

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Institut Ruđer Bošković Zagreb
Sveučilište u Dubrovniku
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Sanda Šitić

**Utjecaj ekstracelularnog matriksa i oksidacijskog stresa na rast i
diferencijaciju matičnih stanica karcinoma dojke**

Doktorski rad

Osijek, 2013.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Institut Ruđer Bošković Zagreb
Sveučilište u Dubrovniku
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Sanda Šitić

**Utjecaj ekstracelularnog matriksa i oksidacijskog stresa na rast i
diferencijaciju matičnih stanica karcinoma dojke**

Doktorski rad predložen
Sveučilišnom vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne
Doktorske sudije u svrhu stjecanja
doktorata znanosti

Osijek, 2013.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: biomedicina i zdravstvo
Znanstveno polje: temeljne medicinske znanosti

Utjecaj ekstracelularnog matriksa i oksidacijskog stresa na rast i diferencijaciju matičnih stanica karcinoma dojke

Sanda Šitić

Rad je izrađen u: Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Mentor: dr.sc.med. *Neven Žarković*

Kratki sažetak doktorskog rada:

Karcinom dojke je vodeći uzrok smrti od malignih bolesti u žena. Bitnu ulogu pri tome imaju maligne matične stanice karcinoma koje su rezistentne na kemo- i radioterapiju, te nakon diseminacije „miruju“ u organizmu do ponovne aktivacije kojom uzrokuju recidiv bolesti. Pretpostavka je ovog istraživanja da su bitni čimbenici koji utječu na ponašanje matičnih stanica karcinoma dojke okoliš u kojem se nalaze, pogotovo međustanična tvar, a također i oksidacijski stres koji ima bitnu ulogu u razvoju, ali i u terapiji karcinoma dojke. U ovom je radu analiziran utjecaj kolagena, temeljnog proteina međustanične tvari, te utjecaj oksidacijskog stresa na *in vitro* rast i diferencijaciju matičnih stanica ljudskog karcinoma dojke. Rezultati su pokazali kako oksidirani kolagen uzrokuje diferencijaciju matičnih stanica karcinoma dojke, mjereno smanjenjem markera matičnih tumorskih stanica i povećanjem hormonskih receptora. Međutim, uočeno je i da oksidacijski stres uzrokovan doksorubicinom može uzrokovati povećanje proliferacije i smanjenje diferencijacijskih markera. Stoga rezultati ovog istraživanja proširuju temeljne spoznaje o utjecaju oksidacijskog stresa na rast i diferencijaciju matičnih stanica karcinoma dojke i ukazuju na do sada nepoznato djelovanje citostatika doksorubicina koji može smanjiti, ali i povećati malignost matičnih tumorskih stanica.

Broj stranica: 148

Broj slika: 45

Broj tablica: 10

Broj literaturnih navoda: 239

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: oksidacijski stres, kolagen, matične stanice karcinoma dojke

Datum obrane: 18. srpanj 2013.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof.dr.sc. Kamelija Žerković

2. dr.sc. Neven Žarković

3. prof.dr.sc. Lidija Beketić-Orešković

Rad je pohranjen u:

Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek;
Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer of Osijek
University of Dubrovnik
Institute Ruder Bošković, Zagreb
University Postgraduate Interdisciplinary
Doctoral Study of Molecular biosciences

Phd thesis

Scientific Area: biomedicine and health
Scientific Field: basic medical sciences

The influence of extracellular matrix and oxidative stress on growth and differentiation of the breast cancer stem cells

Sanda Šitić

Thesis performed at: Institute Ruder Bošković
Supervisor: *Neven Žarković, PhD, MD*

Short abstract:

Breast cancer accounts for the leading cause of cancer-related death among women. It is believed that malignant stem cells play important role, because they are resistant to chemo- and radiotherapy. After dissemination, they remain quiescent in the organism and after a certain period of time cause relaps of the disease. In this research, we presumed that major factors that influence breast cancer stem cells are stem cell niche, specially extracellular matrix, as well as oxydative stress with its major role in not only the development of breast cancer but also in its therapy. We have analyzed the influence of collagen, as the most abundant protein of the extracellular matrix, and oxydative stress on *in vitro* growth and differentiation of the breast cancer stem cells, as measured by the expression of steroid receptors and depletion of the stem cell phenotype. However, oxydative stress caused by doxorubicin may increase proliferation and decrease markers of differentiation. Therefore, the results of this research offer a new insight in the influence of oxydative stress on growth and differentiation of the breast cancer stem cells, along with newly discovered effects of doxorubicin which can diminish, but also increase malignancy of the tumor stem cells.

Number of pages: 148

Number of figures: 45

Number of tables: 10

Number of references: 239

Original in: Croatian

Key words: oxidative stress, collagen, breast cancer stem cells

Date of the thesis defence: 18th July 2013.

Reviewers:

1. prof.dr.sc. Kamelija Žarković

2. dr.sc. Neven Žarković

3. prof.dr.sc. Lidija Beketić-Orešković

Thesis deposited in: City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek;
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg Sv. Trojstva 3,

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za oksidacijski stres
Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u
Zagrebu pod vodstvom dr.sc. Nevena Žarkovića

Zahvaljujem voditelju projekta „Lipidi, slobodni radikali i njihovi glasnici u integrativnoj onkologiji“, temeljnog projekta MZOŠ-a , dr.sc. Nevenu Žarkoviću, te dr. Mariji Balić i Ani Čipak Gašparović voditeljima bilateralnog hrvatsko-austrijskog projekta „Utjecaj kolagena modificiranog produktom lipidne peroksidacije na rast i diferencijaciju matičnih stanica karcinoma dojke“ i u sklopu COST CM1106 Akcije, koji su financirali izvođenje ovog rada.

Zahvaljujem svojem mentoru, dr.sc. Nevenu Žarkoviću na podršci i razumijevanju tijekom planiranja, izrade i pisanja rada.

Posebno zahvaljujem dr.sc. Ani Čipak Gašparović, bez čijeg dugogodišnjeg upornog rada i praćenja ne bi bilo ovog doktorata.

Puno hvala dipl.ing. Lidiji Milković na velikoj pomoći u laboratoriju kod izrade pokusa.

Hvala kem. teh. Nevenki Hiršl i inž. Tei Vuković na tehničkoj podršci tijekom izrade rada koja mi je bila od neizmjerne pomoći.

Zahvaljujem dr. Mariji Balić na suradnji i pomoći te konstruktivnim diskusijama.

Posebno zahvaljujem Renati, Želimiru, Ozani i Tonću na strpljenju i podršci. Hvala vam što ste uz mene!

1. UVOD	4
1.1. GRAĐA DOJKE	5
1.1.1. Anatomija i fiziologija dojke	5
1.1.2. Histološka građa dojke.....	6
1.2. MOLEKULARNI MEHANIZMI DJELOVANJA HORMONA	7
1.2.1. Sinteza hormona estrogena, progesterona i njihovi receptori.....	7
1.2.2. Spolni hormoni, razvoj dojke, nastanak tumora	8
1.2.3. Izraženost estrogena i progesterona u normalnom tkivu dojke	9
1.2.4. Odnos između estrogena, progesterona, proliferacije i nastanka tumora	10
1.3. MATIČNE STANICE I KARCINOM DOJKE	11
1.3.1. Matične somatske i matične tumorske stanice.....	11
1.3.2. Matične stanice i karcinom dojke	13
1.3.3. Matične stanice i metastatska bolest dojke	15
1.4. HER2.....	16
1.4.1. Građa i funkcija HER2.....	16
1.4.2. Povećana ekspresija HER2 i tumori	17
1.5. P53.....	17
1.5.1. Funkcije p53.....	17
1.5.2. Način djelovanja p53	18
1.5.3. Inaktivacija p53 u karcinomima.....	18
1.5.4. Status p53 govori o prognozi pacijenata s karcinomom dojke	19
1.5.5. Uloga p53 u matičnim stanicama karcinoma dojke.....	20
1.6. EKSTRAKLULARNI MATRIKS I KARCINOMI DOJKE.....	21
1.6.1. Vezivno tkivo.....	21
1.6.2. Kolagena vlakna.....	22
1.7. MIKROOKOLIŠ I KARCINOM DOJKE	23
1.7.1. Ekstracelularni matriks i matične stanice karcinoma dojke.....	25
1.8. OKSIDACIJSKI STRES.....	27
1.8.1. Slobodni radikali.....	27
1.8.2. Utjecaj slobodnih radikala	27
1.8.3. Masne kiseline bioloških membrana.....	28
1.8.4. Funkcije 4-hidroksinonenala (HNE).....	29
1.8.5. Antioksidacijski mehanizmi zaštite	30
1.8.6. Oksidacijski stres, lipidna peroksidacija, HNE i karcinom dojke	32

2.	HIPOTEZA	34
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	35
4.	MATERIJALI I METODE	36
4.1.	KULTURE STANICA	36
4.1.1.	Određivanje broja živih/vijabilnih stanica	36
4.2.	PRIPREMA AKTIVNOG HNE-a	37
4.3.	PRIPREMA PODLOGA ZA RAST STANICA	37
4.3.1.	Oksidirani kolagen	38
4.3.2.	4-hidroksinonenal vezan na kolagen	40
4.3.3.	Priprema podloge za rast stanica	41
4.4.	ODREĐIVANJE HNE-HISTIDINSKIH KONJUGATA NA KOLAGENU	41
4.5.	UTJECAJ AKUTNOG STRESA NA VIJABILNOST STANICA	42
4.5.1.	Oksidirani kolagen	42
4.5.2.	Kolagen s vezanim HNE-om	42
4.5.3.	Utjecaj oksidacijskog stresa	43
4.6.	UTJECAJ AKUTNOG STRESA NA PROLIFERACIJU STANICA	43
4.6.1.	Utjecaj HNE-a	43
4.7.	UTJECAJ KRONIČNOG STRESA NA PROLIFERACIJU STANICA	44
4.8.	UTJECAJ KRONIČNOG STRESA NA DIFERENCIJACIJU	44
4.8.1.	Imunocitokemijsko određivanje markera diferencijacije	45
4.8.2.	Određivanje markera matičnih stanica protočnom citometrijom	48
4.9.	UTJECAJ DOKSORUBICINA	49
4.9.1.	Utjecaj doksorubicina na proliferaciju	49
4.9.2.	Utjecaj doksorubicina na stvaranje ROS-a	50
4.10.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	50
5.	REZULTATI	52
5.1.	MODIFIKACIJA KOLAGENA	52
5.1.1.	Modifikacija hidroksilnim radikalom	52
5.1.2.	Modifikacija HNE-om	54
5.1.3.	Utjecaj kolagena na rast stanica SUM159	55
5.2.	UTJECAJ KOLAGENA NA ZNAČAJKE RASTA STANICA SUM159	57
5.3.	KOLAGEN POTPOMAŽE OPORAVAK OD AKUTNOG OKSIDACIJSKOG STRESA	59
5.4.	AKUTNI OKSIDACIJSKI STRES UZROKOVAN VODIKOVIM PEROKSIDOM NE UTJEČE NA VIJABILNOST	60

5.5.	UTJECAJ AKUTNOG STRESA NA PROLIFERACIJU STANICA	61
5.6.	UTJECAJ KRONIČNOG STRESA NA PROLIFERACIJU STANICA	66
5.7.	UTJECAJ KRONIČNOG STRESA NA DIFERENCIJACIJU STANICA.....	67
5.7.1.	Imunocitokemijsko određivanje markera diferencijacije.....	67
5.7.2.	Određivanje markera tumorskih matičnih stanica protočnom citometrijom	81
5.8.	UTJECAJ DOKSORUBUCINA.....	85
5.8.1.	Utjecaj doksorubicina na proliferaciju.....	85
5.8.3.	Utjecaj doksorubicina na stvaranje ROS-a	92
6.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	94
6.1.	POVEĆANJEM KONCENTRACIJA HNE-A, SMANJUJE SE BROJ NEGATIVNIH IMUNOCITOKEMIJSKIH REAKCIJA.....	94
6.2.	IZRAŽAJNOST ER, PR I P53 NA PODLOGAMA PS, KOLAGENA, KOLAGENA IZLOŽENOG TRETMANU S 1 i 10 μ M HNE-OM	100
6.3.	KRATKOTRAJNA KULTURA SUM159 UZ DODATAK DOKSORUBICINA....	103
7.	RASPRAVA	104
8.	ZAKLJUČCI.....	120
9.	LITERATURA	121
10.	POPIS OZNAKA I KRATICA.....	142
11.	SAŽETAK	144
12.	ABSTRACT.....	145
13.	ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA.....	146

1. UVOD

Unatoč napretku u dijagnostici i liječenju u zadnjih nekoliko desetljeća, karcinom dojke i dalje ostaje vodeći uzrok smrti od malignih bolesti u žena. Prema biltenu Hrvatskog Zavoda za javno zdravstvo za 2010 godinu, iz podataka Registra za rak, te godine je registrirano 2492 novooboljelih žena od karcinoma dojke. Mortalitet u Hrvatskoj iznosi 43/100000 a incidencija (učestalost) 109/100000. Karcinom dojke čini 26% svih karcinoma kod žena i daleko je najčešće sijelo karcinoma; slijede karcinom kolorektuma (13%) i bronhopulmonarni karcinom te karcinom tijela maternice (7%). Preživljenje kod bolesnica s karcinomom dojke ovisi o:

1. Veličini tumora

2. Histološkim karakteristikama tumora

3. Proširenosti bolesti

Koja je razlika između karcinoma dojke i ostalih zloćudnih tumora?

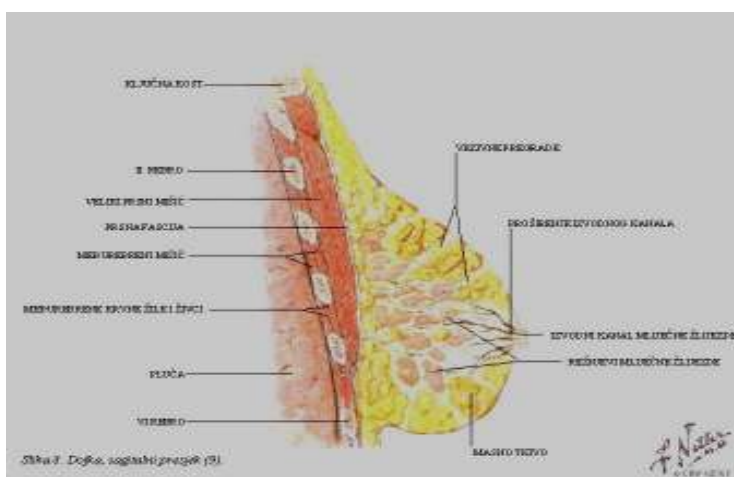
Krivulje preživljavanja kod bolesnica s karcinomom dojke dosežu plato nakon 7- 10 godina (ovisno o stadiju bolesti i obliku liječenja) dok krivulje preživljavanja kod većine drugih karcinoma dosežu plato nakon 2- 5 godina.

Zaključak je da postoji vrsta tumorskih stanica otpornih na primarnu terapiju, sa sposobnošću „skrivanja“ i mirovanja unutar tijela, neotkrivenih tijekom dugog perioda vremena te sposobnih da u određenom trenutku uzrokuju rekurenciju bolesti. Istraživanja su dovela do otkrića matičnih tumorskih stanica koje zbog svojih sposobnosti samoobnavljanja, mobilnosti i rezistentnosti na kemo- i radioterapiju, „miruju“ u organizmu te se nakon nekog vremena iz još nepoznatih razloga aktiviraju te uzrokuju recidiv bolesti. Zadnjih se 20-ak godina matične tumorske stanice intenzivno istražuju. Najbolje su proučene matične hematopoetske stanice, koje su i prve otkrivene a na kojima se bazira transplantacija koštane srži. Zadnjih 10-ak godina pručavaju se matične stanice karcinoma dojke. Do danas je objavljeno malo eksperimentalnih radova na tom području i zbog toga je ovaj rad bitan, a rezultati rada će biti još jedan korak naprijed u razumijevanju ove teške bolesti.

1.1. GRAĐA DOJKE

1.1.1. Anatomija i fiziologija dojke

Dojka je paran organ, modificirana žlijezda lojnica, tj. kožnog je podrijetla što objašnjava zašto nema ovojnica kao drugi organi. Dojka je građena od 15-20 žljezdanih režnjeva (lobula) a oni su tubuloalveolarne građe. Ti režnjevi smješteni su u površinskoj, pektoralnoj vezivnoj ovojnici, u potkožnom tkivu. Između žljezdanih režnjeva nalaze se režnjevi masnog tkiva koji određuju veličinu dojke osim u trudnoći i tijekom dojenja, kad se povećavaju žljezdani režnjevi. Svaki režanj dojke izliva se u svoj izvodni kanal a izvodni kanali otvaraju se u bradavici. Dojke ženskog i muškog novorođenčeta međubno se ne razlikuju. Do početka puberteta dojke obaju spolova razvijaju se jednako, bez nekih bitnih promjena. U ženske djece, s nastupom puberteta, pod utjecajem više hormona, među kojima su najvažniji estrogene i progesterone iz jajnika, te faktori rasta, slijedi daljnji razvoj dojki. Početno, s nastupom puberteta, a zbog nedovršenih ovulacija u jajnicima te posljedično manjeg stvaranja progesterona, estrogen ima primarnu ulogu u stimulaciji rasta stanica i tkiva dojke. Tako estrogen potiče rast razgranatog sustava kanalića, povećanje perikanalikalnog vezivnog tkiva, prokrvljenost i odlaganje masti. Kasnije u pubertetu dolazi do kompletnih ovulacija i stvaranja progesterona. Pod utjecajem progesterona žljezdane se stanice povećavaju, dijele i poprimaju sekrecijska obilježja (dominantna uloga progesterona). Sve to povećava masu dojki. Za rast sustava kanalića važna su još najmanje četiri hormona: hormon rasta, prolaktin, glukokortikoidi nadbubrežne žlijezde i inzulin. U muškaraca izostaje hormonska stimulacija koja se događa u žena, tako da se muška dojka sastoji od kanalića bez režnjića. U reproduktivskom razdoblju žene dolazi do mjesečnih cikličkih promjena izlučivanja spolnih hormona. Te promjene utječu na stanice žljezdanog i potpornog tkiva dojke koje također prolaze kroz cikličke faze rasta, diferencijacije i propadanja (apoptoze). Trudnoća i dojenje također izazivaju dodatne prepoznatljive promjene u tkivu dojke. Nastupom menopauze, a zbog „iscrpljenja“ jajnika, odnosno zbog smanjenoga i izostalog stvaranja estrogena i progesterona, dolazi do involucije dojki. Žljezdani dijelovi gotovo potpuno nestaju, a ostaje samo pokoji atrofičan izvodni kanal. Količina masnog tkiva starenjem se povećava.



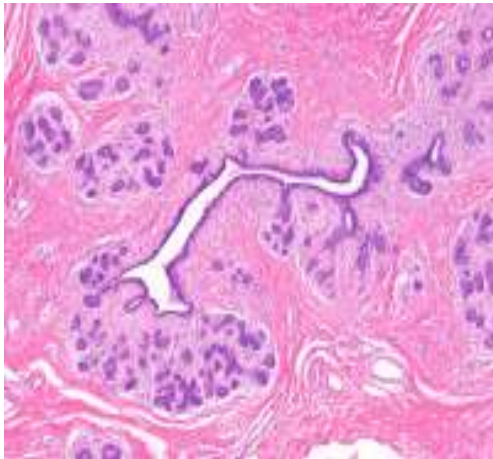
Slika 1. Građa dojke, sagitalni presjek (Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split).

