 čije su promjene povezane s rakom dojke i jajnika. Stanice raka ujedno često imaju i poremećen broj kromosoma kao posljedicu pogrešnog kromosomskog razdvajanja tijekom mitoze.

Nastanak raka iz zdravog tkiva zove se tumorska progresija. Temelj progresije je klonalna evolucija koja direktno ukazuje na heterogenost raka. Naime, tijekom vremena, nagomilavanjem mutacija unutar stanica raka, formiraju se različiti klonovi. Tumorsku progresiju možemo bolje razumjeti ako pogledamo matične stanice tumora. One su po svojim karakteristikama slične samim matičnim stanicama i čine manji broj stanica raka. No od iznimnog su značaja jer se smatra da samo one, zbog mogućnosti samoobnove i diferenciranja, mogu, ako se presade, u novom domaćinu potaknuti razvoj raka. Također, dokazi ukazuju i na

monoklonalno porijeklo raka što znači da je za nastanak raka dovoljna zloćudna transformacija jedne stanice koja je bila zdrava. Osim mutacija, pojava raka povezuje se i s epigenetičkim promjenama, s mikro-RNA te poremećajem mehanizma telomera. Primjerice, dioba stanica pokreće se nakon skraćivanja telomera na određenu dužinu.

Sve tipove raka karakterizira mogućnost neograničene proliferacije, neosjetljivost na inhibirajuće signale rasta, izbjegavanje apoptoze, angiogeneza tumora, samodostatnost koja je uočljiva u signalima rasta te vlastita sposobnost presađivanja i invazije u organizmu. Također, rak ima i dodatna obilježja kao što su nastanak upale, izbjegavanje imunološke reakcije organizma, promijenjen stanični metabolizam i genomska nestabilnost (4).

## **1.2. Rak dojke**

Rak dojke je heterogena skupina bolesti različitih histoloških, morfoloških i molekularnih osobitosti i stoga je povezana s različitim ishodima liječenja i stopom preživljenja (5). Jedan je od tri najčešća tumora u svijetu, a najčešća je maligna bolest kod žena. Tumor dojke koji se rano otkrije smatra se potencijalno izlječivim u 70 – 80 % slučajeva, ako se ne radi o metastatskom tumoru (6,7). Iako 70 do 80 % karcinoma pripada skupini invazivnih duktalnih tumora dojke ne-specijalnog tipa, pokazuju visoku varijabilnost unutar skupine (5). Terapijski koncepti trebaju biti razmotreni multidisciplinarno, a važno je pritom uzeti u obzir područje zahvaćenosti tumorom i molekularne podtipove. Ovisno o tome, biraju se pristupi kao što je kirurgija i radijacijska terapija ili sistemsko liječenje (6,7). Tako je u trostruko negativnom i HER2 pozitivnom tumoru dojke neoadjuvantna terapija danas terapija izbora što ovisi o kliničkom podtipu tumora, dok je kod tumora s metastazama cilj liječenja produljenje života (6).

### 1.2.1. Etiologija i epidemiologija

Uvriježeno je mišljenje da zloćudne stanice nastaju nakupljanjem velikog broja oštećenja i to oštećenja supresorskih gena i antionkogena. Općenito se ta oštećenja mogu, zbog prisutnosti u zametnim stanicama, genski prenositi potomstvu ili nastati i akumulirati se tijekom života. Ovisno o utjecaju pojedinih okolišnih faktora govorimo o kemijskoj karcinogenezi, zatim biološkoj i fizikalnoj. Različite endogene i egzogene tvari koje mogu zloćudno preobraziti stanice nazivaju se kemijskim karcinogenicima. Njihov učinak je genotoksičan ako dolazi do oštećenja DNA ili negenotoksičan ukoliko do toga ne dolazi, ali se pojačava učinak genotoksičnih tvari. Fizikalna karcinogeneza odnosi se na oštećenje DNA elektromagnetskim valovima različite frekvencije, a primarno pod tim mislimo na ionizirajuće i elektromagnetsko zračenje. Pod pojmom biološka karcinogeneza podrazumijevamo mnoge viruse koji se, zbog sposobnosti integracije virusnog genoma u čovjekov, ponašaju kao aktivacijski čimbenici tumorske patogeneze. Dijele se na RNA i DNA viruse.

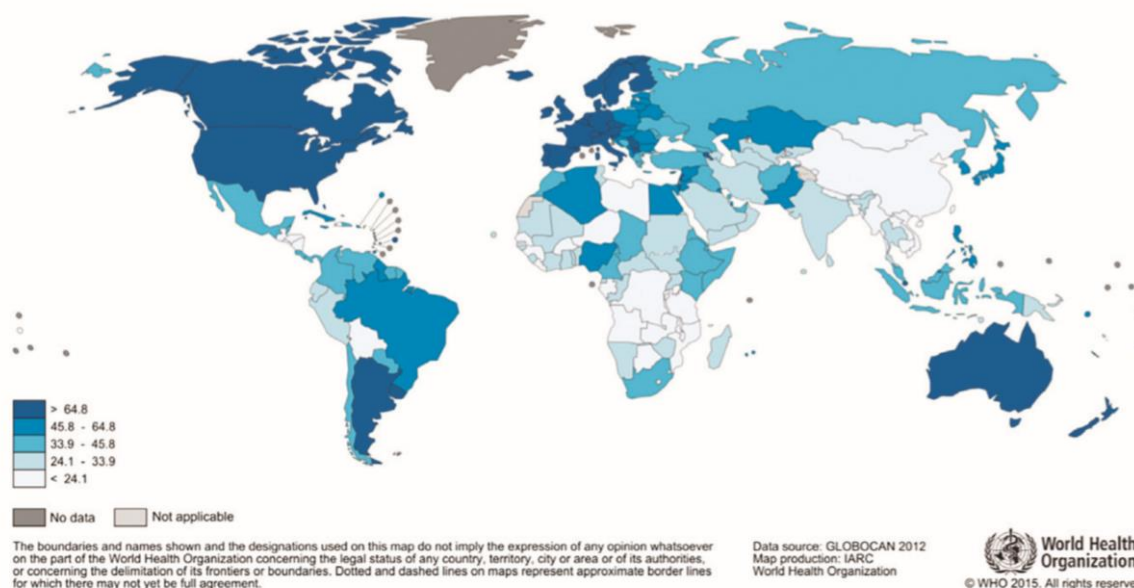
Vremenom su određeni čimbenici dovedeni u vezu s procesom nastanka raka dojke. Nabrojiti ćemo ih od višeg relativnog rizika za nastanak raka dojke, povezanog s tim rizičnim čimbenikom, prema nižem: starija životna dob, porodična anamneza, kasniji prvi porođaj, nerotkinje, rana prva menstruacija kao i kasnija menopauza, zračenje, pretilost, uzimanje oralnih kontraceptiva, hormonsko nadomjesno liječenje i prethodno dijagnosticirane parenhimatozne bolesti dojke. Dob je najznačajniji čimbenik rizika jer je uočeno da učestalost pojave raka dojke počinje značajnije rasti s dobi i to od 35. do 40. godine, a nakon toga dolazi do kontinuiranog rasta incidencije. Relativni rizik za nastanak raka dojke ovisno o starijoj životnoj dobi procjenjuje se na 15 puta. Žene s pozitivnom obiteljskom anamnezom raka dojke imaju 8 puta veći relativni rizik za pojavu raka dojke u odnosu na žene bez takve anamneze. U vezu s ovim tumorima dovedene su mutacije dvaju supresorskih gena – BRCA1 i BRCA2, ali i neki drugu geni, kao što su TP53, PALB2, ATM i PTEN mogu biti čimbenici nastanka raka dojke koji karakteriziramo kao nasljedni rak dojke. Starija životna dob prvorodilje nosi sa sobom relativni rizik od 4 puta u odnosu na žene koje su prvi put rodile između 20. i 25. godine. Ranija trudnoća kao i veći broj porođaja imaju protektivnu ulogu zbog manje izloženosti estrogenu. Nerotkinje, u odnosu na roditelje, imaju 4 puta veći relativni rizik za nastanak raka dojke. Žene koje su imale raniju prvu menstruaciju ili imaju kasnu menopauzu imaju 2 - 3 puta veći relativni rizik povezan s duljim razdobljem djelovanja estrogena. Što se tiče izloženosti zračenju, relativni rizik je veći ukoliko je veća doza zračenja, kao i kada se ioniziranim zračenju izlažu mlađe žene, bilo da se radi o dijagnostičkom ili terapijskom zračenju. Relativni rizik tada

je veći 5 puta. Pretilost je još jedan rizični čimbenik koji sa sobom nosi relativni rizik od 3 puta u odnosu na žene normalne tjelesne težine. Također je povezan s estrogenskom izloženošću jer u razdoblju postmenopauze estrogen nastaje u masnom tkivu djelovanjem enzima aromataze na testosteron sintetiziran iz androgena kore nadbubrežne žlijezde (8). Također, korištenje oralnih kontraceptiva u ranijoj dobi, do 25 godine, kao i njihova dulja primjena (više od 4 godine) nosi relativni rizik od 1,52 puta, a povećava vjerojatnost pojave raka za 52 %. Liječenje hormonskom nadomjesnom terapijom dovodi do relativnog rizika od 1,36, čime se povećava rizik pojave raka za 36 %. Kao kod primjene oralnih kontraceptiva, i kod hormonske nadomjesne terapije važna je procjena koristi za uklanjanje tegoba i rizika koje ta terapija nosi. Prethodno dijagnosticirane parenhimatozne bolesti dojke kao što su atipična duktalna hiperplazija i papilomi također povećavaju rizik pojave raka dojke, 5 i 2 puta, odnosno.