1.1.2. Histološka građa dojke

Mliječna žlijezda odrasle žene sastoji se od 15 do 25 režnjeva (lobula) koji su odvojeni gustim masnim i vezivnim tkivom. Svaki režanj građen je od manjih režnjića (lobulusa) koji sadrže epitelno žljezdano, intralobularno rahlo i miksomatozno vezivo te po koji limfocit.

Osnovna funkcionalna jedinica u dojci zove se terminalna duktulolobularna jedinica (TDLU). Nastaje sukcesivnim granjanjem glavnog odvodnog kanala do terminalnih kanalića koji se završno granaju u nakupinu malih acinusa izgleda grejpa koja tvori već spomenuti režnjić. U normalnoj dojci kanalići i režnjići obloženi su sa dva tipa stanica, diskontinuiranim slojem mioepitelnih kontraktilnih stanica na bazalnoj membrani te luminalnim epitelnim stanicama koje oblažu lumen. Mioepitelne stanice pomažu u sekreciji mlijeka tijekom laktacije i imaju važnu

ulogu u održanju normalne strukture i funkcije režnjića i bazalne membrane (1). Drugi sloj stanica, epitelne luminalne stanice oblažu lumen. Luminalne stanice terminalnih kanalića i režnjića proizvode mlijeko za razliku od stanica koje oblažu veće kanale.



Slika 2. Tkivo mliječne žlijezde. HE, X40 (Zavod za histologiju i embriologiju MEF-a Sveučilišta u Zagrebu).

1.2. MOLEKULARNI MEHANIZMI DJELOVANJA HORMONA

1.2.1. Sinteza hormona estrogena, progesterona i njihovi receptori

Estrogeni i progestini dvije su vrste spolnih hormona jajnika. Najvažniji, odnosno najpotentniji estrogen je 17β estadiol. Druga dva prirodna estrogena su estron i estriol. Najvažniji progestin je progesteron, no zajedno s njim izlučuje se i 17α -hidroksiprogesteron. Estrogeni i progestini su steroidni hormoni, sintetiziraju se u jajnicima. Neznatne količine ovih hormona u zdrave žene luči i kora nadbubrežne žlijezde, a u trudnoći i posteljica. I estrogeni i progesteroni prenose se krvlju vezani za plazmatski albumin i globuline, veza je labava tako da se za oko 30 minuta otpuštaju u tkiva. Oba hormona su topivi u mastima te prolaze kroz staničnu membranu. Djeluju samo u onim stanicama koje sadržavaju specifične receptorske molekule: estrogenske (ER) ili

progesteronske (PR) receptore. Te su receptorske molekule bjelančevine koje funkcionalno sadržavaju domenu za ligand (hormon) i DNK (deoksiribonukleinska kiselina) vezujuću domenu. Članovi su superporodice jezgrinih hormonskih receptora. Kompleks hormon-receptor nakon vezanja se premješta iz citoplazme u jezgru, veže se za molekulu DNK i inicira transkripciju. Za molekule estrogena poznata su dva tipa receptora kodirana različitim genima, tzv. klasični ER α , kloniran 1986. i drugi noviji tzv. ER β kloniran 1996. Određuju ih dva različita gena. Iako su ER α i ER β homologni u veznim domenama za steroide i DNK, ER β gen je manji, smješten je na drugom dijelu kromosoma te kodira kraći protein (2,3). Različita ali u nekim dijelovima preklapajuća distribucija ER β sa ER α posreduje u ne-klasičnim efektima estrogena i anti-estrogena. Rezultati eksperimentalnih istraživanja pokazuju da ER β utječe i negativno modulira djelovanje ER α (4).

Zna se da postoje najmanje dva progesteronska receptora, PR-A i PR-B. Za razliku od estrogenskih receptora, određuje ih isti gen, s razlikom u početnom mjestu transkripcije. Transkripcija, odnosno sinteza progesteronskih receptora pozitivno je regulirana estrogenima i estrogenskim receptorima. Drugim riječima, pozitivnost na PR upućuje na funkcionalno očuvani estrogen-receptorski stimulacijski put (5,6,7). Pretpostavlja se da je PR-B glavni aktivator transkripcije gena, dok je PR-A supresor aktivnosti PR-B (8). Nedavna istraživanja na stanicama karcinoma dojke uzgojenima da izražavaju samo PR-A ili PR-B (9) te na eksperimentalnim životinjama u kojima su pojedine izoforme izbačene (10) govori da PR-A kao i PR-B aktivira transkripciju gena za progesteronske receptore te da PR-B a ne PR-A kontrolira utjecaj progesterona na razvoj tkiva dojke (10).

1.2.2. Spolni hormoni, razvoj dojke, nastanak tumora

Estrogeni imaju ključnu ulogu u razvoju tkiva dojke i nastanak tumora. U prilog tome govore brojni klinički i epidemiološki podaci. Uslijed izostanka funkcije jajnika, dolazi do potpunog zastoja u razvoju tkiva dojke te je nužna nadomjesna hormonska terapija u obliku estradiola da bi se uspostavio normalan razvoj dojke (11). Povećana izloženost promjenjivim razinama estradiola u tijeku menstrualnog ciklusa, za vrijeme ranog puberteta, kasne menopauze ili kasne prve trudnoće povećava rizik nastanka karcinoma dojke u jednakoj mjeri kao i korištenje egzogenih

estrogena u obliku oralnih kontraceptiva ili hormonske nadomjesne terapije (12). Dokazano je da anti-estrogenska terapija smanjuje incidenciju karcinoma dojke u visoko rizičnih žena (13). Pokusi na eksperimentalnim životinjama u kojima je izbačen gen za ER α potvrdili su neizostavnu ulogu estradiola na razvoj tkiva dojke i nastanak tumora (14). Žlijezdano tkivo u tim pokusnim životinjama sastoji se od rudimentarnih kanalića ograničenih na područje oko bradavice. Niti terapija estradiolom ne može potaknuti njihov razvoj. Oni su također rezistentni na malignu transformaciju nakon transdukcije s onkogenima.

Bitno je manje podataka i dokaza o ulozi progesterona na razvoj tkiva dojke. Pokusi na eksperimentalnim životinjama kojima je izbačen gen za progesteron ukazuju na njegovu ulogu u nastanku i funkciji lobuloalveolarnih struktura (15). Pretpostavlja se da progesteron ima sličnu ulogu u ženskoj dojci te stimulira TDLU formaciju i ekspanziju tijekom puberteta i trudnoće. Nedavna su istraživanja pokazala da uzimanje egzogenih progestina u obliku kombinirane hormonske nadomjesne terapije u postmenopauzalnih žena povećava rizik za nastanak karcinoma dojke u znatno većoj mjeri nego da se uzimaju samo estrogeni (16,17).

1.2.3. Izraženost estrogena i progesterona u normalnom tkivu dojke

Većina podataka o ekspresiji ER i PR u normalnom tkivu dojke rađena je iz tkiva žena koje nisu bile trudne i nisu dojile. Istraživanja su pokazala da je ER α izražen u oko 15-30% luminalnih epitelnih stanica i nigdje drugdje u dojci (18). ER β je izražen u većini luminalnih epitelnih i mioepitelnih stanica, a detektiran je i u fibroblastima i drugim stromalnim stanicama (19). Na žalost, ovako široka rasprostranjenost ne daje nam mnogo informacija o stvarnoj funkciji ER β u dojci s obzirom da studije na eksperimentalnim životinjama u kojima je ER β izbačen pokazuju da se unatoč tome, tkivo dojke normalno razvija, te da te životinje normalno doje svoje potomke (20). Navedeni podaci ukazuju da bez obzira na ograničenu rasprostranjenost, ER α je glavni medijator estradiolske funkcije u tkivu dojke. PR je kao i ER α izražen u 15-30% luminalnih epitelnih stanica i nigdje drugdje u dojci (18). Dvostrukim imunofluorescentnim bojenjem pokazano je da su sve stanice koje su bile pozitivne na PR, također izražavale i ER α . Te stanice, pozitivne na steroidne receptore, bile su negativne na proliferacijske markere, dok su njima susjedne stanice bile pozitivne na proliferacijske markere (18). Opisana disocijacija između

ekspresije steroidnih receptora i proliferacije potvrđena je i od strane drugih istraživača osim u tkivu dojki žena, i u eksperimentalnih životinja (21). Trenutna hipoteza je da estradiol i/ili progesteron indirektno kontroliraju proliferacijsku aktivnost luminalnih epitelnih stanica na način da stanice koje imaju pozitivne hormonske receptore djeluju kao „senzori“ te šalju pozitivne ili negativne parakrine i/ili jukstakrine signale susjednim proliferacijski aktivnim stanicama, ovisno o koncentraciji cirkulirajućih estradiola/progesterona. Taj bi mehanizam djelovanja objasnio osjetljivost epitela dojke na steroidne hormone te proliferaciju stanica samo onda kada je koncentracija hormona rasta dovoljno visoka i dugotrajna. Na taj bi se način držala pod kontrolom pojačana diobena aktivnost osim u slučajevima trudnoće.

1.2.4. Odnos između estrogena, progesterona, proliferacije i nastanka tumora

Povećana ekspresija ER α mogla bi biti jedna od najranijih promjena u procesu nastanka tumora. Khan i suradnici (22) pokazali su povećanu ekspresiju ER α u normalnom epitelu iz tkiva dojki koje sadrže tumore. U prilog tome govori činjenica, iz istraživanja na populaciji Japanki, da je ekspresija ER α znatno viša u tkivu dojki žena sa visokim rizikom od nastanka karcinoma dojke u uporedbi sa populacijom Japanki koje imaju relativno mali rizik od nastanka karcinoma dojke (23). Razina ER α je povišena u najranijoj fazi duktalne hiperplazije te se još više povećava s povišenjem stupnja atipije tako da većina stanica u atipičnoj duktalnoj hiperplaziji i u DCIS-u (duktnom in situ karcinomu) niskog i srednjeg nuklearnog gradusa sadrže ER α (24,25). U DCIS-u visokog nuklearnog gradusa manje je ER α pozitivnih stanica, ali je povećana ekspresija markera kao što je c-erb-2/HER-2, što ukazuje da te promjene imaju drugačije aktivne puteve koji dovode do nastanka invazivnog karcinoma.

Pojedini podaci pokazuju da je ekspresija ER β u atipičnoj duktalnoj hiperplaziji i DCIS-u smanjena u usporedbi s normalnim epitelom tkiva dojke (26). S povećanjem atipije i proliferacije povećava se omjer ER α /ER β . Ta je činjenica u korelaciji sa podatkom da ER β ima negativan utjecaj na djelovanje ER α (26).

Postoji nekoliko studija o ekspresiji PR u premalignim i invazivnim lezijama koje govore u prilog povećane ekspresije PR sa povećanjem atipije (24). Pojedini radovi govore u prilog povećanja omjera PRA/PRB u tijeku nastanka tumora, pri čemu je povećanje omjera rezultat

povećane koncentracije PRA (27). Oko 60% invazivnih karcinoma dojke izražavaju PRA i/ili PRB, te se ekspresija PRA uzima kao pokazatelj intaktne funkcije ER α (24). Pacijenti koji imaju tumore s pozitivnim ER α i PR imaju najbolji odgovor na endokrinu terapiju i bolju prognozu od onih pacijenata čiji tumori nemaju izražene steroidne receptore.

1.3. MATIČNE STANICE I KARCINOM DOJKE

1.3.1. Matične somatske i matične tumorske stanice

Unatoč napretku u dijagnostici i liječenju u zadnjih nekoliko desetljeća, karcinom dojke i dalje ostaje vodeći uzrok smrti od malignih bolesti u žena, prvenstveno zbog njegove sklonosti stvaranju metastaza (28). Krivulje preživljavanja kod bolesnica s karcinomom dojke dosežu plato nakon 7- 10 godina dok krivulje preživljavanja kod većine drugih karcinoma dosežu plato nakon 2-5 godina (29). Dužina vremena potrebna za postizanje platoa preživljavanja ukazuje na postojanje određenog broja tumorskih stanica otpornih na primarnu terapiju, sa sposobnošću „skrivanja“ i mirovanja unutar tijela, neotkrivenih tijekom dugog perioda vremena te sposobnih da u određenom trenutku uzrokuju rekurenciju bolesti.

Prije 10-ak godina John Dick je pokazao da nastajanje leukemije uzrokuje malena populacija stanica koje imaju neograničenu sposobnost samoobnavljanja. Te su stanice nazvane matičnim tumorskim stanicama (30). Nakon toga matične stanice izolirane su iz mnogih drugih solidnih tumora uključujući dojku, mozak, crijevo, gušteraču, prostatu, pluća te glavu i vrat (31-38). Postoje dva osnovna klonalna modela nastanka i progresije tumora uzrokovana neograničenom diobom stanica; stohastički i hijerarhijski model. Stohastički model temelji se na postulatu da sve tumorske stanice imaju jednak tumorigeni potencijal tj. da svaka tumorska stanica ima jednaku vjerojatnost formirati novi tumor sa značajkama sličnim primarnom (39). Hijerarhijski model temelji se na postojanju malene populacije stanica unutar tumora koje imaju tumorigeni potencijal, a ostatak tumora čine stanice u raznim fazama diferencijacije koje same ne mogu obnoviti tumor (39). Ovaj zadnji model je u skladu s hipotezom postojanja matičnih tumorskih stanica po kojoj samo one imaju sposobnost samoobnavljanja za razliku od diferenciranih stanica koje čine većinu tumorske mase.

Prije otkrića matičnih tumorskih stanica znalo se za postojanje somatskih matičnih stanica koje su odgovorne za homeostazu u tkivima. Odgovorne su za regeneraciju i obnavljanje tkiva, a aktivirane su okolišnim signalima kao npr. hormonima tijekom razvoja ili uslijed oštećenja tkiva i organa (40,41). Te su stanice na samom početku hijerarhijskog niza diferencijacije. One miruju i čekaju aktivacijski signal te se onda dijele asimetrično ili simetrično. Asimetrično se dijele u progenitorsku stanicu i matičnu stanicu (42). Na taj se način zadržava početni broj matičnih stanica, a ujedno se stvara osnova za proizvodnju diferenciranih stanica budući da progenitorske stanice započinju proces diferencijacije i determinacije, ograničeno se dijele, a onda umiru. Kada se stanice dijele simetrično nastaju dvije matične stanice (43).

Matične se stanice razlikuju od drugih vrsta stanica u tijelu. Njihova jedinstvena priroda proizlazi iz proliferacijskih mogućnosti i sposobnosti da se specijaliziraju. Postoje dvije osnovne vrste matičnih stanica: embrionalne i adultne.

Embrionalne matične stanice se kao što im ime govori nalaze u embriju. Nastaju nakon prvih 5,6 dijeljenja oplođenog jajašca, iz malene grupe stanica u unutarnjoj staničnoj masi koja je dio blastociste. Te su stanice pluripotentne te iz njih nastaju svi tipovi stanica iz sva tri zametna listića.

Za adultne se matične stanice smatra da su nediferencirane stanice smještene između diferenciranih stanica u tkivu ili organu, imaju sposobnost samoobnavljanja i mogu se diferencirati u sve osnovne specijalizirane tipove stanica u tkivu ili organu. Izvori adultnih matičnih stanica su koštana srž, mrežnica oka, mozak...One imaju ograničen potencijal, proizvode stanice koje se diferenciraju u zrele, funkcionalne stanice, a odgovorne su za normalno obnavljanje tkiva. Njihova primarna funkcija je održavanje homeostaze u tkivu ili organu, tj. nadomještanje izumrlih stanica zbog ozljeda ili bolesti. (43)

Matične tumorske i matične somatske stanice dijele nekoliko važnih odlika. Obje vrste su dugoživuće te imaju mogućnost samoobnavljanja i intenzivne proliferacije (41). Tumorske matične stanice posjeduju samodostatnost u signalima rasta te nekontroliranoj staničnoj proliferaciji dok su to kod somatskih matičnih stanica strogo kontrolirani procesi koji se događaju tijekom embriogeneze i organogeneze a aktiviraju se i tijekom reparacije tkiva odraslog organizma (42). Sve navedene odlike čine matične stanice sklonima akumulaciji štetnih mutacija te genomskoj nestabilnosti unatoč aktivnim mehanizmima popravka DNK. Obje vrste matičnih stanica su relativno rezistentne na vanjske toksine, kemoterapeutike i

radijacijsko zračenje zbog ekspresije ABC transportnih proteina (ABC-G2 transportera) koji izbacuju toksine izvan stanice koristeći ATP (adenozin 3-fosfat). Činjenica da matične stanice imaju spori stanični ciklus čini ih relativno otpornima na zračenje. Matične tumorske stanice karakterizira i mobilnost što uzrokuje njihovu migraciju i naseljavanje u udaljena tkiva što čini bolest metastatskom.

1.3.2. Matične stanice i karcinom dojke

Indikacije da matične stanice imaju ulogu u nastanku karcinoma dojke dolaze iz epidemioloških podataka o incidenciji raka dojke nakon izlaganja zračenju. Žene iz Hiroshime i Nagasakija koje su bile izložene radijacijskom zračenju u kasnoj adolescenciji imale su veću učestalost pojave raka dojke nakon 20 i 30 godina u usporedbi sa ženama koje su bile izložene istom zračenju, ali u drugoj životnoj dobi (44). Ti podaci ukazuju da matične stanice tkiva dojke odraslih žena akumuliraju genetske promjene koje dovode do višegodišnjeg procesa transformacije te naposljetku nastanka solidnih tumora.

Nedavno su Al-Hajji i kolege dokazali postojanje matičnih stanica karcinoma dojke koje uzrokuju nastanak karcinoma (31). Ove stanice identificirane su na temelju ekspresije površinskih markera te su označene kao CD44+, CD24-/nisko, ESA+ (epithelial surface antigen). Dokazao je da je iniciranje samo 100 matičnih stanica karcinoma dojke u NOD/SCID (nonobese diabetic/severe combined immunodeficient) miševe dovelo do razvoja karcinoma dojke. Nasuprot tome injiciranje 20000 tumorskih stanica dojke koje nisu matične, nije dovelo do stvaranja tumora.

Važan napredak u identifikaciji i proučavanju matičnih stanica normalnog tkiva dojke i karcinoma dojke dogodio se uspostavljanjem staničnih kultura ovih stanica. Saznanja o postojanju matičnih neuralnih stanica i njihovoj sposobnosti stvaranja neurosfera (45,46) pomogla su uzgoju i identifikaciji matičnih stanica karcinoma dojke koje su sposobne tvoriti mamosfere (47). U normalnoj dojci diferencijacija somatskih matičnih stanica generira 3 stanične linije: duktalnu luminalnu, mioepitelnu i alveolarnu epitelnu staničnu liniju. Te matične stanice imaju ključnu ulogu u regeneraciji tkiva dojke tijekom trudnoće, dojenja i involucije. Od alveolarne epitelne stanične linije nastaju sekretorni lobuli a od duktalne epitelne stanične linije

luminalne stanice i mioepitelne stanice. Nedavno je u radovima dokazano da matične stanice karcinoma dojke nastaju iz matičnih stanica tkiva dojke uslijed genetskih i epigenetskih poremećaja regulacije koji kontroliraju samoobnavljanje stanica (31,48) te da mutacije pogađaju matične somatske stanice (30,49,50). Postojanje matičnih somatskih stanica u tkivu dojke dokazano je u pokusima na eksperimentalnim životinjama kada se nakon transpalantacije jedne matične stanice u imunodeficientnu životinju generirala funkcionalna mliječna žlijezda (51,52). Hipotezu o invazivnom karcinomu dojke koji nastaje poremećajem regulacije matične stanice potvrđuje i činjenica da su tumori dojke vrlo često klonalnog podrijetla (53). Invazivni karcinomi dojke su heterogeni po morfološkim tipovima, molekularnom profilu i kliničkom ponašanju. Unutar stanične populacije istog tumora postoje značajne varijacije u genotipu i fenotipu (54,55). Svjetska zdravstvena organizacija (eng. World Health Organisation, WHO) razlikuje na temelju načina rasta i citoloških karakteristika 18 različitih subtipova karcinoma dojke sa različitim kliničkim ponašanjem. Osim morfologije, invazivne karcinome dojke određuju i proliferacijski potencijal (ekspresija KI67), prisutnost hormonskih receptora ER ili PR te eventualna ekspresija HER2/neu. Navedeni se parametri koriste u kliničkoj praksi zbog predviđanja prognoze te odgovora /rezistencije na citotoksičnu/hormonsku terapiju. (56-58).