Epidemiologija nam govori o pojavnosti raka kao i o njegovoj povezanosti s nekim čimbenicima u određenoj populaciji i na nekom prostoru. Najvažniji pojmovi su incidencija (broj novooboljelih u populaciji), prevalencija (broj svih oboljelih u populaciji u određenom vremenu), mortalitet (broj umrlih unutar populacije) i letalitet (broj umrlih u odnosu na broj oboljelih) (4).

Najniža incidencija raka dojke zabilježena je u središnjoj Africi (26,8 na 100 000 žena), istočnoj Aziji (27,0) i jugu srednje Azije (28,2), a najveća incidencija u sjevernoj Americi (91,6), zapadnoj (91,1) i sjevernoj Europi (89,6). Dobno-standardizirana stopa incidencije u razvijenim regijama je 73,4 na 100 000 žena, dok je ta vrijednost u niskorazvijenim zemljama 31,3 (Slika 1). Incidencija raka dojke povećava se s dobi, a rak dojke je najčešći u dobi od 65-69 godina (9).

### ▲ Estimated Breast Cancer Incidence Worldwide in 2012



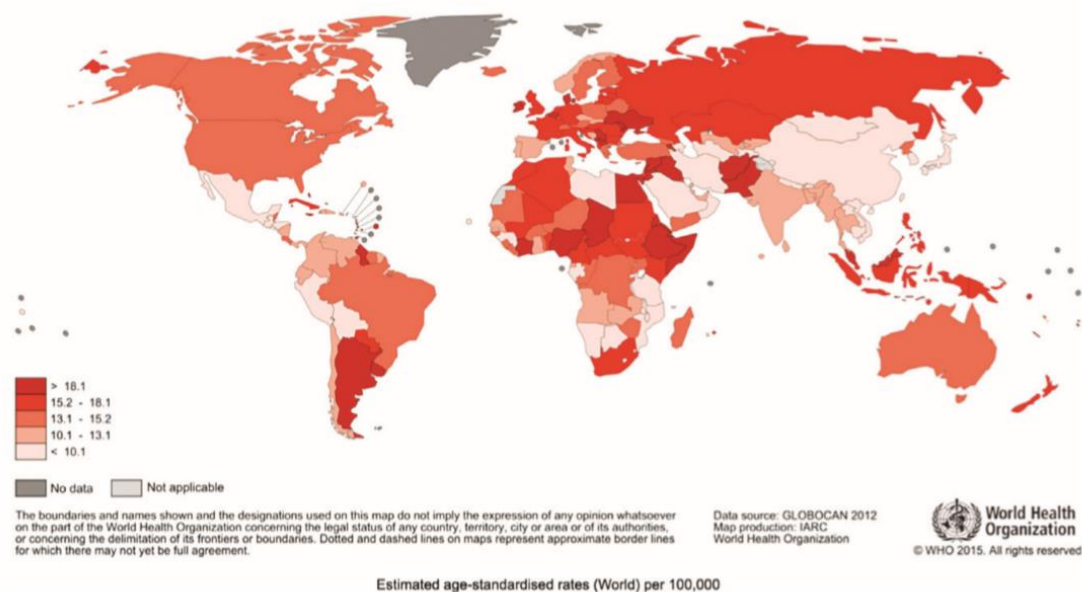
**Slika 1.** Globalna raspodjela dobno-standardizirane incidencije raka dojke na 100000 žena u 2012. From Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet ]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Dostupno na:

[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx.4](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.4)

Ako pogledamo mortalitet, rak dojke je kod žena najčešći uzrok smrti u 101 državi (10). Najviše stope mortaliteta zapažene su u zapadnoj Africi (20,1 na 100 000 žena), a najniže stope na istoku Azije (6,1) i u centralnoj Americi (9,5) (Slika 2). U Aziji je zabilježeno približno 44 % smrti uzrokovanih rakom dojke, dok je to u Europi i sjevernoj Americi oko 35% . U Africi je viša dobno standardizirana stopa smrtnosti, dok je omjer umrlih godišnje u prosječnoj populaciji puno niži u Africi nego u Sjevernoj Americi i Europi. Smrtnost raste također s godinama pa tako žene najviše umiru u dobi od 55-59 i iznad 75. godine (medijan u svijetu je 60-64 godine). U razvijenijim državama petogodišnja stopa prevalencije je 4 puta veća, a najviša je zabilježena u zapadnoj Europi (767,1) i Sjevernoj Americi (744,5) (9,10).



### ▲ Estimated Breast Cancer Mortality Worldwide in 2012



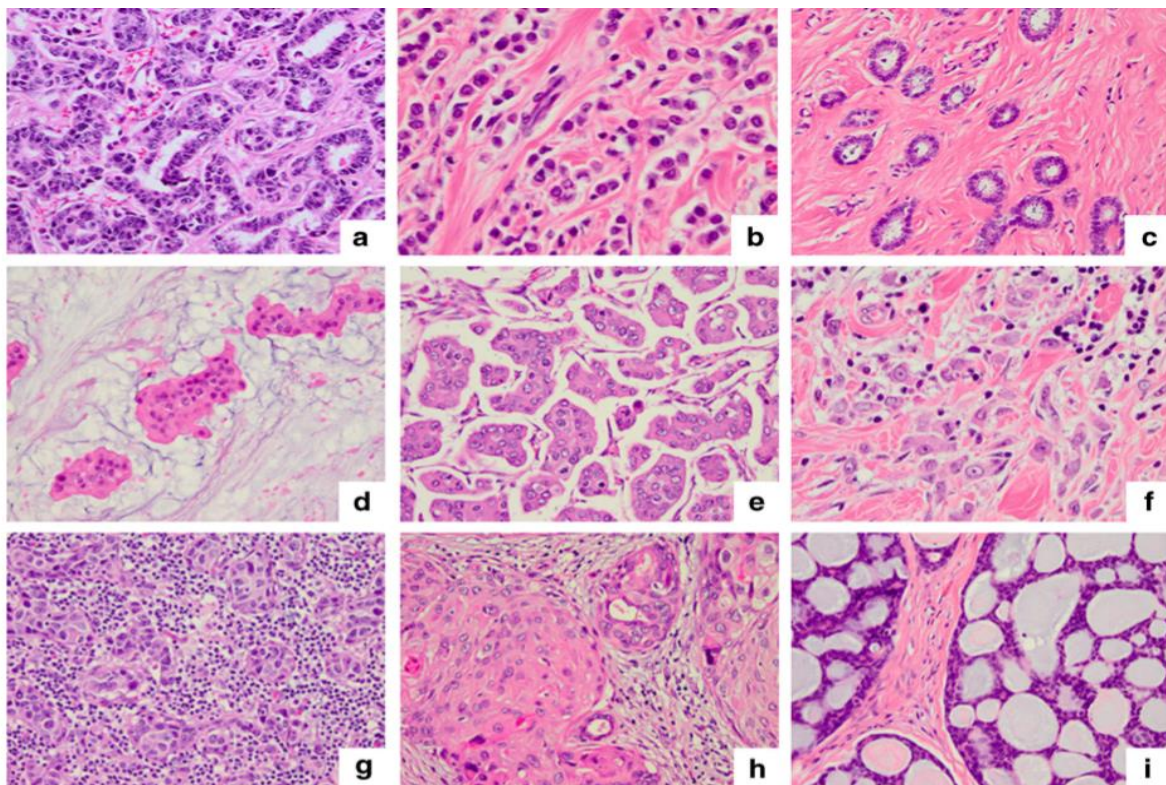
**Slika 2.** Globalna raspodjela dobno-standardizirane stope mortaliteta od raka dojke na 100 000 žena u 2012. From Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Dostupno na: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx.4](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.4)

Prema dostupnim podacima incidencija i mortalitet od raka dojke u nekim su visoko razvijenim zemljama dosegle vrhunac i sada se smanjuju, dok su u nisko razvijenim zemljama svake godine u porastu. Ovi podaci objašnjavaju se poboljšanim metodama detekcije i ranim otkrivanjem u razvijenim zemljama, kao i razlikama u dostupnosti pojedinih metoda liječenja i dijagnostike među zemljama (10,11).

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo broj oboljelih od raka kontinuirano raste i to je drugi uzrok smrti (27 % smrtnosti) u Hrvatskoj. Kod žena je, prema podacima Registra za rak, za 2017. godinu rak dojke najčešće sijelo raka (25 %) i to kod žena od 30. godine pa nadalje, kao i jedan od najčešćih uzroka malignih smrti u Hrvatskoj. Upravo ovi podaci ukazuju na važnost primarne prevencije i ranog otkrivanja raka dojke (2). Na razini EU rak dojke spada u najčešće dijagnosticiranu malignu bolest. Procjenjuje se da će u 2020. godini dijagnoza raka dojke obuhvaćati 13,3 % dijagnoza raka. Stopa smrtnosti veća je u istočnoeuropskim zemljama, dok nordijske zemlje imaju veću stopu incidencije. Po razini incidencije raka Hrvatska je na razini EU, međutim po smrtnosti smo na 2. mjestu kod muškaraca i 7. kod žena (3).