Histološke su studije pokazale da većina tumora dojke nastaje iz terminalne duktulobularne jedinice (eng. terminal ductulobular unit, TDLU), te da imaju morfološke karakteristike luminalnih epitelnih stanica. Sve epitelne stanice sadrže intracitoplazmatske keratine od kojih razlikujemo 20-ak vrsta. 10 ih je specifično za određene vrste stanica te se rutinski dokazuju imunohistokemijom. U kanalićima dojke luminalne stanice izražavaju visokomolekularne citokeratine (npr. CK 17,18,19) a bazalne stanice niskomolekularne citokeratine karakteristične za višeslojni pločasti epitel (CK5/6). Karcinomi se dojke dijele prema tipu intraduktalnih stanica iz kojih nastaju, određivanjem na temelju imunohistokemije, u dvije osnovne kategorije: oni koji ekspimiraju luminalne keratine (nastaju iz luminalnog tipa stanica) i oni koji ekspimiraju keratine višeslojnog pločastog epitela (nastaju iz bazalnog tipa stanica) (59-61). Većina karcinoma dojke nastaje iz luminalnog epitela ali podaci govore da 15% karcinoma dojke ima karakteristike bazalnog epitela. Bazalni tip karcinoma dojke je nedavno uveden entitet, varijanta je bolesti mioepitelnih stanica koju karakteriziraju visok histološki gradus (62), odsutnost HER2 (erB2), negativni receptori za ER i PR (63) kao i visok proliferacijski indeks te ekspresija bazalnih keratina niske molekularne mase koji su pozitivni u višeslojnom pločastom epitelu (npr.

keratin 5) (60,64). Često ih se naziva i trostruko negativnima. Primjećeno je da je kod njih prisutna mutacija te smanjeno izražavanje p53 i BRCA1 (tumor supresorski gen od engl. breast cancer 1) (65). Imunohistokemijskim tehnikama relativno ih je lako dijagnosticirati, ali osnovni klinički problem leži u nedostatku terapije te lošoj prognozi. Preživljenje je znatno smanjeno kao i vrijeme do relapsa bolesti (59). Iako se još uvijek nije utvrdila stanica iz koje nastaje ovaj tip tumora (62), većina ga istraživača povezuje sa progenitorskim/zametnim stanicama žljezdanog epitela dojke (66). Ako se uzmu u obzir imunohistokemijska obilježja matičnih stanica karcinoma dojke CD44 i CD24, i primjene na stanice izvodnih kanalića, vidi se da CD44+/CD24- stanice pokazuju osobine bazalnih stanica (ili mioepitelnih stanica) te da ekspimiraju gene za regulaciju pokretljivosti, dok su stanice s ekspresijom CD44-/CD24+ pokazale osobine više diferenciranih luminalnih epitelnih stanica i ispoljavale gene odgovorne za hormonski odgovor (67). S obzirom da su prema dosadašnjim spoznajama matične stanice karcinoma dojke ER, PR, HER2 negativne te da ekspimiraju barem jedan od markera bazalnih stanica, pojedini autori smatraju da bazalni tip karcinoma dojke nastaje od matičnih stanica koje čine većinu tumorske mase. S postupnom diferencijacijom matičnih stanica prema progenitorskim dolazi do ekspresije hormonskih receptora.

1.3.3. Matične stanice i metastatska bolest dojke

Prije nekoliko godina otkriveno je da su upravo matične stanice karcinoma odgovorne za metastatski karcinom dojke u pacijentica s ranim karcinomom dojke (68) Ukazano je na sposobnost matičnih stanica karcinoma dojke da migriraju izvan dojke. Dr.Balić i suradnici otkrili su u koštanoj srži pacijentica s ranim karcinomom dojke matične stanice karcinoma dojke s fenotipom CD44+/CD24- koje su činile 71% populacije diseminiranih tumorskih stanica. Pacijentice s karcinomom dojke imaju doživotno veći rizik od smrti u usporedbi s ostalom populacijom (69). Tome vjerojatno doprinosi postojanje matičnih stanica karcinoma unutar populacije diseminiranih stanica karcinoma ovih pacijentica. Nedavna analiza (70) na velikom uzorku pokazala je da unatoč tome što je prisutnost diseminiranih tumorskih stanica indikator lošije prognoze, ipak značajan broj pacijentica pokazuje dobre rezultate nakon 10 godina od postavljanja dijagnoze. Razlog takvoj varijabilnosti mogla bi biti populacija stanica sposobnih da

se „utišaju“, smire u koštanoj srži i/ili udaljenim organima a koje se mogu „pokrenuti“ nakon određenog inicijacijskog događaja te uzrokovati agresivnu metastatsku bolest s lošom prognozom.

1.4. HER2

1.4.1. Građa i funkcija HER2

HER1, HER2, HER3 I HER4 (poznati i kao receptori za epidermalni faktor rasta ErbB-1, ErbB-2, ErbB-3 i ErbB-4) su transmembranski receptori s aktivnošću tirozin kinaze koji normalno reguliraju rast i preživljenje stanica, kao i adheziju, migraciju, diferencijaciju i druge stanične odgovore (71). Svaki od tih receptora sastoji se od vanstanične vezne domene, transmembranskog lipofilnog dijela i (osim HER3) unutarstanične funkcionalne domene vezane uz tirozin kinaznu aktivnost, koja se aktivira homo i heterodimerizacijom potaknutom vezanjem liganda. Za razliku od vanstaničnih domena druga tri HER receptora, vanstanična domena HER2 receptora nalikuje ligand-aktiviranom stanju te dimerizira s drugim ErbB receptorima i u odsutnosti liganda čime se šalje signal za diobu (72). Prekomjerna ekspresija ili mutacija receptora također potiče dimerizaciju (73). Jednom aktivirani receptori pokreću kaskadu signala koji potiču stanično preživljenje i proliferaciju (74).

Prekomjerna ekspresija receptora (tipa 2) za humani epidermalni faktor rasta (HER2, ili HER2/neu ili ErbB-2) prvi je puta opisana pred više od dva desetljeća (75). Prisutna je u 20-30% invazivnih karcinoma dojke. Općenito gledajući, pacijenti čije tumorske stanice imaju povećanu ekspresiju ovog receptora ili povećan broj kopija gena imaju kraći životni vijek te različit odgovor na brojne kemoterapeutike i hormonsku terapiju (76-80). Stoga je bilo izuzetno važno razviti protutijelo na taj receptor. Jedan od takvih lijekova je humano monoklonalno protutijelo-trastuzumab (Herceptin, Genetech), koje se veže na ekstracelularnu jukstamembransku domenu HER2 te inhibira proliferaciju i preživljenje tumora ovisnih o HER2.

1.4.2. Povećana ekspresija HER2 i tumori

HER2 signalni put potiče proliferaciju stanice aktivirajući RAS-MAPK put i inhibira staničnu smrt aktivirajući put fosfatidilinozitol 3'kinazu-Akt-mTOR (74). AKT uključuje tri enzima od kojih je svaki član serin-treonin protein kinazne obitelji i koji inhibira apoptozu (programiranu staničnu smrt). Proliferacija ovisna o HER2 prvi puta je objavljena na modelu eksperimentalne životinje kojoj je kemijski induciran nastanak neuroblastoma (75). Iako se od tada prekomjerna ekspresija HER2 otkrila u brojnim zloćudnim humanim tumorima, amplifikacija je gena rijetka osim u karcinomu dojke. Terapija anti-HER2 se zasada indicira samo u toj bolesti (76-83). Prekomjerna ekspresija HER2 je prisutna u 20-30% invazivnih karcinoma dojke, a u istom je postotku dokazana i amplifikacija gena fluorescentom in situ hibridizacijom (FISH) (84).

1.5. P53

1.5.1. Funkcije p53

Prvi puta opisan 1979. godine, te iako je inicijalno smatran onkogenom, protein p53 je bio prvi identificiran tumor supresor gen. Funkcija ovog proteina je u kontroli staničnog ciklusa, pri čemu eliminira i inhibira proliferaciju abnormalnih stanica, te na taj način sprječava nastanak tumora. Poremećaj regulatorске funkcije p53 u stanicama nalazi se u mnogim ako ne i u svim ljudskim tumorima. Signalni put p53 aktivira se kao odgovor na stanični stres. Promjene, genetskog i epigenetskog karaktera, identificirane su kao regulatori aktivnosti p53. Pokazalo se da te iste promjene utječu i na transkripcijske ciljeve p53 naročito u karcinomima dojke koji su ispoljavali divlji-tip (nemitiran) p53.

Nekoliko nezavisnih puteva aktivacije p53 ovisni su o različitim regulacijskim kinazama (86).

1.5.2. Način djelovanja p53

Protein p53 djeluje kao inhibitor staničnog ciklusa. Ovaj protein djeluje preko inhibitora ciklin-ovisne kinaze p21^{Waf1}, koji se veže na ciklin B1-CDK1 kompleks u citoplazmi, te ga inhibira i zadržava stanicu u G2 fazi staničnog ciklusa. Također, p53 djeluje i kao regulator apoptoze. Proapoptotički proteini direktno ovisni o p53 su između ostalih i Bax, Apaf 1, PUMA, p53AIP1, PIDD and NOXA. Divlji tip p53 direktno aktivira ekspresiju brojnih gena koji sudjeluju u popravku DNK, uključujući gen za ribonukleotid reduktazu p53R2 uključen u popravak oštećenja DNK. P53 inhibira angiogenezu i nastanak metastaza preko inhibicije mamarne serin proteaze (maspin), koji inhibira angiogenezu, invaziju i metastaze. Drugi protein supresor metastaza je KAI1, također reguliran proteinom p53.

1.5.3. Inaktivacija p53 u karcinomima

Gen p53 je najčešće mutiran u mnogim karcinomima čovjeka. Procijenjeno je da se mutacije ovog gena događaju u 50% svih karcinoma. Mutacije proteina gotovo uvijek su u dijelu koji se specifično veže za DNK te posljedično mijenja aktivaciju gena reguliranih divljim tipom proteina (86). Interesantno je da je broj mutacija u p53 veći nego kod ostalih tumor supresor gena.

Mutacije p53 su najčešće u osoba sa Li-Fraumeni sindromom, koji u sebi nosi povećan rizik za nastanak karcinoma dojke (87) što upućuje na bitnu ulogu p53 u karcinogenezi tumora dojke. U ranim studijama, ekspresija mutiranog p53 dokazana je u staničnim linijama karcinoma dojke (88). Gubitak heterozigotnosti (LOH) u p53 genu dokazan je kao čest događaj u primarnom karcinomu dojke (89), a očituje se u nekim slučajevima kao dodatna mutacija ostatnog alela. U karcinomima crijeva ostatni p53 alel je mutiran u većini slučajeva, ali u karcinomima dojke najmanje 60% slučajeva s LOH-om zadržavaju divlji tip p53 alela (90). Mnoge studije su identificirale kodirajuće mutacije p53 u karcinomu dojke koje su se pokazale kao najčešća somatska genetska promjena u raku dojke. Zaista, opsežna analiza je pokazala da samo 20% slučajeva karcinoma dojke ekspimiraju mutirani p53 (90). Nekoliko je istraživanja pokušalo utvrditi stadij u karcinogenezi tumora dojke u kojem se pojavljuje mutacija p53. Pažljiva analiza

mikrodisektiranog tumorskog tkiva pokazala je da u intraduktalnim karcinomima niskog gradusa (DCIS) nije bilo mutacija za razliku od DCIS-a visokog gradusa u kojima su bile detektirane mutacije (91).

Iako je postotak mutacija p53 u karcinomima dojke samo 20% (90), pokazalo se da su određeni tipovi te bolesti povezani s mutacijom p53 u znatno većem postotku. Na primjer brojne su studije pokazale povećanu učestalost i spektar mutacija u nosilaca mutacija zametne linije BRCA1 i BRCA2 (92-94). U medularnom se karcinomu dojke mutacija p53 dešava u 100% tumora (95).

Iako se struktura p53 detaljno proučava, učestalost je mutacija p53 u karcinomima dojke znatno manja nego u ostalim tumorima. Koji su molekularni mehanizmi u karcinomima bez mutacija koji smanjuju tumor supresorske karakteristike divljeg tipa p53? Pojedina su istraživanja pokazala da se u određenom broju slučajeva s divljim tipom p53 očitivalo samo citoplazmatsko proteinsko bojenje (96). Odsutnost divljeg tipa proteina iz jezgre pokazuje potencijalni mehanizam inaktivacije p53 neovisno o mutaciji.

1.5.4. Status p53 govori o prognozi pacijenata s karcinomom dojke

Mogućnost da p53 utječe na biološko ponašanje tumora sugeriran je u ranim studijama koje su pokazale prisutnost p53 mutacija u agresivnim karcinomima dojke (97). Većina istraživanja podupire teoriju o lošoj prognozi uz prisutnost p53 mutacija. Potencijalne korelacije između tipa p53 mutacije i kliničkog fenotipa karcinoma dojke (98) pokazala su da su mutacije koje pogađaju aminokiseline odgovorne za vezanje s DNK povezane s izrazito agresivnim karcinomima dok su karcinomi bez mutacija bili srednjeg kliničkog fenotipa.

Serpin-maspin je inhibitor angiogeneze, invazije i metastaze. Opisano je postupno smanjenje ekspresije maspina u slijedu DCIS> invazivni karcinom>metastatski karcinom što jasno određuje njegovu ulogu u karcinogenezi (99) a na njegovu transkripciju izravno utječe divlji tip p53. Kod karcinoma dojke određene mutacije p53 su u korelaciji s primarnom rezistencijom na doksorubicin te je dokaz tih mutacija povezan s ranim relapsom bolesti (100,102).

Nedavna su istraživanja otkrila tumor-specifičnu DNK u plazmi velikog broja pacijenata s karcinomom dojke. Mutacija p53 se mogla otkriti u perifernoj krvi pacijenata s primarnim tumorima koji su također imali istu mutaciju. Štoviše, prisutnost je mutacije p53 u DNK iz

plazme čvrsto povezana s brojnim kliničkopatološkim parametrima i bitan je pognostički faktor (102). Protutijela na p53 također su otkrivena u pacijenata s karcinomom dojke. Prisutna su u 15% pacijentica ali nisu bila u korelaciji sa stadijem bolesti (103). Nedavna su istraživanja pokazala poveznicu između hormonskih receptora i p53. U MCF-7 staničnoj liniji karcinoma dojke, estrogen receptor alpha (ER α) se direktno veže za p53 i koči njegovu funkciju (104). Ne zna se na koji se način p53 aktivira u karcinomima dojke nakon zračenja. Studija Liu i suradnika (105) nam nudi odgovore na to pitanje kroz 3 aspekta:

- a) Radijacija inhibira rast MCF-7 stanica tumora i stabilizira p53 ali nema uočljiv učinak na razinu ER α proteina.
- b) Unatoč povećanju razine p53, radijacija značajno smanjuje interakciju između ER α i p53.
- c) Radijacija povećava p53 posredovanu transkripcijsku aktivaciju nekoliko ciljnih gena. Prekidanje interakcije ER α -p53 *in vivo* rezultira vraćanjem funkcionalnosti p53 te je stoga to mehanizam staničnog odgovora na radijaciju.

Ta otkrića sugeriraju da bi poništavanje inhibitornog efekta ER α na p53 mogao biti molekularni mehanizam aktivacije p53 nakon zračenja u karcinomima dojke te bi se taj mehanizam mogao iskoristiti u poboljšanju učinkovitosti kombinirajući zračenje sa sistemskom terapijom, npr. hormonskom i kemoterapijom.

1.5.5. Uloga p53 u matičnim stanicama karcinoma dojke

Matične stanice definirane su sposobnošću da se dijele u nove zametne stanice (samoobnavljanje) i u stanice koje će se diferencirati. Asimetričnom mitotskom diobom nastaje jedna matična stanica koja zadržava sposobnost samoobnavljanja i druga progenitorska koja se daljnjim diobama diferencira dok ne dođe u konačno postmitotsko diferencirano stanje. Simetričnom diobom nastaju dvije matične stanice. Dva su podležeca mehanizma koja dovode do asimetrične diobe dokazana u kralješnjaka. Jedno je asimetrična dioba polarnosti i mehanizama koji određuju sudbinu stanice, a druga je asimetričan položaj stanica kćeri podložnih vanjskim utjecajima. Dvije stanice nastale asimetričnom diobom bitno se razlikuju u

proliferativnom potencijalu. Matična stanice miruje ili polagano proliferira, dok se progenitorska stanica aktivno dijeli. Tako se osigurava produkcija velikog broja diferenciranih progenitorskih stanica, a zadržava relativno mala količina dugo živućih matičnih stanica (106).

Opsežnu studiju o utjecaju p53 na rast i diferencijaciju matičnih stanica karcinoma dojke radili su nedavno Cicalese i suradnici (108). U pokusima su koristili ErbB-2 transgenični model karcinoma dojke te ga uspoređivali s tkivom dojke. Vidjeli su da p53 regulira polarnost stanične diobe u somatskim matičnim stanicama tkiva dojke i sugerirali da gubitak p53 potiče simetričnu diobu tumorskih matičnih stanica, doprinoseći povećanju tumorske mase. Kako gubitak p53 dovodi do nastanka ili ekspanzije matičnih stanica karcinoma dojke? Koristeći jedinstven model kulture luminalnih stanica dojke (BPEC-T), Yan i suradnici su pokazali da se p53 veže za promotor CD44, često korišten marker matičnih stanica karcinoma dojke te koči njegovu ekspresiju (108). Ti rezultati povezuju gubitak funkcije p53 sa povećanom ekspresijom CD44 koji potiče ekspanziju linije matičnih stanica u karcinomima dojke. Gubitak funkcije p53 u karcinomima dojke je usko povezan sa fenotipom i genotipom „basal-like“ (nalik bazalnom) karcinoma dojke (109,110).

1.6. EKSTRAKLULARNI MATRIKS I KARCINOMI DOJKE

1.6.1. Vezivno tkivo

Vezivno tkivo je najmekanija vrsta razvijenog potpornog tkiva u kojeg spadaju još hrskavično i koštano tkivo. Sve tri vrste potpornog tkiva nastaju diferencijacijom mezenhima. Mezenhim je prvo potporno tkivo koje potječe najvećim dijelom od mezoderma, a manjim dijelom od neuralnog grebena (mesektoderm). Javlja se kod zametka od 3-4 tjedna. Sastoji se od mreže razgranjenih, prvobitno jednakih stanica s malo citoplazme i relativno velikom i blijedom jezgrom, te od međustanične tvari, koja je u početku tekuća, a kasnije polutekuća ili sluzava. Mezenhimne stanice imaju sposobnost dijeljenja i ameboidnog kretanja.

Vezivno se tkivo sastoji od stanica i međustanične tvari. Tipovi su stanica slijedeći: fibrociti, nediferencirane mezenhimne stanice, histiociti, leukociti, metakromatske stanice, plazma stanice, masne stanice i pigmentne stanice. Fibrociti su stalne i najbrojnije stanice vezivnog tkiva. Relativno su velike, jako spljoštene s različito širokim izdancima. Mladi fibrociti imaju važnu ulogu u stvaranju međustanične tvari, osobito kolagenih vlakana; u tom funkcionalnom stanju se nazivaju fibroblasti. Nediferencirane mezenhimne stanice su veoma slične fibrocitima. Odlikuju se time što kroz čitav život ostaju u izvjesnom embrionalnom stanju, te posjeduju razne razvojne mogućnosti. Iz njih mogu nastati razne stanice vezivnog tkiva.

Između stanica vezivnog tkiva umetnuta je međustanična tvar. U prvim stadijima razvitka ona je čisto tekuća, a kasnije se sastoji od vezivnih vlakana i amorfnе tvari.

Kod viših se kralješnjaka vezivna vlakna s obzirom na njihova fizikalna i kemijska svojstva, kao i s obzirom na njihov odnos prema bojama svrstavaju u tri grupe. To su kolagena, elastična i retikularna vlakna.

1.6.2. Kolagena vlakna

Tijekom evolucije razvila se skupina strukturnih bjelančevina, koje su pod utjecajem okoline i funkcionalnih potreba životinjskog organizma poprimile različite stupnjeve krutosti, elastičnosti i čvrstoće. Te se bjelančevine zajednički nazivaju kolagen. Kolagen je jedna od najrasprostranjenijih bjelančevina u čovjekovom tijelu, jer čini 30% njegove težine. Iako je opisano više od dvanaest tipova kolagena, najčešći, najvažniji i najbolje proučeni su tipovi I, II, III, IV i V.

Kolagen tipa I količinski prevladava i rasprostranjen je posvuda u tijelu. U tkivima se javlja u obliku kolagenih vlakana, a nalazi se u kostima, dentinu, tetivama, čahurama, vezivnom dijelu kože.

Kolagen tipa II nalazi se u hijalinoj i elastičnoj hrskavici, i to samo u obliku vrlo tankih vlakana.

Kolagen tipa III nalazi se u tkivima obično udružen s kolagenom tipa I i vjerojatno je glavni kolagenski sastojak retikulinskih vlakana.

Kolagen tipa IV nalazi se u bazalnim membranama i ne čini vlaknaste strukture.

Kolagen tipa V nalazi se u embrionalnim ovojnica i krvnim žilama.

Nekada se smatralo da kolagen sintetiziraju samo fibroblasti, hondroblasti, osteoblasti i odontoblasti. Kasnije se ustanovilo da više vrsta stanica ima sposobnost sinteze kolagena. Glavne aminokiseline koje izgrađuju kolagen su glicin, prolin i hidroksiprolin. Kolagen sadržava dvije aminokiseline koje su karakteristične samo za tu bjelančevinu: hidroksiprolin i hidroksilizin, koje određuju njegova posebna svojstva.

Sinteza kolagenih vlakana odvija se u nekoliko faza:

1. Pojedinačni (alfa) polipeptidni lanci nastaju nizanjem aminokiselina na poliribosomima vezanim na hrapavu endoplazmatsku mrežicu i prelaze u cisterne kao molekule preprokolagena. Pri tome se odbacuje signalni peptid pa nastaje prokolagen.
2. Hidroksiliranje prolina i lizina nastupa nakon što se te aminokiseline ugrade u polipeptidne lance.
3. Glikoziliranje hidroksilizina slijedi nakon hidroksiliranja. Različiti tipovi kolagena sadržavaju različite tipove ugljikohidrata u obliku galaktoze ili glikozilgalaktoze vezane za hidroksilizin.
4. Svaki sintetizirani alfa-lanac ima na NH₂ i na COOH-kraju dodatne peptide, koji se nazivaju registracijski peptidi. Oni čine molekule prokolagena topljivima i sprečavaju njihovo udruživanje u kolagena vlakanca prije nego što napuste stanicu.
5. Izvan stanice, specifične proteaze, nazvane prokolagen-peptidaze odcjepljuju registracijske peptide. Ovako promijenjena bjelančevina, koja se naziva tropokolagen, može se udruživati u polimerna kolagena vlakanca.
6. U kolagenu tipa I i III vlakanca se spontano udružuju u vlakna

1.7. MIKROOKOLIŠ I KARCINOM DOJKE

Mikrookoliš tumora sastavljen je od staničnog i nestaničnog dijela. Stanični dio čine endotelne stanice, fibroblasti, mioepitelne stanice, periciti i upalne stanice prisutne u tumorskoj stromi i na invazivnim rubovima tumora. Nestanični dio čine proteini ekstracelularnog matriksa (ECM)

(111,112). Na proteine ECM-a utječu proteaze koje luče normalne ili tumorske stanice a mogu biti smještene i na površinama stanica. Da probiju ovu strukturnu barijeru, tumorske stanice su razvile dva odvojena mehanizma: proteaza-ovisnu i proteaza neovisnu invaziju (113-115). Proteaza-ovisna se prvenstveno bazira na matriks metaloproteinazama koje imaju ključnu ulogu u generiranju biološki aktivnih proteinskih fragmenata a oni izravno utječu na proliferaciju tumorskih stanica, na disocijaciju međustaničnih veza i apoptozu (113). Proteaza-neovisna invazija se bazira na kretanju nalik ameboidnom te se tumorske stanice provlače kroz vlakna matriksa poprimajući ameboidni oblik (113,115,116). Jedan od glavnih događaja u nastanku tumora je epitelna transformacija tumorskih stanica u mezenhimalne stanice u kojoj epitelne stanice gube svoje adhezijske molekule i bazolateralnu polarnost, a dobivaju prednje-stražnju polarnost koja im omogućava migraciju kroz ekstracelularni matriks (117, 118).

Djelovanje je ekstracelularnih proteina usklađeno sa djelovanjem hormona. U tkivu dojke epitelne i mioepitelne stanice su odijeljene od stromalnih stanica bazalnom membranom koja je građena od ekstracelularnih proteina. Njih proizvode stromalne ili mezenhimalne stanice. Adipociti luče laminin i proteoglikane a fibroblasti kolagen tipa I i IV te laminin. Brojne su studije pokazale da učinak steroidnih ovarijskih hormona na epitelne stanice dojke djeluje preko proteina ECM-a. Pokazali su da su epitelne stanice proliferirale pod utjecajem steroidnih hormona samo ako su bile kultivirane na ECM proteinima kao podlozi (119-121). I epitelne i stromalne stanice imaju izražene estrogene receptore (18). U *in vivo* i *in vitro* modelima vidjelo se da su određeni estrogene utjecaji na epitelne stanice modulirani stromom mliječne žlijezde. Istraživanja na eksperimentalnim životinama kao i na ljudskom tkivu pokazala su da su markeri proliferacije kao npr. KI 67, ugradnja BrdU i estrogene rijetko smješteni u istim epitelnim stanicama, sugerirajući da proliferirajuće epitelne stanice nisu ER⁺ (21,122). Studije na miševima kojima je izbačen gen za ER α pokazuju da je prisutnost ER⁺ strome neophodna za estrogen-inducirani proliferativni odgovor epitela (123). ER⁺ fibroblasti utječu na diferencijaciju i proliferaciju epitelnih stanica dojke preko hepatocitnog faktora rasta kojeg luče stromalne stanice (124). Taj bi se efekt pojačao nakon dodatka estrogena. Kad bi se estrogen dodavao samo u kulturu epitelnih stanica bez stromalnih stanica, proliferacija i diferencijacija bi izostale. U normalnoj dojci kolagen I djeluje na proliferaciju stanica preko čimbenika rasta EGF i IGF-1(125). Zajedničko djelovanje kolagena I i ER utječe i na proliferaciju stanica karcinoma dojke. U *in vitro* eksperimentima na kulturama ER⁺ stanica karcinoma dojke MCF-7 i T47D, estrogen je

potaknuo proliferaciju stanica kada su bile kultivirane na kolagenu I ili fibronektinu ali ne i na lamininu (126). Ista je grupa istraživača napravila *in vivo* pokuse na ovariektomiranim miševima koji su bili tretirani estrogenima. Potkožno su im bile implantirane MCF-7 stanice karcinoma dojke bez ekstracelularnog matriksa dok su drugoj skupini bile implantirane te iste stanice sa topivim kolagenom I ili lamininom. Rast je tumorskih stanica bio povećan u životinja kojima je dodan kolagen I dok je bio smanjen u životinja kojima je dodan laminin. Antiestrogenskom terapijom reduciran je rast tumora tretiranih kolagenom I ali nije utjecao na rast tumora tretiranih lamininom.

In vitro pokusi na epitelnim i mioepitelnim stanicama tkiva dojke i na staničnim linijama karcinoma dojke izvedenima na podlogama presvučenima kolagenom I pokazala su da je u normalnim stanicama došlo do proliferacije te formiranja duktusa dok je u kulturama tumorskih stanica dojke došlo do njihove proliferacije (127-130).

Sposobnost malignih neoplazmi da infiltrira okolno zdravo tkivo je osnovno obilježje neoplastičnih procesa. Kod mnogih epitelnih neoplazmi, taj proces uključuje sposobnost induciranja dezmplastičnog odgovora „tkiva domaćina“ koje tumor infiltrira. Taj je stromalni odgovor rezultat složenog međudjelovanja između „tkiva domaćina“ i tumorskog tkiva, a uključuje fibroblaste, brojne upalne stanice i novostvorene krvne žile. Istraživanja su pokazala da je gen za kolagen I α jedan od tri gena izražena u invazivnoj komponenti tumora u usporedbi s podležećim normalnim tkivom dojke te se koristi kao mjerilo dezmplastičnog odgovora u invazivnim karcinomima dojke (131).

1.7.1. Ekstracelularni matriks i matične stanice karcinoma dojke

Jedan od bitnih čimbenika koji utječe na sudbinu matičnih stanica karcinoma dojke je i njihov okoliš, odnosno niša u koju se smještaju (132). Okoliš (niša) matičnih stanica po definiciji je onaj koji ih okružuje, održava matičnima i sprječava njihovu diferencijaciju. Njega osim samih matičnih stanica čine i okolne stanice sa svim signalima koje luče te karakteristični ekstracelularni matriks. U odrasloj su dojci matične somatske stanice smještene u fiziološki mikrookoliš sastavljen od fibroblasta te mioepitelnih stanica. Matične somatske stanice vezane su za njih preko adhezijskih molekula. U fiziološkim uvjetima mikrookološ održava u ravnoteži

proliferaciju i apoptozu matičnih somatskih stanica tako da populacija matičnih stanica zadržava uvijek istu veličinu. Stanice ekstracelularnog matriksa „dirigiraju“ diobu somatskih matičnih stanica nizom parakrinih faktora. Tako se somatske matične stanice u fiziološkim uvjetima dijele asimetrično, jedna matična stanica ostaje u niši, a progenitorska stanica izlazi iz niše te započinje proces diferencijacije. Promjene koje pogađaju stromalne stanice kao lokalne modifikacije tkivne homeostaze uzrokovane npr. kroničnom upalom, pogoduju nastanku epitelnih tumora. Nedavni radovi dokazali su da takve promjene transformiraju fibroblaste u pluripotentne matične mezenhimalne stanice. Takav bi mikrokoliš zbog poremećenih signalnih puteva mogao potaknuti nekontroliranu proliferaciju i ekspanziju promijenjenih matičnih stanica tkiva dojke (133-136). Slično tome, hipotetski metastatska matična stanica karcinoma dojke mogla bi na udaljenom mjestu ostati „utišana“, u stanju mirovanja sve do aktivacije od strane promijenjenih signalnih puteva iz mikrokoliša (137)

Vrlo je malo radova o anatomski i fiziološki specijaliziranom mikrokolišu koji čini nišu matičnih stanica. Najvjerojatnija lokalizacija niše u mliječnoj žlijezdi su duktusi u kojima je *in situ* analizama identificirana sitna regija mirnih stanica koje su se imunofenotipski obojale na klasične markere matičnih stanica (138). Jedan od predloženih modela niše je onaj u kojem postoje tri vrste stanica: ER pozitivne senzorne stanice, EGFR pozitivne stromalne stanice i ER negativne zametne stanice. Za pretpostaviti je da su one u stanju mirovanja do aktivacije estrogenom. Kao odgovor, ER pozitivne senzorne stanice sintetiziraju i luče amfiregulin koji aktivira EGFR pozitivne stromalne stanice koje zatim aktiviraju ER negativne matične stanice (139). Utjecaj ekstracelularnog matriksa na matične stanice je najbolje proučen kod stanica hematopoeze u koštanoj srži. Vidjelo se da kolageni (I, III, IV-VI) omogućavaju prijanjanje hematopoetskih stanica te kultura stanica leukemije MO7 (140,141). Naročito se čvrsto vežu za kolagen I pa se taj protein smatra važnim za zadržavanje matičnih i progenitorskih stanica u koštanoj srži dok se zrelije stanice slabije vežu. Hematopoetske prekursorske stanice ispoljavaju molekule kao CD44 (142) za koje je poznato da prepoznaju kolagen I (143,144). Nedavno je objavljen rad o utjecaju kolagena I na matične stanice kolorektalnog karcinoma (145) u kojem su matične stanice kultivirane na podlogu kolagena I. Rezultati su pokazali da su matične stanice pokazale epitelno-mezenhimalnu tranziciju te manje prijanjale za podlogu. Tip I kolagena je smanjio izraženost E-cadherina i beta-catenina na međustaničnim spojevima te je inhibirao diferencijaciju stanica potičući ekspresiju markera matičnih stanica CD133 i Bmi1.

1.8. OKSIDACIJSKI STRES

Evolucija živih organizama od anaerobnih prema aerobnima nastaje pojavom kisika u atmosferi. To je prekretnica u evoluciji jer se aerobnim mehanizmima generira znatno više energije od anaerobnih, ali istovremeno povlači za sobom opasnost od toksičnosti kisika, tj pojavu oksidacijskog stresa (146).

Oksidacijski je stres pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama prema oksidaciji (147,148) Izazivaju ga povećano stvaranje slobodnih radikala ili smanjena antioksidacijska zaštita (149). I oksidacija i antioksidacijska zaštita su bitne za normalan metabolizam, provođenje signala i regulaciju stanične funkcije. Stoga, svaka stanica u ljudskom organizmu je u stanju homeostaze između oksidacije i antioksidacije.

1.8.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su nestabilne čestice kratkog života (oko 10^{-4} s) koje u vanjskom omotaču imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Nespareni elektron ih čini vrlo reaktivnima te lako ulaze u oksido-redukcijske reakcije sa staničnim makromolekulama. Radikali uzrokuju oštećenja okolnih makromolekula: DNK, proteina, lipida, pri čemu dolazi do mutacija, inaktivacije funkcije enzima/proteina i lipidne peroksidacije. U biološkim sustavima najčešći su kisikovi slobodni radikali (ROS od engl. reactive oxygen species), u koje spadaju superoksidni ($\bullet\text{O}_2^-$) i hidroksilni ($\bullet\text{OH}$) radikal te neradikalni derivati kisika, vodikov peroksid (H_2O_2), singletni kisik ($^1\text{O}_2$), hipoklorna kiselina (HOCL) te ozon (O_3).

1.8.2. Utjecaj slobodnih radikala

Pluća su organ u kojem se događa prvi kontakt s atmosferskim kisikom, koji se tu apsorbira i prenosi do stanica organizma, pri čemu se 1-3% kisika pretvara u ROS. U stanici su mitohondriji načešći stanični izvor ROS-a i to kao rezultat "curenja" elektronskog transportnog lanca, ključnog za proizvodnju energije unutar stanice, smještenog u mitohondrijskoj membrani.

Učinak slobodnih kisikovih radikala ovisi, osim o njihovoj koncentraciji, i o vrsti stanica na koje djeluju. Djelovanjem na terminalno diferencirane ili mirne stanice (kao što su stanice bubrega, mozga i srca) ROS oštećuju normalne stanične funkcije i na taj način mogu dovesti do nastanka degenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova, Parkinsonova, Huntingtonova bolest ili kardiovaskularne bolesti (150,151) ili do nastanka karcinoma kroz oštećenja DNK ili mutacije. Smrt normalnih stanica u tkivu i organu također mogu dovesti do nastanka karcinoma kroz kompenzatornu regeneraciju te posljedičnu proliferaciju stanica (152). Postoji nekoliko modela karcinogeneze koje se temelje na posljedici oksidacije, a koja uključuju sporo dijeleće stanice. Naime, stanice kao što su bubreg i jetra dijele se samo kada je to potrebno, a inače miruju (152). Proliferacijski stimulans ovih stanica prate parametri smanjene antioksidacijske zaštite i povećanog oksidacijskog stresa, pri čemu može doći do maligne transformacije.

U mitotski aktivnim tkivima (sastavljenim od stanica koje sadržavaju genetski program koji podržava proliferaciju) i u visoko proliferativnim tkivima (nediferencirane, prekancerzne, kancerzne ili transformirane stanice) niske razine ROS-a mogu biti dodatni stimulus za proliferaciju. S druge strane, visoke koncentracije ROS-a u tim tkivima mogle bi inducirati apoptozu, i na taj način potencijalno spriječiti daljnu diobu i karcinogenezu. Pokazalo se da su nediferencirane stanice osjetljivije na citotoksičnost uzrokovanu ROS-om od diferenciranih, zrelih stanica (153).

1.8.3. Masne kiseline bioloških membrana

Masne kiseline čine oko 30-80% masenog udjela bioloških membrana, dok preostali dio čine proteini (20-60%) i ugljikohidrati (0-10%). U sastavu lipida membrana nalaze se zasićene i nezasićene masne kiseline. Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA, engl. Poly Unsaturated Fatty Acids) podložne su lipidnoj peroksidaciji zbog prisutnosti dvostrukih veza između ugljika (154,155). Nisu svi ROS jednako reaktivni, pa tako lipidnu peroksidaciju mogu inicirati samo hidroksilni radikal ($\bullet\text{OH}$), alkoksilni radikal ($\text{RO}\bullet$) i peroksilni radikal ($\text{ROO}\bullet$) (156). Peroksidacijom masnih kiselina nastaju reaktivni aldehidi kao npr. 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), malonilaldehid (MDA), akrolein i drugi srodni α,β -nezasićeni aldehidi (157). Zbog relativno dugog života, pojedini aldehidi opasniji su za stanicu od samih slobodnih radikala, zato što su

dovoljno reaktivni da oštete stanicu, izazovu lančanu reakciju progresije oksidativnog stresa, čime mogu izazvati i smrt stanice. Dok slobodni radikali djeluju na mjestu svog nastanka, aldehidi difundiraju te imaju puno šire područje djelovanja. Jedan od glavnih produkata lipidne peroksidacije je HNE koji je ujedno i jedini reaktivni aldehyd koji se nalazi u mjerljivim količinama i u fiziološkim uvjetima. HNE se veže i za proteine s kojima tvori stabilne i biološki aktivne konjugate (158-160). Postoje neke studije koje govore o utjecaju HNE-a na kolagen I. Primjećeno je da u kroničnom alkoholnom pankreatitisu (CAP) u kojem su povećane koncentracije HNE-a u acinarnim stanicama, dolazi do pojačane sinteze prokolagena I u okolnom vezivnom tkivu, mjenom in situ ekspresijom mRNK. Kontrolno tkivo normalnog pankreasa nije imalo izražen HNE. Njihovi rezultati indiciraju da se u CAP-u dešava značajna lipidna peroksidacija koja uzrokuje sintezu kolagena I koji je odgovoran za nastanak fibroze u ovoj bolesti (161). Rađena su i istraživanja na eksperimentalnim životinjama, na aktiviranim pankreatičnim stelatnim stanicama. Te su stanice bile tretirane ne-citotoksičnim koncentracijama HNE-a (do 5 μ mol/L). Rezultati su pokazali da HNE potiče produkciju kolagena I preko aktivacije p38MAP kinaze i c-Jun-N-terminalne kinaze (162). Istraživanja na jetrenim stelatnim stanicama su također pokazala da HNE stimulira ekspresiju gena za prokolagen tipa I te njegovu sintezu u stelatnim stanicama jetre što ima ključnu ulogu u nastanku fibroze jetre (163).