### 1.2.2. Histološka klasifikacija tumora dojke

Tumori mogu nastati iz epitela, što je učestalije, ili iz strome. Karcinomi dojke spadaju u epitelne, zloćudne tumore, a skoro svi su adenokarcinomi. Obzirom na invazivnost razlikuju se invazivni, mikroinvazivni i neinvazivni oblici (1). Neinvazivni karcinomi dojke (*in situ*) imaju očuvanu bazalnu membranu, a s obzirom na područje na koje su ograničeni mogu biti duktalni i lobularni. Intraduktalni karcinomi nastaju proliferacijom zloćudnih stanica epitela u kanalićima tkiva. Intralobularni karcinom je rijedak, makroskopski se često ne uočava, a mikroskopski se unutar lobula nalaze zloćudne stanice s okruglim jezgrama (1,12). Mikroinvazivna skupina karcinoma odnosi se na duktalne karcinome s neodržanom bazalnom membranom kanalića, čime dolazi do invazije okolnog tkiva (< 0,1 cm debljine). Rijetko se dijagnosticiraju. Skupina invazivnih karcinoma dojke nastaje u terminalnoj duktulo – lobularnoj jedinici, iz epitelnog tkiva. Na slici 3 prikazane su morfolološke varijante invazivnih karcinoma dojke (13).



**Slika 3.** Morfološki prikaz invazivnih karcinoma dojke: a) invazivni karcinom ne-specijalnog tipa, b) lobularni tip, c) tubularni tip, d) mucinozni tip, e) mikropapilarni karcinom, f) pleomorfnu lobularni karcinom, g) medularni tip, h) metaplastični karcinom, i) adenoidni cistični karcinom (13).

Približno 80 % karcinoma unutar skupine invazivnih karcinoma dojke su invazivni karcinomi dojke ne-specijalnog tipa (NST, od engl. *not special type*) ili bez posebne oznake (NOS, od engl. *not otherwise specified*). To je heterogena skupina koju ne možemo na temelju karakteristika svrstati u neku od kategorija. Mikroskopski je građen od epitelnih stanica koje su atipične, često okružene čvrstom stromom. Makroskopski se uočava kao čvrsta kvržica.

Oko 10 % dijagnoza čini lobularni tip invazivnog karcinoma i čine ga najčešće tračci raspršenih tumorskih stanica, obično oko očuvanih kanalića. Nepravilnog je oblika, ne izaziva dezmodoplastičnu reakciju pa se ne može napipati, teško se identificira i obično se otkrije u kasnom stadiju. Preostalih 10 % karcinoma dojke odnosi se na tzv. posebne oblike raka dojke, jedinstvenih karakteristika i patoloških obilježja, kao što su: karcinom s medularnim obilježjima, Pagetova bolest bradavice, mucinozni karcinom, papilarni i tubularni invazivni karcinom (1).

### 1.2.3. Molekularna klasifikacija

Prema novijoj podjeli, tumore dojke pozitivne na estrogenske receptore dijelimo na luminalne tumore A i B. Luminalni A tip je niskog gradusa (stupnja diferenciranosti), nema izražaj receptora za humani epidermalni faktor rasta HER2 (od engl. *human epidermal growth factor receptor*), visoke razine progesteronskih receptora, a postotak biljega proliferacije Ki-67 niži je od 20 %. Luminalni B tip, za razliku od tipa A, slabije izražava progesteronski receptore (PR pozitivan ili negativan), Ki-67 indeks je viši od 20 %, višeg je gradusa, a najčešće je HER2 pozitivan, ali ne mora biti (14). Pacijenti koji boluju od luminalnog tumora A tipa imaju veće izgleda za preživljenje s obzirom na njihov nizak gradus (13,14). Ranije su tumori bili klasificirani prema intrinzičnim podtipovima: luminalni (novija podjela na A i B podtipove); tumori negativni na estrogenski receptor (ER), HER2 pozitivni (luminalni HER2 pozitivni i HER2 obogaćeni), tzv. sličan bazalnom (od engl. *basal-like*) i tzv. sličan normalnom tkivu (od engl. *normal-like*) (15). Podtip obogaćen receptorom HER2 specifičan je zbog niske prisutnosti ili potpune odsutnosti ekspresije estrogenskih receptora, kao i nekih drugih transkripcijskih čimbenika karakterističnih za luminalne odnosno ER pozitivne tumore, dok ima visoku ekspresiju ERBB2 i GRB7 gena. Trećina tumora ovog podtipa imaju mutaciju katalitičke podjedinice alfa fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat 3-kinaze, PIK3CA (od engl.

*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*), a dvije trećine imaju mutaciju p53 i aktivirane signalne putove koji uključuju tirozin kinazne receptore (16,17).

Tumori negativni na ER su zbog svoje varijabilnost nešto teži za liječenje (13). Tumori podtipa sličnog bazalnom pokazuju najveću varijabilnost u vrsti mutacija, histopatološkim nalazima, imaju različitu sposobnost metastaziranja, a time i jako različit odgovor na liječenje i stopu preživljenja (13,18). Ovaj podtip eksprimira citokeratine visoke molekulske težine kao što su CK 5/6 i 14, kao i c- KIT, EGFR, FOXC1, a česta je i mutacija TP53. Jako je agresivan jer ima visok proliferacijski indeks i najčešće je gradusa 3. Kako bi se mogle definirati terapijske mete, važno je unutar ove raznolike skupine odrediti podtipove jer različito odgovaraju na kemoterapiju (14). Postoji i neklasificirani podtip trostruko negativnog raka dojke koji je negativan na CK5 i EGFR, rijetko je povezan s BRCA1 mutacijom. Kod njega je šansa za preživljenjem bolja u odnosu na karcinom sličan bazalnom (16).

Tumori koji su ER i PR negativni mogu biti HER2 pozitivni ili trostruko negativni. HER2 pozitivni tumori imaju više podtipova o čemu ovise i ishodi liječenja (13). Podtip sličan normalnom je diskutabilna skupina koju mnogi autori ne svrstavaju u pravu intrinzičnu podskupinu, a karakterizira ju ekspresija gena svojstvena masnom tkivom i stromalnim stanicama, kao i odsutstvo ekspresije estrogenskih receptora i HER2 (16,19).

Identificirani su još neki podtipovi kao što je skupina s niskim sadržajem kladina (od engl. *claudin-low*), skupine povezane s apokrinskom (molekularni apokrini karcinom dojke, MABC, od engl. *molecular apocrine breast cancer*) i interferonskom funkcijom. MABC ili apokrini rak dojke naziva se tako zbog svoje apokrine histologije. To su tumori pozitivni na androgene receptore (AR), negativni na prisutnost estrogenskih receptora, a mogu biti trostruko negativni ili pozitivni na HER2 (16). Kod tumora s niskom razinom kladina zabilježena je odsutnost luminalnih markera (16,20). Obično izazivaju imunološki odgovor, svojstva stanica odgovaraju onim matičnih stanica tumora i obično su trostruko negativni. Stopa preživljenja je niža od one kod luminalnih tumora, a viša od one kod tumora sličnih bazalnom (13,19).

### 1.3. Gradus tumora dojke i klasifikacija stupnja proširenosti tumora

Uz patohistološki nalaz važno je odrediti i histološki gradus tumora koji predstavlja opis diferencijacije tumorskih stanica kojim se određuje agresivnost tumorskog tipa, kao i prognoza kod malignih tumora. Samim time, o gradusu tumora ovisi i terapijski odabir. Kombinacijom histološkog tipa i gradusa, uz još neke prognostičke čimbenike, moguća je bolja procjena (21). Najvažniji prognostički čimbenici su histološki izgled limfnih čvorova, kao i veličina samog tumora što je obuhvaćeno NPI indeksom (Nottinghamski prognostički indeks) (22). Karcinomi dojke graduiraju se po preporuci Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) prema Scarff-Bloom-Richardsonovom sustavu odnosno prema Elson i Ellisovoj modifikaciji koristeći tri osobine tumora: formiranje tubula, nuklearni polimorfizam i broj mitoz. Za svaku osobinu zbrajaju se bodovi, a gradus se određuje prema konačnom zbroju bodova: gradus 1 - dobro diferencirani tumori (3-5 bodova), gradus 2 - srednje diferencirani tumori (6-7 bodova), gradus 3 - slabo diferencirani tumori (8-9 bodova). Kod slabije diferenciranih tumora, prognoza je u pravilu lošija, stanice se brzo dijele i ne nalikuju na normalne stanice. Dobro diferencirani tumori izgrađeni su od stanica koje slične normalnim, imaju oblik cjevčica i sporo rastu (23,24).

Kako bi se izabralo najprikladnije liječenje, važno je izvršiti TNM klasifikaciju stupnja proširenosti tumora. Uz nalaze fizikalnog pregleda, TNM klasifikacija uključuje nalaze dobivene različitim dijagnostičkim metodama kao što su mamografija, ultrazvuk, magnetska rezonanca, biopsija i punkcija. Ovaj način stupnjevanja prihvatili su i UICC (International Union Against Cancer) i AJCC (American Joint Commission on Cancer Staging and Results Reporting) (24,25).

Oznake u TNM klasifikaciji stupnja proširenosti tumora odnose se na primarni tumor i njegovu veličinu (T1-T4), stupanj zahvaćenosti limfnih čvorova (N1-N3), i metastaze (M0 i M1), kako je navedeno u Tablici 1 (26).