1.8.4. Funkcije 4-hidroksinonenala (HNE)

U početku su HNE nazivali „sekundarnim toksičnim glasnikom slobodnih radikala“ (158,160) s obzirom da se HNE nalazi u mnogim patološkim stanjima, npr. tumorima te se dovodi u korelaciju sa stadijem bolesti (164,152). Dokazan je i u mnogim drugim bolestima, neurodegenerativnim bolestima (165-167), dijabetesu (168), autoimunim bolestima (169) te u starenju (170).

Danas se HNE sve češće naziva biomarkerom (171) zbog njegove uloge u biološkom sustavu. Utjecaj HNE-a na stanice može biti dvojak, može uzrokovati njeno preživljenje ili smrt. HNE se veže i inhibira brojne enzime, npr. glukoza-6-fosfat dehidrogenazu, gliceraldehyd-3-fosfat dehidrogenazu, glutathion-S-transferazu i druge (172-174). Uz inhibiciju enzima, HNE može izazvati apoptozu preko aktivacije kaskade kaspaza neovisnih o FasL što je uzrokovano

otpuštanjem mitohondrijskog citokroma c (175,176). HNE-proteinski konjugati mogu narušiti aktivnost proteasoma koji sudjeluju u degradaciji oštećenih proteina. Smanjenjem njihove aktivnosti dolazi do nakupljanja HNE-om modificiranih proteina te posljedično do stanične smrti (177). HNE reagira i s NFkB što dovodi do smanjivanja imunološkog odgovora (178,179).

Osim citotoksičnih učinaka na stanicu, u nižim koncentracijama HNE može pokrenuti i obrambene mehanizme. Aktivira gene odgovora na stres povećavajući fosforilaciju tirozina, čime se aktiviraju c-Jun terminalne kinaze i p38 (180,181). Njihov su cilj transkripcijski faktori, među kojima i c-Jun što opet dovodi do aktivacije AP-1 transkripcijskog faktora (175,181). HNE aktivira i druge proteine u putevima prijenosa signala; receptore EGF (eng. Epithelial Growth Factor) i PDGF (eng. Platelet-Derived Growth Factor), protein kinazu C, fosfolipazu C i fosfolipazu D (182-186). Djelovanjem na signalne puteve i transkripcijske faktore, HNE potiče svoju detoksifikaciju te stimulira stanični rast. Jako je bitna na utjecaj i sudbinu stanice koncentracija HNE-a, niže koncentracije HNE-a potiču proliferaciju stanica, više koncentracije induciraju diferencijaciju a još više koncentracije apoptozu (43).

Postoji mala grupa enzima koja ima funkciju detoksifikacije i odstranjenja HNE-a iz stanica. Unutar te grupe su glutathion-S-transferaza, aldoza reduktaza i aldehyd dehidrogenaza. Učinkovite su u kontroli unutarstaničnih koncentracija HNE-a do kritične razine kada je stanica preplavljena HNE-om i smrt je neizbježna. Glutathion-S-transferaza katalizira konjugaciju HNE-a na glutathion stvarajući molekulu topljivu u vodi, GS-HNE, koja je potentni inhibitor aktivnosti glutathion-S-transferaze. Ta se molekula transportira iz stanice pomoću RLIP76 (Ral-vežućeg proteina), membranskog proteina koji pokazuje visok afinitet za transport GS-HNE iz citoplazme u izvanstanični prostor. Oko 80% GS-HNE-a se na taj način izbacuje iz stanice a 20-ak % pomoću MRP1 (Multidrug Resistance Protein 1) (187).

1.8.5. Antioksidacijski mehanizmi zaštite

U stanicama se i u fiziološkim uvjetima stvaraju reaktivne kisikove tvari u reakcijama enzima, „curenjem elektrona dišnog lanca“. Stanice su kroz evoluciju stvorile obrambene mehanizme kako bi se zaštitile od prekomjernog stvaranja slobodnih radikala.

Postoje dvije vrste antioksidacijskih obrambenih mehanizama protiv lipidnih peroksida nastalih djelovanjem reaktivnih kisikovih spojeva. Prva linija obrane su tvari niske molekularne mase koje djeluju nespecifično.

Lipofilne male molekule štite staničnu membranu te se često zovu CBAs (engl. chain –breaking antioxidants). One mogu prekinuti autokatalitičku lančanu reakciju lipidne peroksidacije a svrstavaju se u neenzimatski sustav za obranu od oksidacijskog stresa. Glavni stanični CBA-i su α -tocopherol, askorbinska kiselina, glutathion (GSH), urična kiselina. GSH je osobito važan jer ujedno služi i kao substrat za dva najbitnija antioksidacijska enzimska sustava: glutathion-peroxidazu (GPX) i glutathion-S-transferazu (GST)(188).

Enzimatski sustav čine antioksidacijski enzimi koji kaskadnim reakcijama detoksificiraju ROS i time sprječavaju štetu na staničnim elementima kao i inicijaciju lipidne peroksidacije. Ti enzimi su superoksidna dismutaza i katalaza, koja razgrađuje vodikov peroksid do vode i kisika. Opisani elementi obrane uključuju prevenciju, eksciziju i popravak oštećenja nastalih ROS-om. Oni su uključeni u eliminaciju lipidnih peroksida u svrhu prekidanja autokatalitičke lančane reakcije lipidne peroksidacije te očuvanja integriteta stanične membrane.

GPX i GST koji kataliziraju GSH-ovisnu redukciju lipidnih peroksida uz pomoć svoje peroksidazne aktivnosti su osnova sekundarne obrane (188)

Važnost enzimatskog antioksidacijskog sustava očituje se u grupi enzima koja ima funkciju detoksifikacije i odstranjenja HNE-a iz stanica. Unutar te grupe su glutathion-S-transferaza, aldoza reduktaza i aldehyd dehidrogenaza. Učinkovite su u kontroli unutarstaničnih koncentracija HNE-a do kritične razine kada je stanica preplavljena HNE-om i smrt je neizbježna. Glutathion-S-transferaza katalizira konjugaciju HNE-a na glutathion stvarajući molekulu topljivu u vodi, GS-HNE, koja je potentni inhibitor aktivnosti glutathion-S-transferaze. Ta se molekula transportira iz stanice pomoću RLIP76 (Ral-vežućeg proteina), membranskog proteina koji pokazuje visok afinitet za transport GS-HNE iz citoplazme u izvanstanični prostor. Oko 80% GS-HNE-a se na taj način izbacuje iz stanice a 20-ak % pomoću MRP1 (Multidrug Resistance Protein 1) (187)

1.8.6. Oksidacijski stres, lipidna peroksidacija, HNE i karcinom dojke

U nekim je radovima pokazana poveznica između hormonskih receptora i lipidne peroksidacije. Estrogeni inhibiraju lipidnu peroksidaciju što je povezano s povećanom diobom stanica i obrnuto, povećana lipidna peroksidacija povezana je sa smanjenom diobom stanica (189,190). Eksperimentalni podaci upućuju da bi karcinogeni efekt estrogena mogao biti povezan s njegovim proliferativnim i antiapoptotičnim učinkom na stanicu kao posljedica njegove antioksidacijske aktivnosti. Brojne kliničke studije pokazale su da pacijenti tretirani širokom paletom kemoterapeutika pokazuju povećanje produkata lipidne peroksidacije (191-195).

Novija istraživanja na matičnim stanicama CD34+/CD38- akutne mijeloične leukemije (196), pokazala su da 24 sata nakon izlaganja tumorskih stanica HNE-u svega trećina stanica je bilo viabilno u usporedbi sa 93,6% netretiranih tumorskih stanica. Također je došlo do dramatičnih promjena u AML progenitorskoj populaciji stanica u CFU (eng. colony forming unit) eseju. Nakon tretiranja HNE-om tumorske progenitorske stanice uopće nisu formirale kolonije dok je kapacitet za formiranje kolonija u eseju normalnih hematopoetskih progenitora bio nepromijenjen.

Nije do kraja razjašnjen mehanizam na koji HNE djeluje na matične tumorske stanice. On, kao stabilni konačni produkt lipidne peroksidacije te potentna alkilirajuća tvar može reagirati sa brojnim nukleofilnim veznim mjestima na DNK i proteinima (160).

Brojne su studije pokazale da HNE aktivira SAPK/JNK iz obitelji MAPK koji je uljučen u apoptozu (163,175). HNE također modulira ekspresiju brojnih gena uključujući PKC β II, c-myc, prokolagen tipa I, c-myb... (197). Iako brojne studije pokazuju proapoptotičko djelovanje HNE-a, on potiče i proliferaciju stanica pri niskim koncentracijama. Brojne studije pokazuju da utjecaj HNE-a na proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu ovisi o intracelularnoj koncentraciji. Yang et al (198) je u svojoj studiji pokazao da matične stanice s niskim koncentracijama HNE-a rastu 50% brže od stanica bez HNE-a. Dodavanjem većih koncentracija (20 μ M HNE-a) mediju stanica rezultiralo je njihovom diferencijacijom. Kontrolne stanice sa nižim HNE-om se nisu diferencirale. Koncentracije HNE-a >20 μ M HNE-a su uzrokovale apoptozu stanica.

Diehn et al (199) su pokazali da humane i mišje matične stanice karcinoma dojke, kao i matične stanice normalnog tkiva dojke zadržavaju niske razine ROS-a koje ih štite od utjecaja zračenja, što objašnjava rekurenciju tumora nakon terapije. Isti je autor pokazao da populacija matičnih

stanica tkiva dojke ima niže ROS-ove od progenitorskih stanica što štiti te stanice da uđu u diferencijaciju. Koristeći analizu gena pomoću microarraya u matičnim stanicama karcinoma dojke (CD44+, CD24-/nizak, ESA+) te u nematičnim stanicama karcinoma dojke CD24+ pokazao je da su geni odgovorni za metabolizam ROS-a (glutathion peroxidaza, superoxid dismutaza, katalaza) povišeni u matičnim stanicama karcinoma. Povišena razina antioksidacijskih gena korelira s niskim koncentracijama ROS-a u matičnim stanicama karcinoma dojke u usporedbi s nematičnim stanicama karcinoma dojke.

Isti je autor proučavao učinak zračenja na matične stanice karcinoma dojke. Proučavana je populacija akumulirala manje pucanja jednostrukih i dvostrukih veza DNK *in vitro* i *in vivo* nakon zračenja. To korelira sa pretpostavkom da ROS modulira radiorezistentnost u populaciji matičnih stanica karcinoma dojke. Za zaštitu od zračenja su odgovorni geni uključeni u sintezu glutathiona a to su glutamat, cistein, ligaze, glutathion sintetaza i FOX1. Deplecijom glutathiona pomoću buthionin sulphoximina dolazi do smanjenja sposobnosti stvaranja kolonija i povećane radiosenzitivnosti. S obzirom na ove podatke vidljivo je da je sposobnost samoobnavljanja matičnih stanica karcinoma u različitim tkivima ovisna o količini ROS-a. Ta „labilnost“ matičnih stanica karcinoma je njihova „Ahilova peta“ za eventualnu terapiju. Postoje podaci koji ukazuju da tretiranje humane AML, matičnih i progenitorskih stanica sa parthenolidom, molekulom koja inducira ROS dovodi do masivne apoptoze tih stanica (200).

U jednom od radova Diehn (199) je zračio matične stanice karcinoma dojke dozama od 200-400 cGy što je dovelo do povećanja količine matičnih stanica karcinoma dojke. Kod doze od 600 cGy, količina matičnih stanica karcinoma dojke počinje se smanjivati, ali je još uvijek veća od kontrole (bez zračenja). Kod zračenja od 1000 cGy bilo je manje oštećenja DNK u usporedbi s kontrolom te smanjena količina ROS-a u matičnim stanicama karcinoma dojke u usporedbi sa ostalim nematičnim stanicama. Povišena je bila i koncentracija GSH što upućuje na efektivni DNK mehanizam popravka kroz povišenu antioksidacijsku zaštitu.

2. HIPOTEZA

S obzirom da je dojka sastavljena prvenstveno od masnog tkiva, a uz to, svi *in vivo* eksperimenti temelje se na transplantaciji matičnih stanica karcinoma dojke u masne jastučice u eksperimentalnih životinja, za pretpostaviti je da lipidna peroksidacija ima ulogu u proliferaciji i diferencijaciji matičnih stanica karcinoma dojke.

Metabolizam lipidne peroksidacije različit je među subtipovima karcinoma dojke, a kombinirana kemoterapija i imunoterapija, specifične za indukciju i akumulaciju HNE-a u tumorskim stanicama, mogle bi biti efikasne u inhibiciji matičnih stanica karcinoma dojke. Dosadašnja istraživanja pokazala su kako kod trostruko negativnih (ER-, PR-, HER2-) matičnih stanica karcinoma dojke diferencijacijom dolazi do ekspresije pojedinih hormona. Od interesa je dati odgovor kako oksidacija ekstracelularnog matriksa utječe na diferencijaciju i malignost matičnih stanica karcinoma dojke.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Sukladno postavljenim hipotezama postavljeni su sljedeći ciljevi:

1. Utvrditi značajke rasta matičnih stanica karcinoma dojke u odnosu na:
 - prisutnost HNE-a u podlozi za rast
 - izloženost oksidacijskom stresu
2. Utvrditi razinu lipidne peroksidacije u odnosu na vrstu podloge, staničnu diferenciranost i izloženost oksidacijskom stresu.
3. Utvrditi razinu ekspresije hormonskih receptora ER, PR, transmembranskog receptora HER2 i nuklearnog p53 na matičnim stanicama karcinoma dojke u odnosu na vrstu podloge i izloženost oksidacijskom stresu.
4. Utvrditi utjecaj doksorubicina na matične stanice karcinoma dojke i količinu inducirano intracelularnog HNE-a u ovisnosti o podlozi.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. KULTURE STANICA

Stanična linija matičnih stanica karcinoma dojke, SUM159, dobivena je od Asteranda (Detroit, MI, USA) i uzgajana u skladu s preporukama proizvođača. Radi se o komercijalno dostupnim stanicama ljudskog porijekla iz SUM serije stanica primarnog karcinoma dojke. Stanična linija je hiperploidna s modalnim kromosomskim brojem, od 47 i 9 strukturalnih translokacija, jednom recipročnom translokacijom t(x;9) i jednom mogućom recipročnom translokacijom t(7;17). Ova kultura stanica može rasti pod stimulirajućim uvjetima u obliku mamosfera, pri čemu ispoljava površinske receptore CD44+/CD24-/ESA+(201), što je specifično za matične stanice karcinoma. Stanice su uzgajane u stimulirajućim uvjetima za nastanak i rast mamosfera: MEBM medij (Lonza Basel, Switzerland) uz dodatak 10ng/ml bazičnog faktora rasta fibroblasta (bFGF, Peprotech, New York, USA), 5 µg/ml inzulina (Peprotech, New York, USA) i 20 µl/ml B27 dodatka (Invitrogen) u inkubatoru na 37°C u atmosferi s 5% CO₂.

4.1.1. Određivanje broja živih/vijabilnih stanica

Nakon što smo izvadili određeni volumen suspenzije stanica iz boce u kojoj su se stanice uzgajale i promiješali, od suspenzije stanica uzeli smo 20 µl te pomiješali sa 180 µl tripanskog modrila (Kemika, Hrvatska) u rupici na pločici (microwell plate). Ovako priređeno razrjeđenje stanica nanijeli smo na prethodno pripremljenu Bürker-Türkovu komoricu. Stanice smo brojali u polju za brojanje leukocita (broje se sva 64 kvadratića). Brojali smo stanice koje su svjetlo-žute, dok su plave stanice mrtve (boja ulazi pasivno u sve stanice, ali se uklanja aktivnim transportom samo iz živih stanica). Pravi broj stanica (L) računa se po formuli:

$$L = N \times 250 \times 10 \times 1000,$$

gdje je N srednji broj stanica (dobiven dijeljenjem ukupnog broja vijabilnih stanica s ukupnim brojem kvadratića na pločici – 64), 250 je konstanta komorice, 10 razrjeđenje stanica u boji, a

dobivena vrijednost množi se s 1000 da se ukupni broj stanica preračuna na broj stanica po mililitru.

4.2. PRIPREMA AKTIVNOG HNE-a

4-hidroksinonenal, HNE, čuva se u organskom otapalu, u inaktivnom stanju kao 4-hidroksi-2-nonenal-1-dietilacetal (HNE-DEA, Alexis biochemicals, Austrija), kojeg je potrebno ukloniti prije početka eksperimenta, a sam HNE je potrebno aktivirati. Organsko otapalo je upareno u struji dušika kako bi se dobio čisti HNE-DEA. Nakon uklanjanja organskog otapala, HNE se aktivirao otapanjem u 1 mM kloridnoj kiselini. Kako bi se dobila točna koncentracija HNE-a, odredio se spektar HNE-a od 200 do 350 nm, te se uzeo maksimum apsorbancije na 223 nm. Koncentracija se računala po sljedećoj formuli:

$$c = (A_{223} * r) / 13750 * \text{mol/l}$$

gdje je A_{223} maksimum absorpcije na 223 nm, r razrjeđenje u destiliranoj vodi, 13750 molarni ekstinkcijski koeficijent u vodi.

U pokusima se HNE koristio u različitim koncentracijama koje su dobivene razrjeđenjem otopine HNE-a u odgovarajućem mediju.

4.3. PRIPREMA PODLOGA ZA RAST STANICA

Kolagen tip I je odabran kao tipični i najzastupljeniji protein ekstracelularnog matriksa. Kako bi se pratio rast stanica na kolagenu, kao kontrola rastu na kolagenu, stanice su uzgajane i na polistirenskoj podlozi. U eksperimentima s oksidiranim kolagenom korišten je kolagen izoliran iz sirove teleće kože, dok je u ostalim eksperimentima korišten kolagen tipa I proizvođača Sigma.

4.3.1. Oksidirani kolagen

4.3.1.1. Preliminarna obrada sirovog materijala

Sirova teleća koža podvrgnuta je opsežnom ispiranju s vodom iz slavine i deterdžentima na sobnoj temperaturi, kako bi se uklonile sve nečistoće. Nekolageni proteini uklonili su se ispiranjem s 0,15M natrijevog klorida. Koža je štavljena mehanički, a potkožno masno tkivo uklonjeno. Potom je ostatno masno tkivo eliminirano pomoću ohlađenog acetona.

4.3.1.2. Ekstrakcija i purifikacija kolagena

Prethodno pripremljena i obrađena koža nasječena je na komadiće i namočena u 50mM octene kiseline, te ostavljena na hladnome tijekom 24 sata. Nakon homogenizacije, razrijeđenja i centrifugiranja, kolagen je izoliran neutralizacijom te procesom isoljavanja po Miller i Rhodes-u (1982). Talog kolagena je otopljen u octenoj kiselini, osušen zamrzavanjem te pohranjen na temperaturi od 4°C u koncentraciji od 10 mg/ml. Dobiveni je materijal korišten kao nativni kolagen. Ovakva izolacija i pročišćavanje kolagena je prikladna za standardiziranu oksidativnu obradu kako je opisano u slijedećem tekstu (Ciz et al. 2009).

4.3.1.3. Oksidativna obrada s hidroksilnim radikalom (OH•)

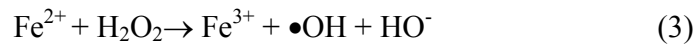
Modifikacija je provedena uz pH 4,0 (u 50mM octenoj kiselini). Hidroksilni radikal proizveden je prema Fentonovoj reakciji (Imlay *et al.*, 1988.) koristeći sistem FeSO₄/H₂O₂ u efektivnim koncentracijama od 100 µM : 2 mM.