**Tablica 1. TNM klasifikacija i stadiji karcinoma dojke prema AJCC (26,4)**

0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3	N2	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	svaki T	N3	M0
IV	svaki T	svaki N	M1

**T- veličina primarnog tumora:**

TX: tumor se ne može odrediti

T0: tumor nije dokazan

TiS: *in situ* karcinom (duktalni, duktalni u podležecem parenhimu ili Pagetova bolest bradavice koja nije povezana s invazivnim oblikom karcinoma)T1: tumor  $\leq 2$  cm

T2: tumor &gt; 2cm, ali u najvećem promjeru ne veći od 5cm

T3: tumor u najvećem promjer &gt; 5cm

T4: tumor bilo koje veličine koji invadira kožu ili se širi na stijenku prsnog koša

**N- proširenost u regionalne limfne čvorove:**

Nx: ne može se procijeniti

N0: nema identificiranih metastaza u u limfnim čvorovima

N1: metastaze u do 3 aksilarna limfna čvora

N2: metastaze u 4-9 aksilarnih limfnih čvorova

N3: metastaze u 10 ili više limfnih čvorova

**M- udaljene metastaze:**

Mx- postojanje metastaza ne može se odrediti

M0: nema klinički ili radiološki dokazanih metastaza

M1: dokazana je prisutnost udaljenih metastaza

#### 1.4. Trostruko negativni rak dojke

Trostruko negativni rak dojke karakterizira odsutnost ekspresije estrogenskih i progesteronskih receptora, kao i odsutnost HER2 (prekomjerne ekspresije ili amplifikacije gena ili obiju karakteristika) (16,27). Radi se obično o tumorima visokog gradusa, s višim rizikom povratka bolesti i smrtnosti nakon 3-5 godina od postavljanja dijagnoze (28). Dijagnoza trostruko negativnog raka dojke, TNBC (od engl. *triple negative breast cancer*) postavlja se na temelju imunohistokemijske obrade, kako bi se saznale informacije o prisutnosti ER i PR, kao i pomoću imunohistokemije i/ili fluorescentne *in situ* hibridizacije kako bi se vidjela ekspresija HER2.

TNBC je histološki najčešće (95 %) duktalni karcinom ne-specijalnog tipa (29). Ipak, to mogu biti, puno rjeđe, tumori specijalnog tipa kao što su karcinomi s medularnim karakteristikama, sekretornim karakteristikama, adenoidni cistični karcinom i metaplastični karcinom (14,30). Podtip sličan bazalnom predstavlja najčešći podtip TNBC (55-81 %) (31). Ima visoko eksprimirane genske osobine bazalnih stanica epitela dojke, a njemu pripada 15 % svih upalnih tumora dojke. Obično su visokog gradusa, veliki, nepravilnih rubova, velike mogućnosti ponovnog povratka, kao i metastaziranja u distalne visceralne organe, najčešće unutar 5 godina. Većina vrsta bazalnog tumora dojke (82 %) ima mutaciju za p53 i većinom su pozitivni na keratin 5,6 i 17. Ova skupina je jako heterogena u svojim histološkim osobinama, mutacijama, metastaziranju kao i u odgovoru na kemoterapiju. Samo poneki karcinomi iz ove podskupine imaju dobru prognozu i niskog su gradusa npr. sekretorni karcinom i adenoidni cistični karcinomi (16,30). Važna im je karakteristika i trostruka negativnost, ali je za diferencijaciju najbolje napraviti još i testove na EGFR i CK5/6 (16).

Lehman *et al.* podijelili su trostruko negativni rak dojke u sljedeće podskupine: imunomodulatorni, podtip sličan bazalnom 1 i 2, podtip s luminalnim androgenim receptorima, mezenhimalni i mezenhimalni sličan matičnim stanicama (engl. *stem-like*). S obzirom na svoje specifičnosti, različito odgovaraju na kemoterapiju (32). Tumori podtipa sličnog bazalnom 1 na liječenje odgovaraju 52 %, dok slični bazalnom 2 i tumori s luminalnim androgenim receptorima odgovaraju u jako niskim postocima (do 10%) (33). Postoji i mala skupina trostruko negativnog raka dojke koja je negativna na CK5 i EGFR, rijetko je povezana s BRCA1 mutacijom. To je takozvani neklasificirani podtip kod kojeg pacijenti imaju bolju šansu za preživljenjem u odnosu na karcinom sličan bazalnom (16).

Još neke skupine koje su kasnije identificirane, spomenute u poglavlju „Molekularna klasifikacija“ mogu pokazivati trostruku negativnost, primjerice tumori s niskom razinom kladina i apokrini tumori dojke (16,20).

TNBC je zloglasan zbog svoje sposobnosti napadanja mladih žena, metastaziranja čak i pri optimalnom adjuvantnom liječenju što sa sobom nosi i loše ishode. Posljednjih godina, kombinirana terapija lijekovima dovela je do značajnog poboljšanja ishoda liječenja (27). Ono što predstavlja izazov kod ovog tipa karcinoma je da za njega trenutno nema ciljane terapije pa se istražuju potencijalne mete liječenja (16, 29).

#### **1.4.1. Kemoterapijske opcije i ciljna terapija**

Iako netretirani trostruko negativni rak dojke nosi sa sobom veći rizik od rekurencija, TNBC pokazuje jači odgovor na kemoterapiju u odnosu na druge karcinome dojke (29). Neoadjuvantna terapija smatra se standardom kod lokalnih kao i inoperabilnih TNBC jer takvi tumori, u usporedbi s luminalnim, imaju veću mogućnost postizanja kompletnog patološkog odgovora takvom terapijom, a na temelju pCR (od engl. *pathological complete response*) može se unaprijed predvidjeti preživljenje, kao i daljnje liječenje (kirurško ili adjuvantno). Obično se pristupa liječenju antraciklinima i taksanima, dok se alkilirajući agensi često koriste u kombinacijama (27). Od pacijenata koji u ranoj fazi TNBC primaju terapiju antraciklinima i taksanima, 30-40 % postiže pCR, a odgovori na kemoterapiju su općenito viši u odnosu na ostale karcinome dojke (29). Paklitaksel je jedan od članova skupine taksana koji se često koristi kao standardna terapija TNBC. Djeluje izazivajući apoptozu uzrokovanu vezanjem za mikrotubule i sprječavanjem njihovog razdvajanja, ali je njegova meta i mitohondrij i inhibicija Bcl-2 proteina koji inhibira apoptozu. Ipak, postoje slučajevi koji ukazuju na mogućnost stjecanja otpornosti na ovaj lijek (34). Prema novijim istraživanjima potencijalni uspjeh u terapiji primarnog TNBC pokazuje terapija paklitakselom kombinirana s nintedanibom, (35). Danas se u studijama ispituje djelovanje monoklonskih protutijela kao što su protutijelo na protein programirane smrti 1, PD-1 (od engl. *programmed cell death protein 1*), na PD-L1 (od eng. *programmed death-ligand 1*) i protutijelo na antigen 4 citotoksičnih T-limfocita, CTLA 4 (od engl. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*). Također, imunoterapija pokazuje značajan pomak u liječenju, pogotovo kombinirana s antraciklinima i taksanima (27, 29). Kod metastatskog TNBC očekuje se lošiji ishod, a sistemsko liječenje podrazumijeva kombinaciju taksana ili



antraciklina. Ranije faze detektiranog trostruko negativnog raka dojke smatraju se osjetljivim na kemoterapiju. Usprkos tome terapijski režim koji bi bio adekvatan i optimalan i dalje nije definiran (27).

Nekoliko potencijalnih meta identificirano je u studijama, a fokus je stavljen na mehanizme popravka DNA, polimerazu za homologni popravak, protein kinaze (serin/treonin), angiogenezu, rast, proliferaciju i preživljenje omogućene PI3K/mTOR signalnim putem, receptore čimbenika rasta, Ras/MAPK, Notch/  $\gamma$  sekretazu i hormonske receptore (29,36). Kemoterapeutici djeluju citotoksično različitim mehanizmima, a nekima od njih meta je odgovor na oštećenja DNA koji u tumorskim stanicama često bude izmijenjen. Poznato je da je u skoro 20 % trostruko negativnih tumora dojke pronađena mutacija BRCA1/2 gena koji je uključen u popravak oštećenja DNA homolognom rekombinacijom (36). Tako je kombinacija PARP inhibitora koji blokiraju alternativne mehanizme popravka DNA (olaparib/AZD2281) i cisplatina/karboplatina produljila životni vijek pokusnih miševa. Više doze samostalnog inhibitora pokazale su bolji učinak, ali se ipak javila rezistencija kod nekih pacijenata (36,37). Soli platine (cisplatin, karboplatin) također pronalaze svoje mjesto u pretkliničkim i kliničkim podacima o djelovanju na TNBC. Njihovo djelovanje bazira se na apoptozi uzrokovanoj pucanjem dvostruke DNA zavojnice stanica koje pokazuju genomsku nestabilnost i ne mogu izvršiti popravak DNA (29). Postoje i neke kontrolne točke staničnog ciklusa koje također mogu biti terapijska meta (CDK, Chk1). U tumorskom tkivu pretjerano su aktivne kinaze ovisne o ciklinima. Stoga bi njihova inhibicija mogla dovesti do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1 fazi i posljedično apoptoze. Također, pokazalo se da inhibicija CDK4 smanjuje postotak matičnih stanica tumora dojke kao i postotak stanica otpornih na kemoterapiju. U više od 80 % TNBC zamijećena je mutacija protein p53 koji se inače aktivira kao odgovor na pucanje DNA. Danas se ispituje utjecaj WEE1 inhibitora koji zadržavaju stanicu u G2/M fazi, kao i njihove kombinacije sa cisplatinom. Istražuju se i komponente koje mogu održati funkciju p53, kod tumorskih stanica s nedostatkom p53 (36). U tumorskom tkivu TNBC pronađena je pretjerana ekspresija receptora za faktore koji potpomažu rast tumora i angiogenezu: VEGFR, EGFR, FGFR (36,38). Danas se nešto veća stopa preživljenja pokazala kod primjene protutijela na EGFR, cetuksimaba uz cisplatin, a u kliničkim studijama ispituje se primjena erlotiniba (inhibitora receptora za EGF) uz alkilirajući protutumorski lijek bendamustin. Može se primijeniti i bevacizumab (inhibitor receptora za VEGF), sam ili kao dodatak kemoterapijskom liječenju (36). Kod 60 % tumora dojke primijećena je ekspresija androgenih receptora koja se kod LAR (od engl. *luminal androgen receptor*) tipa trostruko negativnog raka dojke povezuje s pojavom relapsa usprkos preživljenju (32). Poznate mete su tu HSP90 (odgovoran za funkciju