Slijedeći mehanizam nastanka slobodnih radikala u stanici uključuje autooksidacijske reakcije ovisne o prisutnosti katalitičkih prijelaznih metala, na primjer željeza (**Error! Bookmark not**

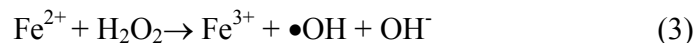
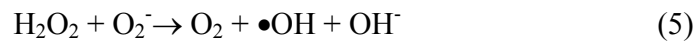
defined.) Slobodno željezo ili ono u kelatima sudjeluje u stvaranju slobodnih radikala na više razina. Autooksidacija Fe^{2+} rezultira nastankom superoksidnog radikala (reakcija 2).



Obrnuta reakcija redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+} s O_2^- također se događa, ali je izrazito ovisna o koncentraciji kelata i drugih reaktanata. Fe^{2+} oksidira se u prisutnosti H_2O_2 (Fentonov reagens) pri čemu nastaju ferilni ion ($\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$) i hidroksilni radikal ($\bullet\text{OH}$) (reakcije 3 i 4).



Ferilni i hidroksilni radikali vrlo su jaki oksidansi i reagiraju s velikim brojem različitih bioloških supstrata. Željezni ioni mogu sudjelovati i u Haber Weiss reakciji u kojoj također nastaju hidroksilni radikali (reakcije 5, 6 i 3).



Cjelokupna obrada na sobnoj temperaturi trajala je 18 sati. Uzorak oksidiranog kolagena podvrgnut je pročišćivanju dijalizom s razrijeđenom octenom kiselinom i centrifugiranjem, te je osušen zamrzavanjem i konačno pohranjen za danju upotrebu na temperaturi od 4°C . Ovako dobiveni uzorak nazvan je oksidirani kolagen i kao takav je korišten u daljnjim eksperimentima.

4.3.1.4. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Diferencijalna pretražna kalorimetrija je termoanalitička tehnika koja mjeri razliku u količini topline potrebnu da se povisi temperatura mjerene tvari te referentnog primjera. Referentni primjer mora imati dobro definiran kapacitet topline izvan granica mjerenih temperatura. Tehniku su razvili Watson i O'Neill 1962.

Učinjena je toplinska denaturacija nativnog i oksidiranog kolagena, a kalorimetrijski su izračuni provedeni uz pomoć VP-DSC MicroCalorimeter (MicroCal, Inc., USA) u volumenu od 0,51 ml. Spektar promjena snimljen je u temperaturnom rasponu od 10°C do 50°C sa brzinom zagrijavanja od $0,5^\circ\text{C}$ po minuti. Koncentracije su proteina mjerene prema Bradfordovoj metodi

(Bradford, 1976.) i prilagođene na 1 mg/m u 10 mM HCl. Prije mjerenja iz svih su otopina uklonjeni otopljeni plinovi. Referentna vrijednost po kojoj se vrijednost otapala poravnava na 0 dobivena je snimanjem spektra pufera/otapala te je oduzeta od vrijednosti mjerenih uzoraka. Dobiveni su rezultati analizirani pomoću Origin software (Microcal Software, Inc., USA).

4.3.1.5. Cirkularni dikroizam (CD)

Radi se o spektroskopskoj metodi koja snima spektar cirkularnog dikroizma kombinacijom horizontalno i vertikalno polariziranog svjetla u fazi i jednakih amplituda pri čemu se dobije linearno polarizirano svjetlo na 45 stupnja. Ako ove dvije zrake nisu u fazi rezultat će biti cirkularno polarizirano svjetlo. Ova metoda služi ispitivanju strukture proteina, stabilnosti njihove konformacije te usporedbi sa strukturama drugih molekula.

CD spektar je proveden na uzorcima nativnog kolagena od 0,38 mg/mL, oksidirano kolagena (OH•) od 0,40 mg/mL otopljenih u 50mM octene kiseline. Spektar je snimljen u rasponu valnih duljina od 200-300 nm pri sobnoj temperaturi u 0,5 mm kvarcnim kivetama na Jobin Yvone CD 6. Vrijednosti spektra čistih uzoraka (bez otapala) dobivene su oduzimanjem od spektra otapala, tj. octene kiseline.

4.3.2. 4-hidroksinonenal vezan na kolagen

Kako bi se na kolagen vezao HNE, kolagen je otopljen u 50 mM octenoj kiselini do konačne koncentracije od 2 mg/ml. Na otopljeni kolagen dodan je raspon koncentracija HNE-a (od 0 do 100µM) te je ostavljen 1h kako bi se HNE vezao na kolagen. Ovako pripremljen kolagen koristio se za oblaganje podloge za rast stanica.

4.3.3. Priprema podloge za rast stanica

Kako bi se podloge za rast stanica promijenile, jažice su presvučene kolagenom, oksidiranim kolagenom i kolagenom modificiranim HNE-om na sljedeći način: kolagen se otopio u deioniziranoj vodi do konačne koncentracije od $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Nakon potpunog otapanja $50 \mu\text{L}$ kolagena dodalo se u svaku jažicu. Ovako pripremljene jažice s kolagenom ostavljene su preko noći u sterilnoj atmosferi kako bi voda isparila, a jažice ostale prekrivene kolagenom. Konačno, podloge su dodatno sterilizirane pod UV svjetlom u trajanju od 20 minuta.

4.4. ODREĐIVANJE HNE-HISTIDINSKIH KONJUGATA NA KOLAGENU

Kako bi se pratilo vezivanje HNE-a na kolagen i na oksidirani kolagen načinjena je kapljična analiza HNE-proteinskih konjugata. Radi se o metodi za detekciju, analizu i identifikaciju proteina sličnu Western blotu, ali za razliku od Western blota, gdje se proteini razdvajaju po veličini, u ovoj se metodi direktno nanose na membranu. Prijenos na membranu ubrzan je vakuumom, a daljnja identifikacija identična je Western blotu.

Kolagen otopljen u 50 mM octenoj kiselini tretirali smo s 0,1,5,10,25,50,75,100 μM HNE-a u trajanju od 1 sata. Nakon tretiranja s HNE-om uzorci su nakapani na nitroceluloznu membranu (Amersham). Membrana je inkubirana sa blokirajućom otopinom (2% nemasno mlijeko u prahu PBS) na sobnoj temperaturi u trajanju 60 minuta te posljedično inkubirana preko noći s mišjim monoklonalnim protutijelom na HNE proteinske konjugate. Nadalje, membrana je inkubirana s 3% vodikovim peroksidom kako bi se blokirale endogene peroksidaze. Nakon blokiranja, membrana je isprana te je inkubirana s EnVision (DAKO, Denmark). Imuni kompleksi HNE-proteinskih konjugata i protutijela vizualizirani su korištenjem 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorida (DAKO, Denmark) bojenja te su skenirani zbog kvantificiranja signala.

Kao negativna kontrola korištena je otopina 1% BSA (Bovine serume albumine), koji je razrijeđen na $31 \mu\text{g}/\text{mL}$. Njemu su dodavane iste koncentracije HNE-a kao i kolagenu (0-100 μM).

4.5. UTJECAJ AKUTNOG STRESA NA VIJABILNOST STANICA

4.5.1. Oksidirani kolagen

Kako bi se pratio utjecaj kratkotrajnog – akutnog stresa na matične stanice karcinoma dojke stanice su nasadene na predhodno pripremljene podloge. Podloge su redom: polistiren, kolagen, kolagen oksidiran hidroksilnim radikalom. Dan nakon pripreme podloga stanice su bile nasadene u gustoći od 30 000 stanica u 400 μ l te su zatim ostavljene 3 h da se zalijepe. Nakon što su se stanice priljepile za podlogu učinjen je tretman s 35 μ M HNE-om. Nakon 24 sata na stanice je nakapana MTT boja. Boja je bezbojni derivat formazana koja oksidacijom u mitohondrijima prelazi u žuto obojani produkt. Intenzitet obojenja mjerio se na 450 nm, uz referentnu valnu duljinu od 620 nm. Konačni intenzitet se izračunava kao razlika apsorbancije na referentnoj i mjernoj valnoj duljini.

4.5.2. Kolagen s vezanim HNE-om

Kako bi se pratio utjecaj kratkotrajnog – akutnog stresa na matične stanice karcinoma dojke stanice su nasadene na predhodno pripremljene podloge. Podloge su kolagen i kolagen izložen tretmanu s 1,10 i 100 μ M koncentracijama HNE-a. Dan nakon pripreme podloga stanice su bile nasadene u gustoći 10000 stanica u 200 μ l. Stanice su zatim ostavljene 3 h da se zalijepe. Nakon što su se stanice priljepile izložene su tretmanu s 0,1,5,10,25,50,75,100 μ M HNE-om. Dan nakon tretmana na stanice je nakapana MTT boja. Boja je bezbojni derivat formazana koja oksidacijom u mitohondrijima prelazi u žuto obojani produkt. Intenzitet obojenja mjerio se na 450 nm, uz referentnu valnu duljinu od 620 nm. Konačni intenzitet se izračunavao kao razlika apsorbancije na referentnoj i mjernoj valnoj duljini

4.5.3. Utjecaj oksidacijskog stresa

Kako bi se pratio utjecaj kratkotrajnog – akutnog stresa na matične stanice karcinoma dojke, stanice su nasadene na predhodno pripremljene podloge. Podloge su kolagen i kolagen izložen tretmanu s 1, 10 i 100 μ M koncentracijama HNE-a. Dan nakon pripreme podloga stanice su bile nasadene u gustoći 10 000 stanica u 200 μ l. Stanice su zatim ostavljene 3 h da se zalijepe. Nakon što su se stanice priljepile izložene su tretmanu s 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 i 200 μ M vodikovim peroksidom. Dan nakon tretmana na stanice je nakapana MTT boja. Boja je bezbojni derivat formazana koja oksidacijom u mitohondrijima prelazi u žuto obojani produkt. Intenzitet obojenja mjerio se na 450 nm, uz referentnu valnu duljinu od 620 nm. Konačni intenzitet se izračunava kao razlika apsorbancije na referentnoj i mjernoj valnoj duljini.

4.6. UTJECAJ AKUTNOG STRESA NA PROLIFERACIJU STANICA

4.6.1. Utjecaj HNE-a

Kako bi se pratio utjecaj kratkotrajnog – akutnog stresa na matične stanice karcinoma dojke stanice su nasadene na predhodno pripremljene podloge. Podloge su PS, kolagen i kolagen izložen tretmanu s različitim koncentracijama HNE-a. Dan nakon pripreme podloga stanice su bile nasadene u gustoći 10000 stanica u 200 μ l, te su zatim ostavljene 3 h da se zalijepe. Nakon što su se stanice priljepile izložene su tretmanu s 0,1,5,10,25,50,75 i 100 μ M HNE-om. Dan nakon tretmana na stanice je nakapan 3 H-timidin. Test ugradnje 3 H-timidina služi za utvrđivanje proliferativne moći stanica, a temelji se na ugradnji radioaktivno obilježenog timidina u nascentnu DNK. Radioaktivni timidin (3 H-timidin) se ugrađuje samo u stanice u kojima se vrši replikacija DNK, dakle, u stanicama koje će se dijeliti.

4.7. UTJECAJ KRONIČNOG STRESA NA PROLIFERACIJU STANICA

Kako bi se pratio utjecaj dugotrajnog stresa, odabrane su podloge: polistiren, kolagen, kolagen modificiran HNE-om. S obzirom da su slobodni radikali kratkoživući, dok su reaktivni aldehidi dugoživući, te lako difundiraju i reverzibilno se vežu za proteine, iz danjih pokusa izuzet je kolagen oksidiran hidroksilnim radikalom. Nadalje, kako se test ugradnje timidina pokazao osjetljivijim u daljnjim ispitivanjima osjetljivosti stanica na stresore, koristio se isključivo ovaj test.

Nakon što su pripremljene podloge, drugi dan stanice su bile nasađene u gustoći 10 000 stanica u 200 μ l. Stanice su zatim ostavljene 3 h da se zalijepe. Nakon što su se stanice priljepile izložene su tretmanu s 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75 i 100 μ M HNE-om. Nakon prvog tretmana izlaganje HNE-u se nastavilo tako da su svaki drugi dan stanice izložene tretmanu sa svježe pripremljenim otopinama HNE-a u koncentracijama 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75 i 100 μ M. Nakon 10 dana na stanice je nakapan ^3H -timidin (1 μ Ci/jažici, Amersham, SAD) i ostavljen je 24 h kako bi se ugradio u novosintetiziranu DNK. Kako bi se očitao intenzitet ugradnje timidina stanice su lizirane na sakupljaču stanica (cell-harvester; Skatron, Norveška) tako da je radioaktivno obilježena DNK ostala na apsorpcijskom filteru papiru građenom od staklenih vlakana. Filteru papir je zatim stavljen u posudice sa scintilacijskom tekućinom, te je intenzitet ugradnje ^3H -timidina mjereno na scintilacijskom brojaču (Perkin Elmer, SAD).

4.8. UTJECAJ KRONIČNOG STRESA NA DIFERENCIJACIJU

Kako bi se pratio utjecaj dugotrajnog stresa, odabrane su podloge: polistiren, kolagen, kolagen modificiran HNE-om. S obzirom da je poznato kako reaktivni aldehidi, posebice HNE, utječu na diferencijaciju stanica, praćeni su parametri diferenciranosti tumora dojke kod dugotrajne izloženosti HNE-u na matične stanice karcinoma dojke, SUM159.

4.8.1. Imunocitokemijsko određivanje markera diferencijacije

Za ovaj eksperiment pripremljene su sljedeće podloge: polistiren, kolagen, kolagen izložen tretmanu s 1 μM HNE-om i kolagen izložen tretmanu s 10 μM HNE-om. Drugi dan na podloge su nasadene stanice u gustoći 30 000 stanica u 400 μl na stakalca s 8 bunarića. Stanice su zatim ostavljene 3 h da se zalijepe. Nakon što su se stanice priljepile izložene su tretmanu s 10 μM HNE-om ili čistim medijem kao kontrolom. Nakon prvog tretmana izlaganje HNE-u, odnosno mediju kao kontroli, nastavilo se na način da su svaki drugi dan stanice izložene tretmanu sa svježe pripremljenim otopinama HNE-a u koncentracijama 1 i 10 μM . Nakon 10 dana, stanice su fiksirane 20 minuta u ledenom metanolu.

4.8.1.1. Bojanje na p53

Nakon uzgoja stanica u kulturi kroz 10 dana te izlaganja HNE-u svaki drugi dan, u stanicama je imunocitokemijskim bojanjem dokazana količina p53 proteina. Protein p53 je tumor supresor gen. Funkcija ovog proteina je u kontroli staničnog ciklusa, pri čemu eliminira i inhibira proliferaciju abnormalnih stanica, te na taj način sprječava nastanak tumora. Gen p53 je najčešće mutiran u mnogim karcinomima čovjeka. Procijenjeno je da se mutacije ovog gena događaju u 50% svih karcinoma.

Nakon fiksacije stanice su isprane u PBS-u 3 puta po 5 minuta. Nakon ispiranja napravljeno je razotkrivanje antigena u citratnom puferu (pH 6,0; 10 mM citratna kiselina, 0.05% Tween 20), na temperaturi 95°C pod tlakom 2 minute. Nakon hlađenja, stanice su isprane PBS-om 3 puta po 5 minuta. Endogene peroksidaze blokirane su 3% H_2O_2 u PBS-u 20 minuta. Nakon ispiranja PBS-om 3 puta po 5 minuta stanice su inkubirane monoklonalnim protutijelom na p53 protein (anti-humano, klon DO-7, šifra M7001, DAKO) u razrjeđenju 1:50 1% BSA u PBS-u. Nakon ispiranja PBS-om 3 puta po 5 minuta dodano je sekundarno protutijelo EnVision (DAKO) te je inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja sekundarnog protutijela PBS-om 3 puta po 5 minuta, dodao se diaminobenzidin (DAB, DAKO) koji je kod vezanog protutijela tj. prisutnog antigena davao smeđe obojenje. Suvišak DAB-a ispirao se destiliranom vodom, te su

stanice dehidrirane u rastućem gradijentu alkohola (70%, 96%, 100%) kao i u ksilenu. Na kraju, na stanice su stavljeni Kanada balzam i pokrovnica.

Rezultati su prikazani semikvantitativno, određivanjem imunocitokemijskog indeksa bojenja uzimajući u obzir intenzitet reakcije te određujući postotak neprijeporno imunoreaktivnih stanica. Intenzitet reakcije (bojenja) svrstan je u dvije skupine: odsutnost reakcije i pozitivitet reakcije, dok je postotak imunoreaktivnih stanica određivan na 1000 pregledanih tumorskih stanica.

4.8.1.2. Bojanje na estrogenski i progesteronski receptor

Nakon uzgoja stanica u kulturi kroz 10 dana te izlaganja HNE-u svaki drugi dan, u stanicama je imunocitokemijskim bojanjem dokazana količina hormonskih receptora: estrogenog i progesteronskog. U dijagnostici karcinoma dojke bitno je odrediti faktore koji određuju stadij (staging) bolesti, što pomaže u procjeni rizika nastanka recidiva i pruža informaciju koja predviđa odgovor na terapiju. Prema preporukama Američkog udruženja patologa i NCCN- a (National Comprehensive Cancer Network) preporuča se da su tumori ER i PR pozitivni ako je najmanje 1% stanica pozitivno na spomenute receptore, a preporuča se odrediti broj pozitivnih tumorskih stanica na određeni receptor te utvrditi intenzitet bojenja (202). Protutijela koja su korištena obilježavaju ER i PR receptore u jezgri stanica. Kao pozitivna kontrola korištena je kultura stanica karcinoma dojke MCF-7 (203).

Nakon fiksacije stanice su isprane u PBS-u 3 puta po 5 minuta. Nakon ispiranja napravljeno je razotkrivanje antigena Tris-EDTA puferom (pH 9.0; 10 mM Tris baza, 1 mM EDTA, 0,05% Tween 20), na temperaturi 95°C pod tlakom 2 minute. Nakon hlađenja, stanice su isprane PBS-om 3 puta po 5 minuta. Endogene peroksidaze blokirane su 3% H₂O₂ u PBS-u 20 minuta. Nakon ispiranja PBS-om 3 puta po 5 minuta stanice su inkubirane monoklonalnim protutijelima na estrogenski receptor α (ER α ; anti-humano, klon 1D5, šifra M7047 DAKO) u razrjeđenju 1:50 1% BSA u PBS-u i na progesteronski receptor (PR; anti-humano, klon PgR 636, šifra M3569 DAKO) u razrjeđenju 1:100 1% BSA u PBS-u. Nakon ispiranja PBS-om 3 puta po 5 minuta dodano je sekundarno protutijelo EnVision (DAKO) te je inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja sekundarnog protutijela PBS-om 3 puta po 5 minuta, dodao se

diaminobenzidin (DAB, DAKO) koji je kod vezanog protutijela tj. prisutnog antigena davao smeđe obojenje. Suvišak DAB-a ispirao se destiliranom vodom, te su stanice dehidrirane u rastućem gradijentu alkohola (70%, 96%, 100%) te u ksilenu. Na kraju, na stanice su stavljani Kanada balzam i pokrovnica.

Rezultati su prikazani semikvantitativno, određivanjem imunocitokemijskog indeksa bojenja uzimajući u obzir intenzitet reakcije te određujući postotak neprijeporno imunoreaktivnih stanica. Intenzitet reakcije (bojenja) svrstan je u dvije skupine: odsutnost reakcije i pozitivitet reakcije, dok je postotak imunoreaktivnih stanica određivan na 1000 pregledanih tumorskih stanica.