AR) i CYP17 liaza (enzim koji katalizira sintezu androgena ) (39). U tu svrhu ispituje se AR antagonist bikalutamid, HSP90 inhibitor 17-DMAG, kao i enzalutamid. Važna meta danas je i PI3K/AKT/mTOR signalni put. Kod luminalnog podtipa, kao i HER2+ podtipa zamijećena je mutacija PIK3CA , kod bazalnog podtipa nedostatak PTEN (od engl. *phosphatase and tensin homolog*) i amplifikacija gena AKT3 koji kodira serin/treoninsku protein kinazu . S obzirom na ove činjenice danas se kod AR pozitivnog tipa trostruko negativnog raka dojke ispituje kombinacija PI3K inhibitora uz bikalutamid. Kako je aktivacija mete rapamicina kod sisavaca, mTOR (od engl. *the mammalian target of rapamycin*) primijećena kod TNBC, ispitivana je primjena PI3K/mTOR inhibitora BEZ235 u kombinaciji s karboplatinom/docetakselom. Pokazan je pojačan inhibitory učinak kemoterapeutika uz primjenu BEZ235 na MDA-MB-231 staničnoj liniji (36). Klinička ispitivanja ukazuju na pozitivan učinak kombinacije PI3K inhibitora i cisplatina, kao i everolimusa i karboplatina (40). U fazi ispitivanja su i potencijalni lijekovi koji bi blokirali protoonkogenu tirozinsku proteinkinazu Src, zatim staničnu komunikaciju i regulaciju posredovanu WNT glikoproteinom (od engl. *wingless-related integration site*) i DNMT1 (od engl. *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1*) s obzirom na njihovu povišenu razinu u pojedinim TNBC (36). Također, velik broj tumorskih stanica trostruko negativnog raka dojke i raka dojke sličnog bazalnom, BLBC (od engl. *basal-like breast cancer*) pokazuje osjetljivost na inhibiciju enzima MEK, koji fosforilira protein kinazu aktiviranu mitogenima (od engl. *mitogen-activated protein kinase kinase enzyme*). Stoga se klinički ispituje upotreba inhibitora MEK u kombinaciji s kemoterapijom. Produkcija c-Myc (produkt onkogen) povećana je kod približno 30 % pacijenata s TNBC ili BLBC, a njegovoj stabilizaciji doprinosi povećana aktivacija MEK. Kako matične stanice tumora dojke doprinose rezistenciji i brzom rekurenciji predstavljaju dobru metu u kombinaciji s kemoterapijom za novija istraživanja (29). Njihovoj održivosti doprinose signalni putevi kao što su : Janus kinazni prijenosnici signala i aktivatori transkripcije JAK/STAT, (od engl. *the Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*), transformirajući čimbenik rasta  $\beta$ , TGF- $\beta$  ( od engl. *transforming growth factor  $\beta$* ), Ras/MAP kinaze (Ras je protoonkogen, nazvan po otkriću transformirajućeg načela virusa štakorskog sarkoma, engl. *rat sarcoma*/MAP kinaza je mitogenom aktivirana protein kinaza) (29,41).

Nekoliko je staničnih linija uspostavljeno u svrhu istraživanja pa tako i slabo diferencirana, invazivna i agresivna MDA-MB-231 stanična linija TNBC (42,43). Pripada podtipu s niskom razinom kladina (kladin-3, -4 i -7), a za njega je specifična prisutnost biljega epitelno-mezenhimalnog prijelaza, nizak Ki-67 i E-kadherin, gubitak ili slaba ekspresija

biljega luminalne diferencijacije, kao i osobine slične matičnim stanicama tumora dojke, posebno CD44+/CD24- fenotip (44).

### 1.5. Matične stanice raka

Matične stanice raka spadaju u skupinu pluripotentnih stanica sa svojstvom diferencijacije u različite stanične tipove koji su pronađeni unutar tumorskog tkiva (45). Ponašaju se analogno matičnim stanicama, a razlikujemo ih prema površinskim biljezima (46). Yang *et al.* definirali su prisutnost nekoliko biljega matičnih stanica trostruko negativnog tumora dojke: CD44+/CD24- i/ili ALDH1A1 (član A1 obitelji aldehid dehidrogenaze) i/ili CD133 biljeg. Korelacija među biljezima nije velika, a CD44+/CD24- predstavlja pouzdaniji biljeg u odnosu na CD133 (47). Promjene u epigenetičkoj regulaciji, npr. DNA metilaciji i histonskoj modifikaciji, promjene u nekodirajućoj RNA, miRNA i remodelaciji kromatina tijekom diferencijacije stanica konačno mijenjaju gensku ekspresiju matičnih stanica (48). U tumorskom tkivu stanice raka mogu prijeći u matične stanice procesom epitelno-mezenhimalnog prijelaza (EMT). EMT ima više podtipova s obzirom na svoju biološku ulogu. Tako je tip 1 važan za razvoj embrija, tip 2 za regeneraciju tkiva, 3. tip je svojstven je stanicama raka kod kojih je došlo do epigenetičkih ili genetičkih promjena (45). Tijekom tranzicije epitelne stanice povezane s bazalnom membranom prelaze u mezenhimalne stanice koje potom migriraju iz epitelnog sloja. Bazalna membrana se razara, a mezenhimalne stanice zbog svoje sposobnosti invazije i otpornosti na mehanizme stanične smrti doprinose metastaziranju tumorskih stanica (49). Dolaskom na drugo područje, matične stanice raka omogućuju formiranje sekundarnog tumora. Također, potiču angiogenezu tumora diferencijacijom u endotelne stanice i izlučujući angiogenetske faktore (50). Zbog svoje pluripotentnosti, kao i izraženog svojstva samoobnavljanja, matične stanice doprinose proliferaciji tumorskih stanica, razvoju i metastaziranju tumora (45,46). Iako predstavljaju malu skupinu stanica unutar tumorskog tkiva, odgovorne su za otpornost na liječenje kemoterapijom ili radioterapijom. (50).

Tumor dojke i dalje ostaje često nepobjediva bolest zbog otpornosti na liječenje i relapsa tumora, što se pripisuje matičnim stanicama. Također, primijenjena terapija može povećati broj matičnih stanica i agresivnost tumorskog tkiva (45,50). Pronalazak terapije kojoj bi meta bile upravo matične stanice povećala bi šansu za izlječenje i preživljenje bolesnika (50).

## **2. CILJ I HIPOTEZA**

## **2.1. Ciljevi istraživanja**

Odrediti postotak matičnih stanica raka u staničnoj liniji MDA-MB-231 nakon primjene:

1. inhibitora fosfolipaze C
2. paklitaksela i
3. kombinacije inhibitora PLC i paklitaksela.

## **2.2. Hipoteza istraživanja na staničnim modelima raka**

Primjena inhibitora fosfolipaze C samog ili u kombinaciji s paklitakselom smanjit će postotak matičnih stanica raka.

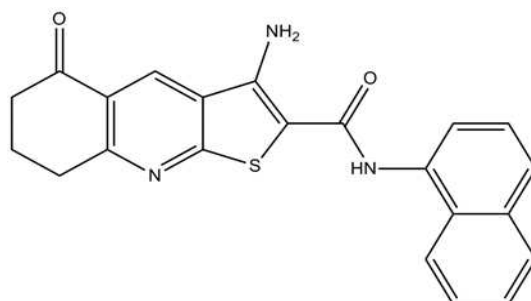
### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Stanična linija i novosintetizirani inhibitor

Novosintetizirani inhibitor primijenjen je na staničnoj liniji MDA-MB-231. Stanice su uzgajane u inkubatoru na 37° C uz 5% CO<sub>2</sub> u mediju DMEM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka). Dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma, FBS (od engl. *fetal bovine serum*) (EuroClone, Milano, Italija) mediju osigurava stanicama sve potrebne hranjive sastojke kao i sve molekule prisutne u serumu. Preventivno se dodaje i 1% antibiotik (EuroClone, Milano, Italija) s ciljem sprječavanja infekcije stanične kulture.

Inhibitor je iz skupine tieno [2,3-*b*] piridina (Slika 4) a otkriven je probirom na osnovu računalnog modeliranja metodom vHTS (engl. *virtual high throughput screen*) s namjerom da cilja enzim fosfolipazu C.

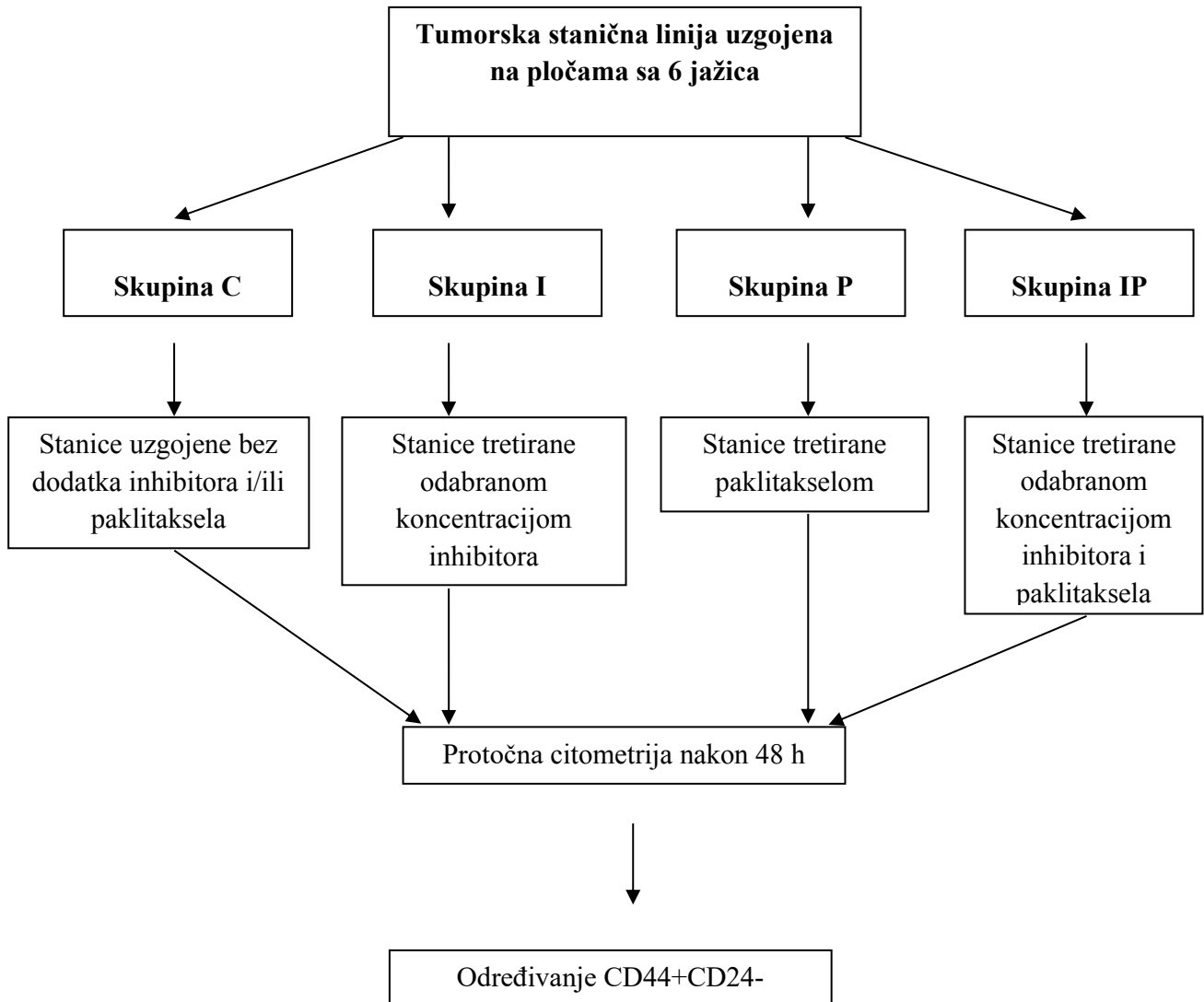
Inhibitor je hidrofobne prirode, tako da je prvo bio otopljen u dimetil sulfoksidu DMSO-u (od engl. *dimethyl sulfoxide*) s ciljem pripreme 100 mM koncentracije. Koncentracija od 2 μM, korištena u ovom istraživanju, postignuta je razrijeđivanjem s izotoničnim fosfatnim puferom s dodatkom NaCl, PBS-om (engl. *phosphate buffered saline*).



**Slika 4.** Inhibitor fosfolipaze C, 3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno [2,3-*b*] kinolin-2-karboksamid.

### 3.2. Ustroj istraživanja

Hodogram istraživanja postotka matičnih stanica raka nakon djelovanja inhibitora, prikazan je na slici 5.



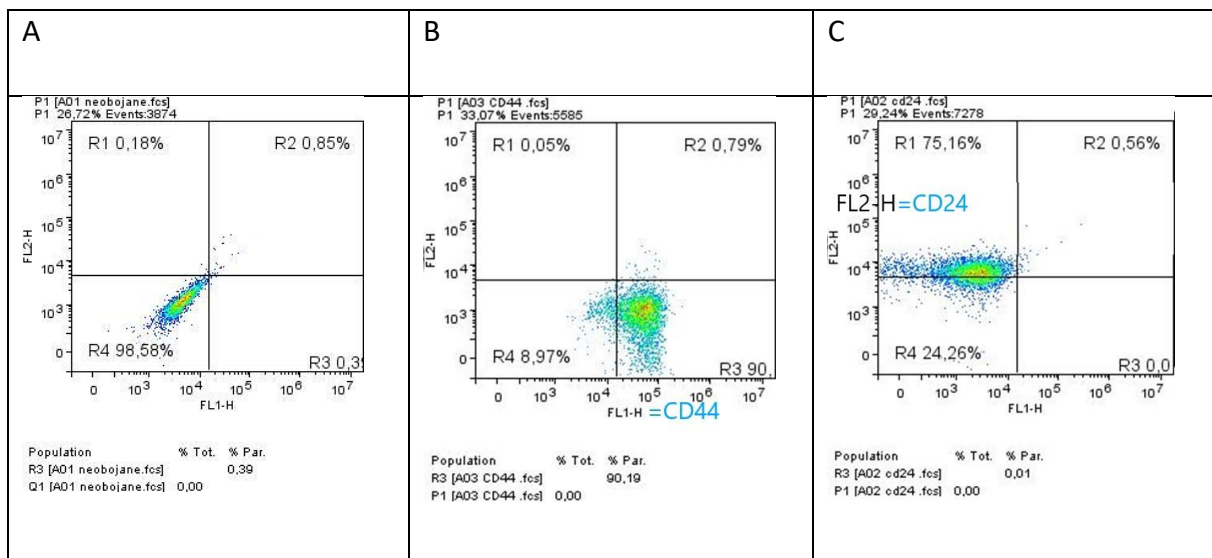
**Slika 5.** Hodogram istraživanja postotka matičnih stanica (CD44+CD24-) u ukupnoj populaciji stanica.



### 3.3. Određivanje matičnih stanica

Podjednak broj stanica nasaden je na ploče sa šest jažica, u svakoj s 2 ml medija. Nakon adheriranja stanica za dno jažica, dodana je 2  $\mu$ M koncentracija inhibitora PLC i/ili 40 nM koncentracija paklitaksela, kontrolama je samo zamijenjen medij te su stanice inkubirane 48 sati. Stanice su potom odvojene od podloge djelovanjem tripsina. Nakon ispiranja stanica PBS-om, dodan je Fc receptor (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) te protutijelo na CD44 konjugirano s kromogenom FITC (BD Biosciences) i protutijelo na CD24 konjugirano s kromogenom PE (eBioscience). Sve je rađeno u triplikatu.

Fluorescencije obojenih uzoraka izmjerene su pomoću protočnog citometra. Podaci dobiveni protočnom citometrijom nadalje su analizirani FlowLogic programom (Inivai, Mentone, Victoria, Australija). Granice za matične stanice raka (CD44+CD24-) postavljene su 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 6).



**Slika 6.** 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).

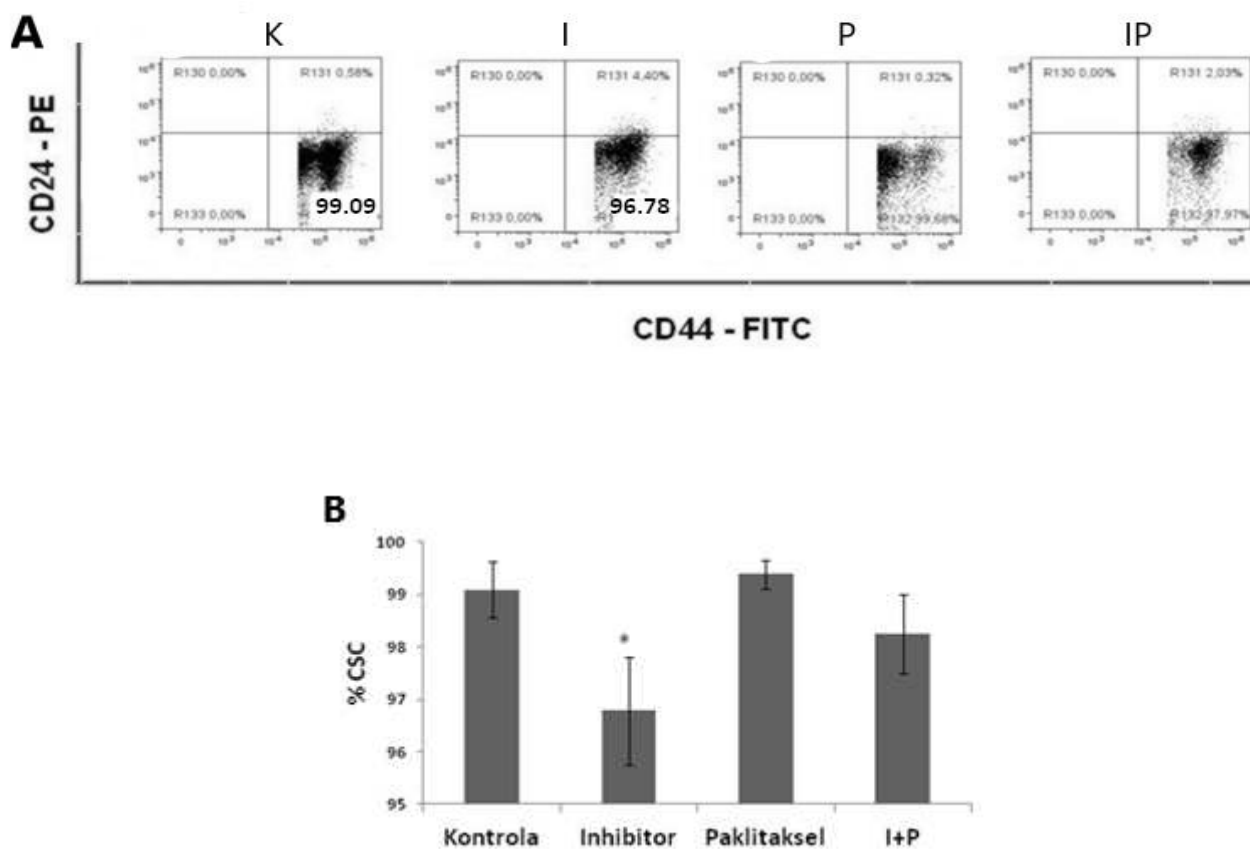
### **3.4. Statistička analiza rezultata pokusa na staničnim linijama raka**