4.8.1.3. Bojanje na HER2

HER2 status se može procijeniti komplementarnom metodom kojom se kvantificiraju HER2 površinski receptori metodom imunohisto- ili citokemije. Karcinomi se smatraju HER2 pozitivnima ako se intenzitet bojenja stanične membrane označi kao 3+ IHC metodom ili demonstrira amplifikacija gena FISH metodom. Određivanje HER2 statusa uvelo se u rutinsku dijagnostiku primjenom Hercep testa. Vrijednosti Hercep testa određuju se od 0-3+ (plusa) što su zapravo vrijednosti koje ukazuju na obojanost stanične membrane (tablica 1). Protutijelo koje je korišteno obilježava HER2 na membrani stanica. Kao pozitivna kontrola uzeta je kultura stanica SkBr3.

Nakon fiksacije stanice su isprane u PBS-u 3 puta po 5 minuta. Nakon ispiranja napravljeno je razotkrivanje antigena u Epitope Retrieval Solution puferu (DAKO), na temperaturi 95°C 40 minuta. Nakon hlađenja, stanice su isprane PBS-om 3 puta po 5 minuta. Endogene peroksidaze blokirane su 3% H₂O₂ u PBS-u 20 minuta. Nakon ispiranja PBS-om 3 puta po 5 minuta stanice su inkubirane monoklinalnim protutijelom na HER2 protein (ERBB2 ili NEU; anti-humano, šifra K5207 DAKO) obilježen peroksidazom. Nakon ispiranja PBS-om 3 puta po 5 dodao se diaminobenzidin (DAB, DAKO) koji je kod vezanog protutijela tj. prisutnog antigena davao smeđe obojenje. Suvišak DAB-a ispirao se destiliranom vodom, a jezgra je obojena hematoksilinom, te je sve isprano u vodovodnoj vodi. Stanice su zatim dehidrirane u rastućem

gradijentu alkohola (70%, 96%, 100%) te u ksilolu. Na kraju, na stanice su stavljeni Kanada balzam i pokrovnica.

Rezultati su prikazani semikvantitativno, određivanjem imunocitokemijskog indeksa bojenja uzimajući u obzir intenzitet reakcije te određujući postotak neprijeporno imunoreaktivnih stanica. Intenzitet reakcije (bojenja) svrstan je u dvije skupine: odsutnost reakcije i pozitivitet reakcije, dok je postotak imunoreaktivnih stanica određivan na 1000 pregledanih tumorskih stanica.

Tablica 1. Kliničko-patološka korelacija vrijednosti HER2 membranskog pozitiviteta

Obojenost membrane u manje od 30% tumorskih stanica	0	Negativan nalaz
Slabo nepotpuno i zrnato membransko obojenje u više od 30% tumorskih stanica	1+	Negativan nalaz
Slabo do srednje potpuno obojenje u više od 30% tumorskih stanica	2+	Potrebna dodatno metoda CISH
Jako potpuno obojenje membrane u više od 30% tumorskih stanica	3+	Pozitivan nalaz

4.8.2. Određivanje markera matičnih stanica protočnom citometrijom

Za analizu ALDH, koji ukazuje da su stanice tumorsko-matičnog karaktera, stanice SUM159 (Asterand, Royston, Hertfordshire, UK) su bile uzete is posuda u kojima su se kultivirale uz

pomoć enzima akutaze (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) čije je djelovanje trajalo 5 minuta na temperaturi od 37°C nakon čega su dvaput isprane otopinom fosfatnog pufera (PBS). SUM159 stanice uzgajane na kolagenu i kolagenu tretiranom HNE-om su odljepljene od podloge pomoću TRypLE (Gibco/Invitrogen, Paisley, Renfrewshire, UK) i konačno razrijeđene u Mammary Epithelial Basal Medium (MEBM; Lonza, Wuppertal, Germany) u svrhu daljnje analize. Za Aldefluor esej, stanice su bile isprane i konačno razrijeđene u Aldefluor puferu (204). Kako bi se izmjerila aktivnost aldehyd dehidrogenaze (ALDH), Aldefluor esej (STEMCELL Technologies, Grenoble, France) primijenjen je prema preporukama proizvođača kako je već objavljeno (205).

Svi su uzorci stavljeni na LSRII protočni citometar (BD Bioscience) a uzorci očitani sa DIVA software (BD Bioscience).

4.9. UTJECAJ DOKSORUBICINA

4.9.1. Utjecaj doksorubicina na proliferaciju

U terapiji tumora dojke, kemoterapija doksorubicinom daje se tijekom šest ciklusa, svaka tri tjedna po jedna doza u bolusu, intravenozno s fiziološkom otopinom. Injiciranje jedne doze traje oko 2 sata.

Kako bi se pratio utjecaj kemoterapije na matične stanice karcinoma dojke stanice su se nasadile na predhodno pripremljene podloge. Podloge su polistiren, kolagen i kolagen izloženi tretmanu s 1, 10 μM koncentracijama HNE-a. Dan nakon pripreme podloga stanice su bile nasadene u gustoći 10 000 stanica u 200 μl . Stanice su zatim ostavljene 3 h da se zalijepe. Nakon što su se stanice priljepile izložene su tretmanu s 0, 0.01, 0.05, 0.1, 5, 10, 100 μM doksorubicinom. Dan nakon tretmana na stanice je nakapan ^3H -timidin (1 μCi /jažici, Amersham, SAD) i ostavljen je 24 h kako bi se ugradio u novosintetiziranu DNK. Kako bi se očitao intenzitet ugradnje timidina stanice su lizirane na sakupljaču stanica (cell-harvester; Skatron, Norveška) tako da je radioaktivno obilježena DNK ostala na apsorpcijskom filteru papiru građenom od staklenih vlakana. Filteru papir je zatim stavljen u posudice sa scintilacijskom tekućinom, te je intenzitet ugradnje ^3H -timidina mjereno na β -scintilacijskom brojaču (Perkin Elmer, SAD).

S obzirom da je prvotni raspon koncentracija doksorubicina bio preširok, eksperimenti su ponovljeni sa smanjenim rasponom koncentracija od 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 i 5 μM doksorubicina, a po identičnom protokolu.

4.9.2. Utjecaj doksorubicina na stvaranje ROS-a

Kako bi se pratio utjecaj doksorubicina na stvaranje ROS-a u matičnim stanicama karcinoma dojke stanice su se nasadile na predhodno pripremljene podloge. Podloge su polistiren, kolagen i kolagen izložen tretmanu s 1 i 10 μM HNE-om. Dan nakon pripreme podloga stanice su bile nasadene u gustoći 10 000 stanica u 200 μl . Stanice su zatim ostavljene 3 h da se zalijepe. Nakon što su se stanice priljepile izložene su tretmanu s 0, 0.01, 0.05, 0.1, 5, 10, 100 μM doksorubicinom. Tretman doksorubicinom trajao je 1 h, nakon čega su stanice centrifugirane, medij s doksorubicinom uklonjen, a na stanice je dodana boja 2',7-diklofluorescin diacetat (DCFH-DA, Fluka). Ova boja se koristi za mjerenje ROS-a u stanicama sisavaca i kvasca, a brzo i jednostavno daje rezultate. Naime, DCFH-DA ulazi u stanice djelovanjem staničnih esteraza, te fluorescira tek ukoliko dođe do oksidacije ROS-om u fluorescentni oblik 2',7'-diklofluorescin (DCF). Intenzitet fluorescencije DCF-a, mjere za količinu unutarstaničnih ROS-ova očitao je uz pomoć Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Varian) sa ekscitacijom na 500 nm i detekcijom emisije na 530 nm.

S obzirom da je prvotni raspon koncentracija doksorubicina bio preširok, eksperimenti su ponovljeni sa smanjenim rasponom koncentracija od 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 i 5 μM doksorubicina, a po identičnom protokolu.

4.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička raspodjela parametara provjerena je χ^2 – testom, na razini statističke značajnosti $p < 0,05$. Jačina i smjer povezanosti parametara u modelu linearne regresije, izraženi su koeficijentom korelacije r , na razini statističke značajnosti $p < 0,05$. Ovisno o kontekstu i prirodni pojava koje se istražuju, postoji statistički stav tumačenja vrijednosti koeficijenta korelacije.

Tablica 2. Značenje vrijednosti koeficijenta korelacije i povezanosti parametara.

KOEFICIJENT KORELACIJE	POVEZANOST
0 do $\pm 0,20$	Nikakva ili neznatna povezanost
$\pm 0,20$ do $\pm 0,40$	Lagana povezanost
$\pm 0,40$ do $\pm 0,70$	Stvarna, značajna povezanost
$\pm 0,70$ do $\pm 1,00$	Visoka ili vrlo visoka povezanost

Dio podataka prikazan je t-testom, analizom varijance i postotcima. Rezultati ispitivanja prikazani su grafički i tabelarno. Statistička obrada vršena je programom Statistica 7.

5. REZULTATI

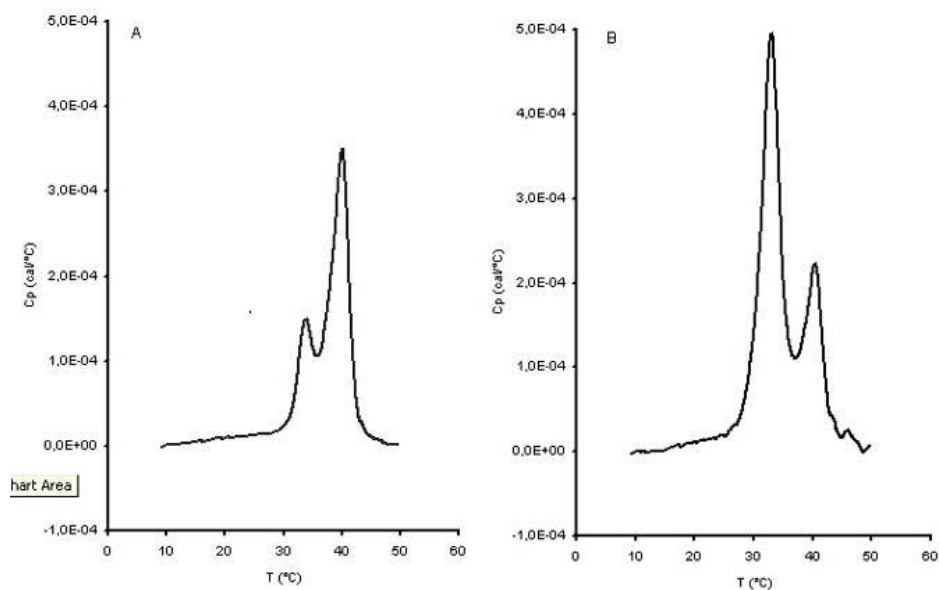
5.1. MODIFIKACIJA KOLAGENA

Kako bi se pokazalo da je oksidacijska modifikacija kolagena prisutna koristile su se sljedeće metode: diferencijalna pretražna kalorimetrija, cirkularni dikroizam te kapljična analiza HNE-proteinskih konjugata.

5.1.1. Modifikacija hidroksilnim radikalom

Kako bi se pokazalo da li je modifikacija kolagena hidroksidnim radikalom bila uspješna, upotrijebljene su metode diferencijalna pretražna kalorimetrija i cirkularni dikroizam. Izlaganje kolagena hidroksidnom radikalom uzrokovalo je modifikaciju karakteriziranu smanjenjem temperature denaturacije (Slika 3 i Tablica 3). Diferencijalna pretražna kalorimetrija pri 0.5–1°C/min pokazala je dvije denaturacijske tranzicije za nemodificirani kolagen – jednu na temp. 40.1 °C (glavna denaturacijska tranzicija) i 33.9 °C (manja denaturacijska tranzicija, tj. pred tranzicija). Kolagen modificiran hidroksidnim radikalom pokazuje 2 denaturacijske tranzicije s pomakom temperature denaturacije – glavna denaturacijska tranzicija nastala je na 33°C, dok je manji dio uzorka denaturiran na 40,5°C.

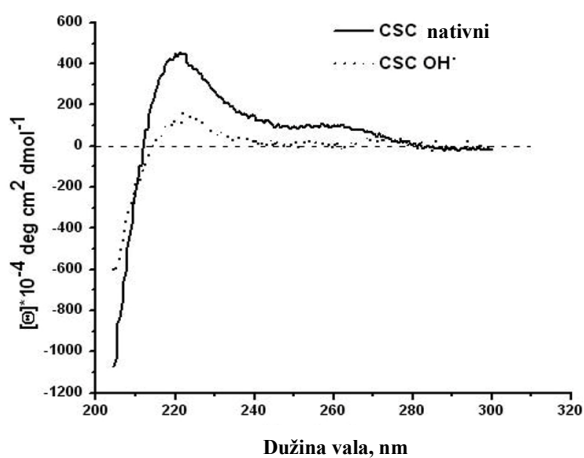
Analizom cirkularnog dikroizma (Slika 4) vidljivo je da oksidacija uzrokuje značajne strukturalne promjene na molekuli kolagena. Jačina signala na 222 nm pokazivala je slabiji intenzitet što je upućivalo na gubitak otprilike 70% native strukture. Također, opažen je djelomični gubitak topivosti pri ovoj promjeni.



Slika 3. Metoda diferencijalne pretražne kalorimetrije pokazuje denaturacijski profil nemodificiranog kolagena i kolagena modificiranog hidroksilnim radikalom. Vide se dvije denaturacijske tranzicije za nemodificirani kolagen – jedna na temp. 40.1°C (glavna denaturacijska tranzicija) i 33.9 °C (manja denaturacijska tranzicija, tj. pred tranzicija). Kolagen modificiran hidroksidnim radikalom pokazuje 2 denaturacijske tranzicije s pomakom temperature denaturacije – glavna denaturacijska tranzicija nastala je na 33°C, dok je manji dio uzorka denaturiran na 40,5°C.

Tablica 3. Denaturacijski profil uzoraka kolagena izoliranog iz sirove teleće kože

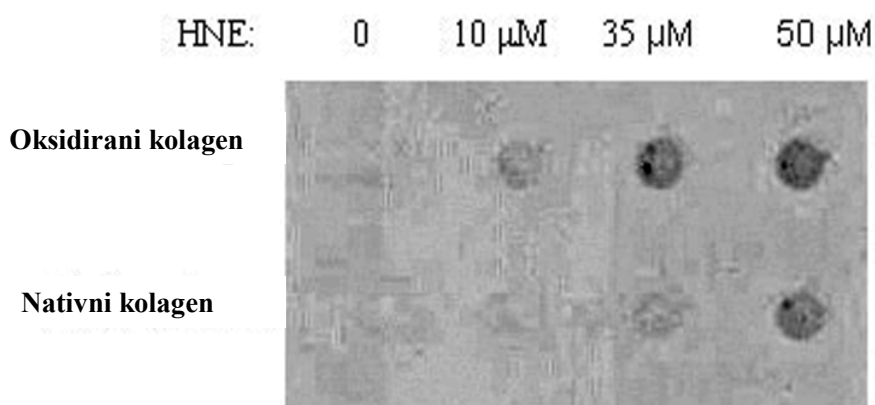
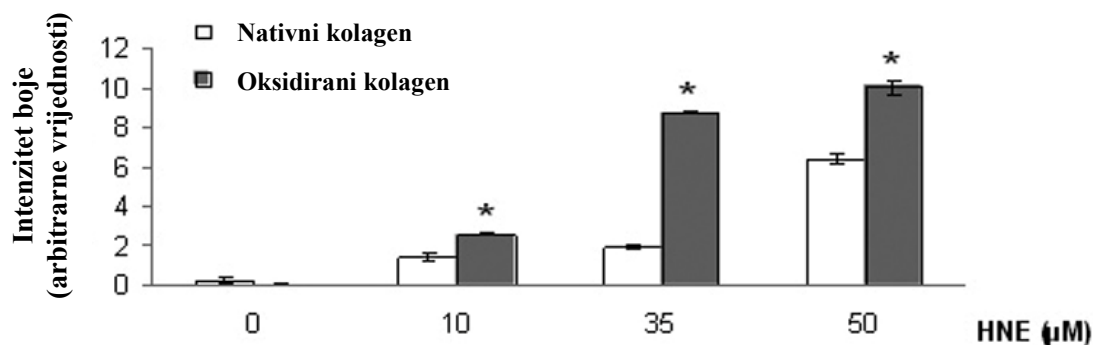
Modifikacija	parametri	Vršak 1	Vršak 2
nema je	vršna pozicija (°C)	33.9	40.1
	vršno područje (cal)	7.35×10^{-4}	16.23×10^{-4}
hidroksilni radikal (OH·)	vršna pozicija (°C)	33.0	40.5
	vršno područje (cal)	26.85×10^{-4}	9.23×10^{-4}



Slika 4. Analizom cirkularnog dikroizma vidljivo je da oksidacija uzrokuje značajne strukturalne promjene na molekuli kolagena. Jačina signala na 222 nm pokazivala je slabiji intenzitet što je upućivalo na gubitak otprilike 70% native strukture.

5.1.2. Modifikacija HNE-om

Kako bi se provjerio kapacitet kolagena za vezanje HNE-a napravljena je kapljična analiza proteina. Kapljična analiza je pokazala da oksidirani kolagen veže više kolagena (tj. ima više HNE-histidinskih konjugata) nego nativni kolagen (Slika 5). Stoga je bilo potrebno ispitati vijabilnost stanica na ovim podlogama. Iznenadujuće, kolagen općenito, i nativni i oksidirani, vežu više HNE-a od govedeg serumskog albumina (BSA), koji se koristi kao pozitivna kontrola vezanja HNE-a na proteine.

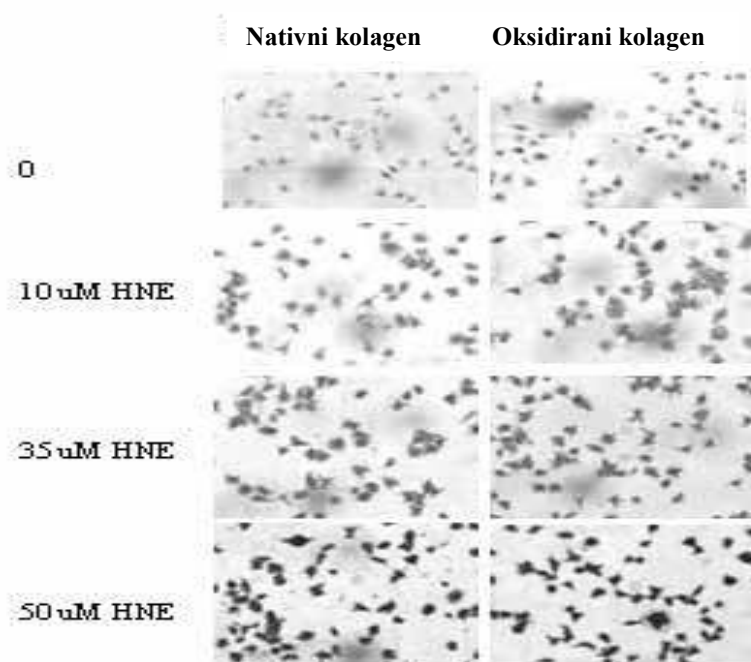


Slika 5. Kapljična analiza HNE-histidinskih konjugata pokazala je kako oksidirani kolagen veže više HNE-a nego nativni kolagen.