Podaci dobiveni protočnom citometrijom analizirani su u FlowLogic programu. Podaci su obrađeni 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 matičnih stanica raka

Inhibitor je blago, ali statistički značajno smanjio CSC (s  $99,09 \pm 0,53$  na  $96,78 \pm 1,03$ ). Paklitaksel je izazvao statistički neznačajno povećanje postotka CSC. Kombinirani tretman inhibitorom i paklitakselom nije utjecao na postotak CSC (Slika 7).



**Slika 7.** Postotak matičnih stanica raka (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>) u MDA-MB-231 staničnoj liniji 48h nakon tretmana inhibitorom. Točkasti citogrami (A) i statistički histogrami (B) kontrolne, ispitne skupine, te skupina tretiranih samo paklitakselom te kombinacijom inhibitora i paklitaksela (I+P).

\*  $P < 0,05$ .

## **5. RASPRAVA**

Cilj ovog istraživanja bio je otkriti hoće li primjena novosintetiziranog inhibitora fosfolipaze C (PLC) iz skupine tieno [2,3-*b*] piridina smanjiti postotka matičnih stanica tumora dojke. Inhibitor PLC, 3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno) [2,3-*b*] kinolin-2-karboksamid otkriven je probirom na osnovu računalnog modeliranja. Skupina tieno [2,3-*b*]piridina pokazala je protutumorsko djelovanje na različite tumorske stanične linije, a osobito protiv tumora dojke (51). Zamijećen je utjecaj na određene molekularne mete tumorske progresije među kojima je na prvom mjestu fosfolipaza C, a od ostalih to su bakarni metalohaperonski protein ATOX1, tirozil DNA fosfodiesteraza 1 (TDP1), fosfolipaza D, kolhicin vežuće mjesto na tubulinu i adenoziński A2A receptor. Različiti tienopiridinski derivati pokazuju specifičnu ovisnost aktivnosti o strukturi, SAR (od engl. *structure-activity relationship*) (51).

Porodica fosfolipaze C ima 6 potporodica ( $\delta$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ , i  $\eta$ ). Posebno treba naglasiti PLC $\beta$ , PLC $\gamma$ , PLC $\delta$ , i PLC $\epsilon$  izoforme za koje postoje brojni dokazi o povezanosti s različitim tipovima tumora. Sve ove izoforme mogu katalizirati hidrolitičku reakciju polifosfoinozitida kao što je PIP2 (od engl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) čime nastaju sekundarni glasnici IP3 (od engl. *inositol trisphosphate*) i DAG (od engl. *diacylglycerol*). IP3 je ligand za kalcijev kanal endoplazmatskog i sarkoplazmatskog retikuluma (8). Prenoseći signal PLC, IP3 uzrokuje nagli porast kalcija u citosolu (otpuštanjem iz endoplazmatskog retikuluma). Kalcij zajedno s DAG posreduje sidrenje protein kinaze C za unutarnji jednosloj plazma membrane i time aktivaciju. To je ključni događaj u staničnom signaliziranju povezanom s tumorskom progresijom jer protein kinaza C (PKC) ima ključnu ulogu u pokretljivosti, dijeljenju, rastu i smrti stanica. Također kod povišene ekspresije PLC dolazi do većeg smanjenja koncentracije PIP2 što utječe na važne signalne kaskade i ima velik utjecaj na migraciju stanica. Dakle, sposobnost PLC da utječe na glavne onkogene signalne putove kao što su PI3K/Akt/mTOR, JAK/STAT i RAS/RAF/MAPK/ERK ukazuje nam na terapijski potencijal fosfolipaze C u tumorskom tkivu (52).

Osim inhibitora fosfolipaze C, staničnu kulturu tretirali smo i paklitakselom te njihovom kombinacijom. Paklitaksel pripada obitelji taksana i najčešće je korišten kemoterapeutik u terapiji tumora pa tako i raka dojke, a posebno metastatskog raka dojke. Djeluje stabilizacijom mikrotubula, heterodimera tubulina, čija je uloga formiranje diobenog vretena nakon čega je stanica spremna za diobu. Zbog njihove stabilizacije stanica ostaje zarobljena u G2/M fazi mitotičkog ciklusa, što onemogućuje stanicu u diobi i dovodi u konačnici do apoptoze. Ipak, različitim staničnim mehanizmima može se razviti rezistencija na paklitaksel (53). Tumor dojke i dalje ostaje često neizlječiva bolest zbog rezistencije na liječenje i relapsa tumora za što su,

između ostalog, odgovorne i matične stanice tumora. Kako bi pronalazak terapije kojoj bi meta bile upravo matične stanice povećala šansu za izlječenjem, naše istraživanje provodili smo na staničnoj liniji MDA-MB-231 trostruko negativnog karcinoma dojke, koja sadrži visok postotak matičnih stanica. U ovom istraživanju inhibitor PLC je blago, ali statistički značajno smanjio postotak matičnih stanica raka. Primjena paklitaksela dovela je do statistički neznačajnog povećanja postotka matičnih stanica. Kombinirani tretman inhibitorom PLC i paklitakselom nije utjecao na postotak CSC, što nas navodi na zaključak da su se suprotni učinci paklitaksela i inhibitora poništili. Ovim istraživanjem dokazali smo da novosintetizirani tieno [2,3-*b*] piridin smanjuje postotak matičnih stanica u MDA-MB-231 staničnoj liniji trostruko negativnog raka dojke što bi moglo predstavljati novi terapijski pristup TNBC.

## **6. ZAKLJUČCI**



1. Novosintetizirani inhibitor PLC smanjio je postotak matičnih stanica trostruko negativnog raka dojke u MDA-MB-231 staničnoj kulturi.
2. Kombinirani tretman inhibitorom PLC i paklitakselom nije utjecao na postotak CSC, što nas navodi na zaključak da se učinci paklitaksela i inhibitora međusobno poništavaju.

## **7. CITIRANA LITERATURA**

- (1) Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija, peto, prerađeno i dopunjeno izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2018.
- (2) Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2017., Bilten 42, Zagreb, 2020. [Internet ] Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/01/Bilten-2017-final.pdf>
- (3) Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, et al. CONCORD Working Group. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet*. 2018 Mar 17;391(10125):1023-1075.
- (4) Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Klinička onkologija,3., obnovljeno i dopunjeno izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2018.
- (5) Provenzano E, Ulaner GA, Chin SF. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin*. 2018 Jul;13(3):325-338.
- (6) Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet*. 2017 Mar 18;389(10074):1134-1150.
- (7) Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Sep 23;5(1):66.
- (8) Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Murray RK, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija, 28.izdanje, Medicinska naklada, Zagreb 2011.
- (9) World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. 2012 [December 9, 2012]; Available from: <http://globocan.iarc.fr/>.
- (10) Brunßen A, Hübner J, Katalinic A, R. Noftz M, Waldmann.A. Breast Cancer Epidemiology. In: Management of breast diseases. Springer, Cham, 2016. p. 125-137.
- (11) Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;151:1-32.
- (12) Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res*. 2017 Oct 2;50(1):33.
- (13) Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch*. 2014 Jul;465(1):1-14.
- (14) Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. (2009) Ki67 index, HER2 status and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 101:736–750

- (15) Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747–752
- (16) Tang P, Tse GM. Immunohistochemical Surrogates for Molecular Classification of Breast Carcinoma: A 2015 Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2016 Aug;140(8):806-14.
- (17) Cancer Genome Atlas Network (TCGA). Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 2012;490(7418):61–70.
- (18) Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, et al. (2010) Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 28:3271–3277
- (19) Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. (2010) Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 12:R68
- (20) Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R68
- (21) Elston CW, Ellis IO, Goulding H, i sur. Role of pathology in the prognosis and management of breast cancer. U: Elston CW, Ellis IO, (ur). *The Breast*, London: Churchill Livingstone, 1998;385-433.
- (22) Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term followup. *Histopathology* 1991;19:403-10.
- (23) Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957;11:359-77. 79.
- (24) Hortobagyi GN, Edge SB, Giuliano A. New and Important Changes in the TNM Staging System for Breast Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2018 May 23;38:457-467.
- (25) Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch.* 2018 May;472(5):697-703.
- (26) Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW i sur. Staging system for breast cancer: revisions for the 6th edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *Surg Clin North Am.* 2003;83:803-19
- (27) Bergin ART, Loi S. Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000Res.* 2019 Aug 2;8:F1000 Faculty Rev-1342.
- (28) Dent R, Trudeau M, Pritchard K, et al. Triple negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007;13(15, pt 1): 4429–4434

- (29) Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Nov;13(11):674-690.
- (30) Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, et al. Basal-like and triple negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol*. 2011;24(2):157–167.
- (31) Prat A, et al. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncology*. 2013;18:123–133.
- (32) Lehmann BD, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121:2750–2767.
- (33) Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res*. 2013;19(19):5533–5540.
- (34) Barbuti AM, Chen ZS. Paclitaxel through the ages of anticancer therapy: Exploring its role in chemoresistance and radiation therapy. *Cancers*. 2015.
- (35) Reguera-Nuñez E, Xu P, Chow A, Man S, Hilberg F, Kerbel RS. Therapeutic impact of Nintedanib with paclitaxel and/or a PD-L1 antibody in preclinical models of orthotopic primary or metastatic triple negative breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019
- (36) Jhan JR, Andrechek ER. Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy. *Pharmacogenomics*. 2017 Nov;18(17):1595-1609.
- (37) Tutt A, Robson M, Garber JE, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*. 2010;376(9737):235–244.
- (38) Balko JM, Giltane JM, Wang K, et al. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discovery*. 2014;4(2):232–245.
- (39) Proverbs-Singh T, Feldman JL, Morris MJ, Autio KA, Traina TA. Targeting the androgen receptor in prostate and breast cancer: several new agents in development. *Endocr. Relat. Cancer*. 2015;22(3):R87–R106.
- (40) Jovanovic B, Mayer IA, Mayer EL, et al. A randomized Phase II neoadjuvant study of cisplatin, paclitaxel with or without everolimus in patients with stage II/III triple-negative breast cancer (TNBC): responses and long-term outcome correlated with

- increased frequency of DNA damage response gene mutations, TNBC subtype, AR status, and Ki67. *Clin. Cancer Res.* 2017;23(15):4035–4045.
- (41) Marotta LL, et al. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44+CD24– stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *J Clin Invest.* 2011;121:2723–2735.
- (42) European College of Authenticated Cell cultures. Cell line profile MDA-MB-231. *Eur Collect Authenticated Cell Cult* [Internet]. 2017;231(92020424):1–3. Available from: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf>
- (43) MDA-MB-231 ATCC® HTB-26TM [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)
- (44) Choosing the right cell line for breast cancer research | Breast Cancer Research | Full Text [Internet]. [cited 2020 Mar 26]. Available from: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2889/tables/1>
- (45) Chang JC. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Sep;95(1 Suppl 1):S20-5.
- (46) Chen K, Huang YH, Chen JL. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34:732–740.
- (47) Yang F, Cao L, Sun Z, Jin J, Fang H, Zhang W, Guan X. Evaluation of Breast Cancer Stem Cells and Intratumor Stemness Heterogeneity in Triple-negative Breast Cancer as Prognostic Factors. *Int J Biol Sci.* 2016 Dec 7;12(12):1568-1577.
- (48) Toh TB, Lim JJ, Chow EK. Epigenetics in cancer stem cells. *Mol Cancer.* 2017 Feb 1;16(1):29. doi: 10.1186/s12943-017-0596-9.
- (49) Liu S, Cong Y, Wang D, et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Rep* 2014; 2:78–91.
- (50) Butti R, Gunasekaran VP, Kumar TVS, Banerjee P, Kundu GC. Breast cancer stem cells: Biology and therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019 Feb;107:38-52.
- (51) Zafar A, Sari S, Leung E, Pilkington, L, van Rensburg M, Barker D, *et al.* (2017). GPCR Modulation of Thieno[2,3-*b*]pyridine Anti-Proliferative Agents. *Molecules*, 22(12), 2254.
- (52) Owusu Obeng E, Rusciano I, Marvi MV, Fazio A, Ratti S, Follo MY, *et al.*

Phosphoinositide-Dependent Signaling in Cancer: A Focus on Phospholipase C Isozymes. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 8;21(7):2581.

(53) Barbuti AM, Chen ZS. Paclitaxel Through the Ages of Anticancer Therapy: Exploring Its Role in Chemoresistance and Radiation Therapy. *Cancers (Basel).* 2015 Dec 3;7(4):2360-71.

## **8. SAŽETAK**



**Ciljevi:** Cilj ovog istraživanja bio je otkriti hoće li primjena novosintetiziranog inhibitora fosfolipaze C (PLC) iz skupine tieno [2,3-*b*] piridina smanjiti postotak matičnih stanica (CSC, od engl. *cancer stem cells*) trostruko negativnog tumora dojke na ispitivanoj MDA-MB-231 staničnoj kulturi. Dodatni cilj je bio, u jednakim uvjetima pokusa, usporediti učinak inhibitora s učincima postojećeg lijeka paklitaksela kao i kombinacije inhibitora i paklitaksela.

**Materijali i metode:** Novosintetizirani inhibitor fosfolipaze C, 3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno [2,3-*b*] kinolin-2-karboksamid, primijenjen je na MDA-MB-231 staničnoj liniji trostruko negativnog karcinoma dojke. Nakon tretmana stanica 2  $\mu$ M inhibitorom PLC i/ili 40 nM koncentracijom paklitaksela tijekom 48 sati, fluorescencije uzoraka imunobojenih protutijelima na CD44 i CD24 izmjerene su protočnom citometrijom.

**Rezultati:** Inhibitor je blago, ali statistički značajno smanjio postotak CSC (s  $99,09 \pm 0,53$  na  $96,78 \pm 1,03$ ). Paklitaksel je izazvao statistički neznajno povećanje postotka CSC. Kombinirani tretman inhibitorom i paklitakselom nije utjecao na postotak CSC.

**Zaključci:** Novosintetizirani tieno [2,3-*b*] piridin smanjuje postotak matičnih stanica u MDA-MB-231 staničnoj liniji trostruko negativnog raka dojke što bi moglo predstavljati novi terapijski pristup TNBC. Kombinirani tretman inhibitorom PLC i paklitakselom nije utjecao na postotak CSC, moguće je da se suprotni učinci paklitaksela i inhibitora međusobno poništavaju.

## **9. SUMMARY**

**Objectives:** The aim of this study was to determine whether the newly synthesized phospholipase C inhibitor from the group of thieno[2,3-*b*]pyridine inhibitors reduces the percentage of triple negative breast cancer stem cells (CSC) on the investigated human cell line MDA-MB-231. An additional aim was, under the same experimental conditions, to compare the effect of the inhibitor with the effects of the existing paclitaxel drug as well as the combination of the inhibitor and paclitaxel.

**Methods:** The newly synthesized phospholipase C inhibitor, 3-amino-5-oxo-N-naphthyl-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-*b*]quinoline-2-carboxamide, was administered to MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell line. After cell treatment with 2  $\mu$ M phospholipase C inhibitor and / or with 40 nM concentration of paclitaxel for 48 hours, fluorescences of immunostained samples with antibodies to CD44 and CD24 were measured by flow cytometry.

**Results:** The inhibitor slightly but statistically significantly reduced the percentage of CSC (from  $99,09 \pm 0,53$  to  $96,78 \pm 1,03$ ). Paclitaxel caused a statistically insignificant increase in the percentage of CSCs. The combined treatment with inhibitor and paclitaxel did not affect the percentage of CSC.

**Conclusion:** The newly synthesized thieno [2,3-*b*] pyridine reduces the percentage of stem cells in the MDA-MB-231 cell line of triple-negative breast cancer which could represent a new therapeutic approach to TNBC. The combined treatment with PLC inhibitor and paclitaxel did not affect the percentage of CSC. Therefore, it is possible that the opposite effects of paclitaxel and inhibitors cancel each other out.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**OSOBNI PODACI:**

Ime i prezime: Karolina Čulić

Adresa stanovanja: Mike Tripala 2, 21 000 Split

Telefon: +38595 378 5030

E-mail: [karolina.culicst@gmail.com](mailto:karolina.culicst@gmail.com)

Državljanstvo: hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 19.11.1996., Split, RH

**OBRAZOVANJE:**

2003.-2011. Osnovna škola „Lučac“, Split

2011.-2015. Opća gimnazija „Vladimir Nazor“, Split

2013.-2018. Škola stranih jezika „Pappagallo“ (engleski jezik C1 diploma, njemački jezik C1.1 diploma)

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

**RADNO ISKUSTVO:**

01. kolovoza-26. kolovoza 2018. IPSF Program studentske razmjene (SEP): Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg; Medizinische Klinik, Kooperationseinheit Klinische Pharmazie, Heidelberg, Njemačka

25. veljače-18.rujna 2020. Stručno osposobljavanje; Ljekarne SDŽ, Ljekarna Dobri, Split, Hrvatska

**VOLONTERSKO ISKUSTVO:**

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

Volonter na Humanitarnoj božičnoj fritulijadi 2015.-2019.

Edukacijski koordinator za Studij farmacije za kongres Praktična znanja za studente 2020.

15.-17.ožujka 2019. Natjecanje u izradi magistrálnih pripravaka u organizaciji CPSA-e (osvojeno 1. mjesto)

**POSEBNE VJEŠTINE:**

Strani jezici: engleski i njemački jezik

Rad na računalu: MS Office