5.1.3. Utjecaj kolagena na rast stanica SUM159

Kako bi se pratio utjecaj kolagena na rast stanica, načinjena je kapljična analiza HNE-histidinskih konjugata na kolagenu i na oksidiranom kolagenu (Slika 6). Neočekivano, rezultati kapljične analize su pokazali da je oksidirani kolagen imao više HNE-proteinskih konjugata u usporedbi s kolagenom. Kako bi se vidjelo da li razlika u vezanju HNE-a utječe na vijabilnost stanica, stanice su nasađene na oksidirani kolagen i kolagen. Stanice koje su rasle na oksidiranom kolagenu imale su smanjenu vijabilnost, vjerojatno zbog veće razine HNE-

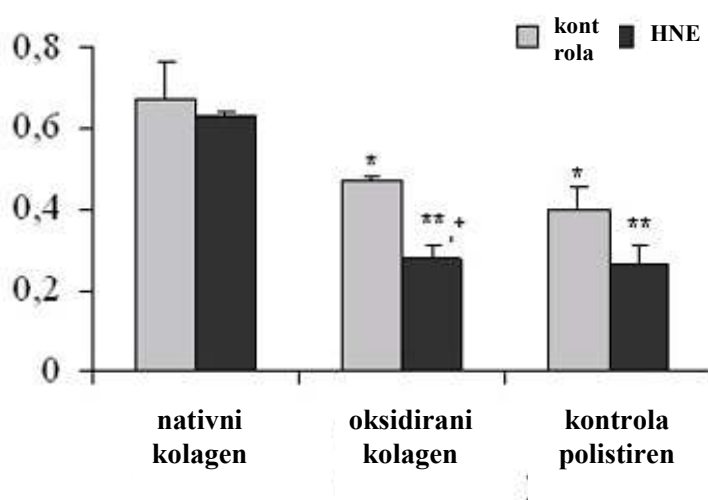
proteinskih konjugata. S druge strane, tretman s HNE-om nije utjecao na rast stanica uzgajanih na kolagenu, stoga je za pretpostaviti da oksidativno modificirani kolagen nakon izlaganja tretmanu s hidroksilnim radikalom može uzrokovati lančanu reakciju oksidacije koja može utjecati na njegov afinitet prema HNE-u. Ova će se mogućnost dalje proučavati kako bi se procijenio mehanizam interakcije produkata lipidne peroksidacije i kolagenog matriksa na rast matičnih stanica karcinoma dojke.



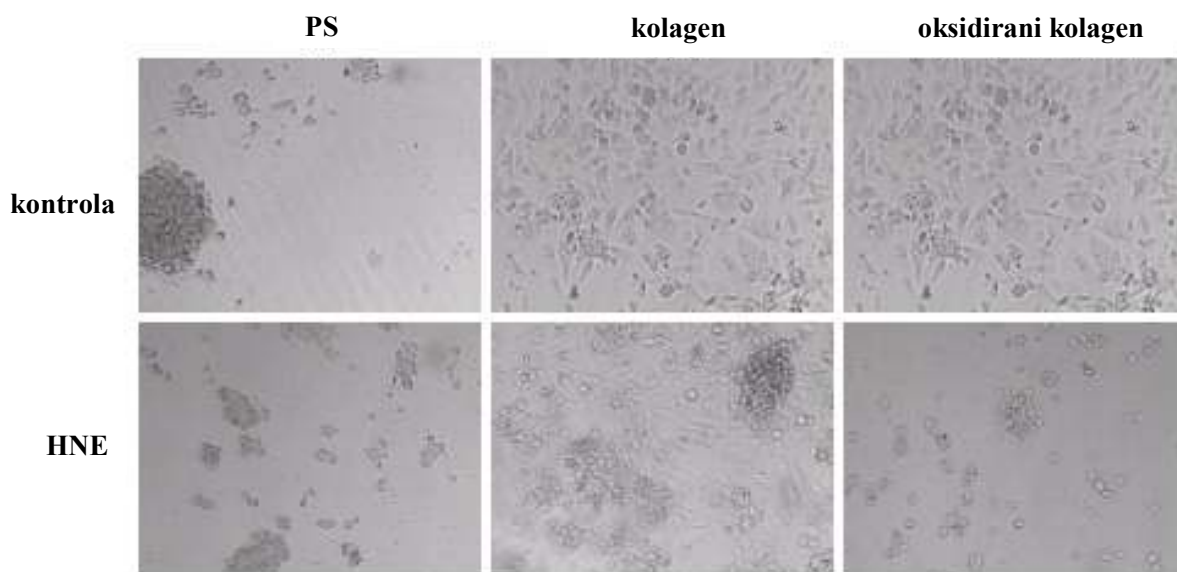
Slika 6. HNE-proteinski konjugati na SUM159 stanicama koje su uzgajane na podlogama oksidiranog kolagena i kolagena. Stanice su izložene tretmanu s HNE-om te je imunocitokemijskim bojanjem pokazana prisutnost HNE-histidinskih konjugata. Pozitivna reakcija vidi se kao tamno obojenje, stanice koje su rasle na oksidiranom kolagenu imale su veću količinu HNE-histidinskih konjugata.

5.2. UTJECAJ KOLAGENA NA ZNAČAJKE RASTA STANICA SUM159

Na slici 7. su prikazani rezultati MTT testa koji je mjerio vijabilnost SUM 159 matičnih stanica karcinoma koje su nasadene na različite podloge s obzirom na izloženost HNE-u. U usporedbi s polistirenom, kolagen je povećao vijabilnost stanica. Također, u usporedbi s polistirenom, kolagen je i smanjio citotoksičnost HNE-a. Međutim, takvi stimulirajući i zaštitni utjecaji kolagena izgubili su se nakon njegove oksidacije. Naime, vijabilnost se SUM 159 stanica nasadenih na oksidirani kolagen, nakon tretmana HNE-om, značajno smanjila ($P < 0.05$), na razinu rasta stanica na polistirenu. Oksidirani kolagen, sam za sebe, reducirao je vijabilnost stanica u usporedbi s kolagenom. Dakle, oksidirani kolagen nije mogao podržavati rast stanica SUM 159 te smanjiti citotoksični efekt HNE-a. Rezultati stanične morfologije u kulturama stanica, prikazani na slici 8., također podržavaju ove rezultate.

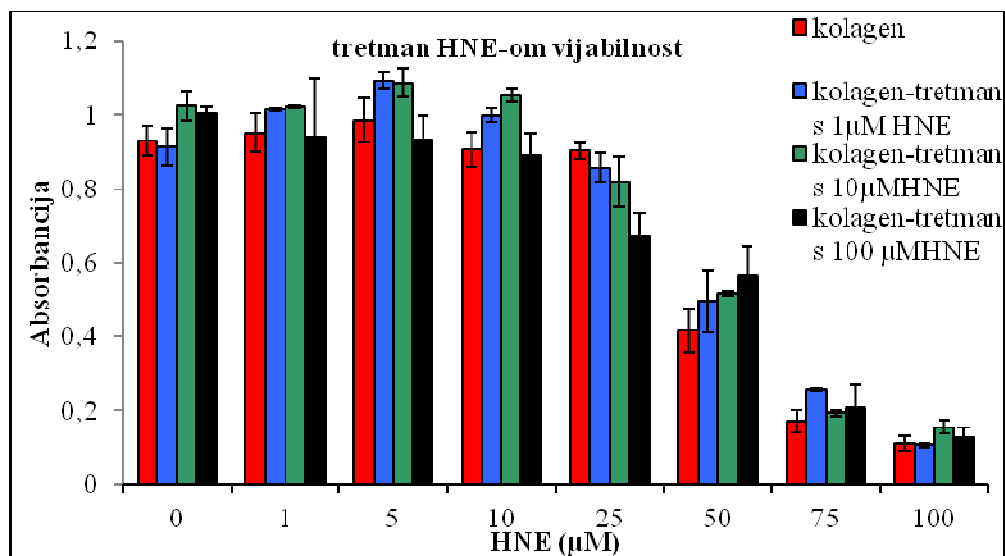


Slika 7. Utjecaj HNE-a na rast stanica SUM159 na različitim podlogama. Kao podloge su korišteni kolagen, oksidirani kolagen i polistiren. Vijabilnost stanica se mjerila MTT testom. * $P < 0.05$ u usporedbi s kontrolama stanica koje su rasle na kolagenu; * $P < 0.05$ u usporedbi sa stanicama izloženima tretmanu s HNE-om koje su rasle na kolagenu, * $P < 0.05$ u usporedbi s kontrolama stanica koje su rasle na oksidiranom kolagenu.



Slika 8. Utjecaj HNE-a na morfologiju SUM159 stanica na različitim podlogama. Kao podloge su korišteni kolagen, oksidirani kolagen i polistiren.

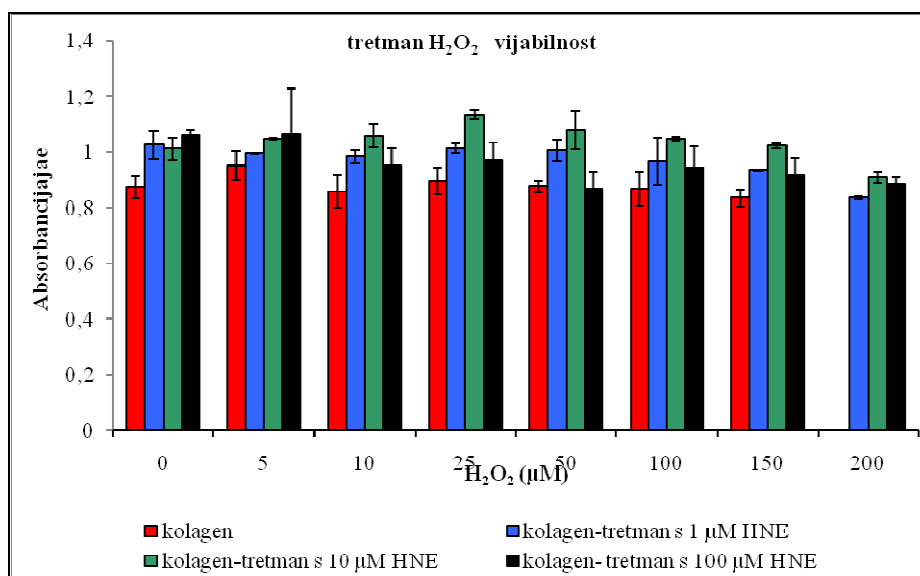
5.3. KOLAGEN POTPOMAŽE OPORAVAK OD AKUTNOG OKSIDACIJSKOG STRESA



Slika 9. Ispitivanje vijabilnosti stanica na kolagenu izloženome tretmanu s HNE-om. Kolagen izložen tretmanu s 10 i 100 μM HNE-om, povećao je vijabilnost stanica. Izlaganjem 5 i 10 μM HNE-u povećana je vijabilnost stanica na kolagenu s 1 i 10 μM HNE-om. Izlaganje stanica 50 μM HNE-u pokazala je da je to približno LD₅₀, tj. letalna doza pri kojoj je 50% stanica mrtvo. Izlaganje 75 i 100 μM HNE-u smanjilo je u potpunosti vijabilnost stanica.

Kako bi se istražila specifičnost promjena značajki rasta stanica na oksidiranom kolagenu, ispitana je vijabilnost stanica na kolagenu izloženome tretmanu s HNE-om. Kolagen izložen tretmanu s 10 i 100 μM HNE-om, povećao je vijabilnost stanica. Izlaganje HNE-u pokazalo je modifikaciju rasta stanica. Naime, 1 μM HNE ujednačio je rast stanica, bez značajnih razlika. Za razliku od njega 5 i 10 μM HNE povećao je vijabilnost stanica na kolagenu s 1 i 10 μM HNE-om, dok je na kolagenu sa 100 μM vijabilnost jednaka kontroli. Kod izlaganja 25 μM HNE-u, HNE je izjednačio vijabilnosti na kolagenu te kolagenu izloženom tretmanu s 1 i 10 μM HNE-om, dok je najniža vijabilnost bila na kolagenu sa 100 μM HNE-om. Izlaganje stanica 50 μM HNE-u pokazala je da je to približno LD₅₀, tj. letalna doza pri kojoj je 50% stanica mrtvo. Izlaganje 75 i 100 μM HNE-u smanjilo je u potpunosti vijabilnost stanica.

5.4. AKUTNI OKSIDACIJSKI STRES UZROKOVAN VODIKOVIM PEROKSIDOM NE UTJEČE NA VIJABILNOST

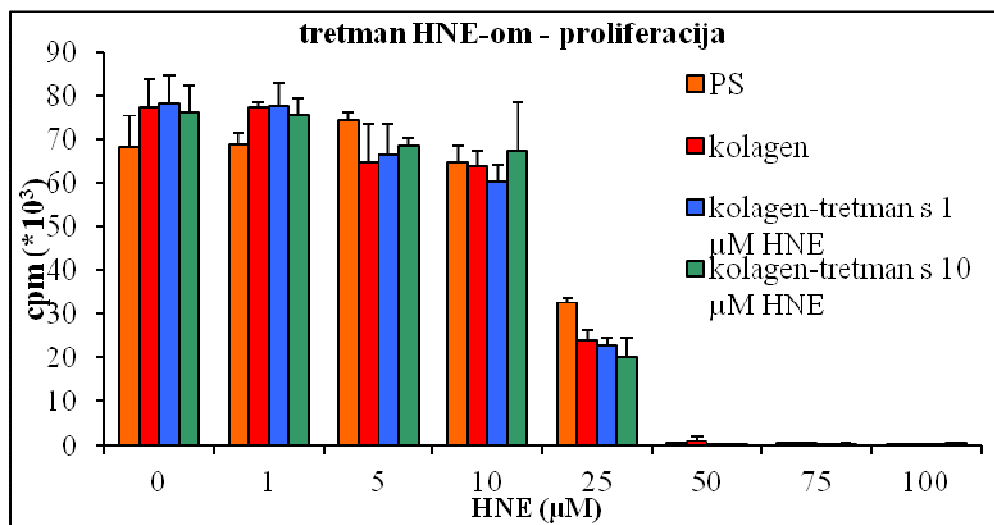


Slika 10. Vijabilnost stanica izloženih vodikovom peroksidu na podlogama kolagena izloženih tretmanu s HNE-om. Kolagen izložen tretmanu s 1, 10 i 100 μM HNE-om, povećao je vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom (kolagen). Izlaganje vodikovom peroksidu u koncentracijama od 5, 10 i 25 μM rezultiralo je blagim povećanjem vijabilnosti stanica na podlogama izloženima tretmanu s 1 i 10 μM HNE-om, a pad vijabilnosti zabilježen je na podlogama kolagena izloženih tretmanu s 100 μM HNE-om.

Kako bi se istražila specifičnost promjena značajki rasta stanica na kolagenu izloženom tretmanu s HNE-om, ispitana je vijabilnost stanica izloženih vodikovom peroksidu. Kolagen izložen tretmanu s 1, 10 i 100 μM HNE-om, povećao je vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom (kolagen). Izlaganje vodikovom peroksidu u koncentracijama od 5, 10 i 25 μM rezultiralo je blagim povećanjem vijabilnosti stanica na podlogama izloženima tretmanu s 1 i 10 μM HNE-om što ukazuje na modifikaciju rasta stanica u uvjetima blagog oksidacijskog stresa. Primjećen je blagi pad vijabilnosti stanica na podlogama izloženima tretmanu sa 100 μM HNE-a te na kontroli prilikom izlaganja tretmanu stanica s 10 μM H₂O₂. Prilikom izlaganja stanica sve višim

koncentracijama vodikovog peroksida od 50, 100, 150 i 200 μM nije vidljiva smanjena vijabilnost stanica na niti jednoj od podloga. Također, niti pri najvišim koncentracijama vodikovog peroksida nije postignuta letalna doza.

5.5. UTJECAJ AKUTNOG STRESA NA PROLIFERACIJU STANICA



Slika 11. Kako bi se pratio utjecaj kratkotrajnog stresa na matične stanice karcinoma dojke stanice su nasadene na predhodno pripremljene podloge PS i kolagen izložen tretmanu s različitim koncentracijama HNE-a. Stanice se najbrže dijele pri izlaganju koncentracijama do 10 μM HNE-a dok se pri dozi od 50 μM HNE-a stanice ne dijele niti na jednoj podlozi.

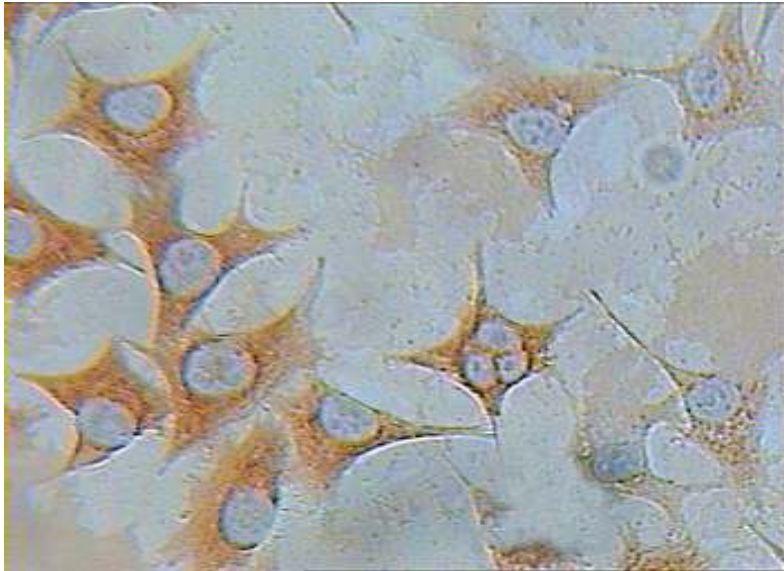
Iz dobivenih se podataka na slici 11. vidi da su koncentracije do 10 μM HNE-a poticajne za stanice, one se dijele tj. bilježi se ugradnja radioaktivnog timidina u jezgre stanica jednako na svim podlogama. Nakon izlaganja koncentraciji od 25 μM HNE-a bilježi se upola manja ugradnja radioaktivnog timidina u jezgre stanica na svim podlogama, a pri izlaganju koncentraciji od 50 μM dodanog HNE-a i više, ne bilježi se aktivnost ugradnje radioaktivnog timidina u jezgre stanica. Pri dozi od 50 μM HNE-a stanice se ne dijele niti na jednoj podlozi.

Tablica 4. Imunocitokemijsko bojenje na HNE-histidinske konjugate. Očitava se nuklearni i citoplazmatski pozitivitet (C i N) u svakoj skupini stanica kao i stanična morfologija te obrazac rasta na različitim podlogama (polistirenska, kolagen, kolagen izložen tretmanu s 1 μ M HNE-om i kolagen izložen tretmanu s 10 μ M HNE-om). Intenzitet je reakcije podijeljen na četiri jačine-bez reakcije (nula), slabog, srednje jakog i jakog intenziteta.

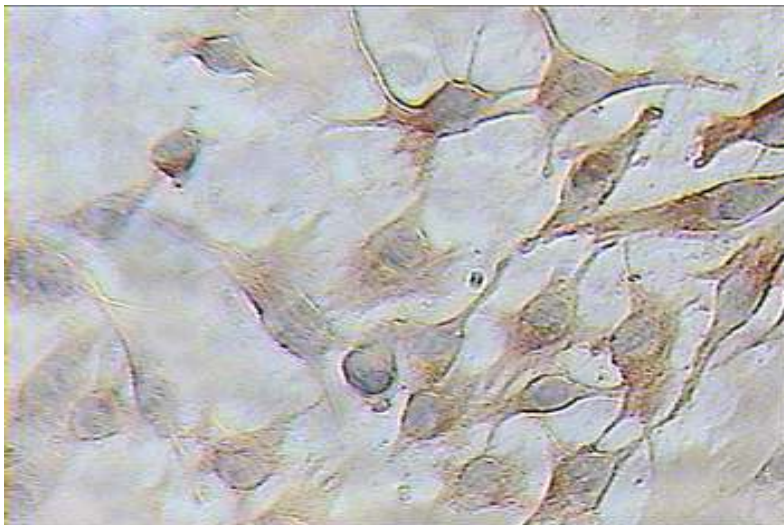
DODATAK μ MHNE	INTENZITET	PS	KOLAGEN	KOLAGEN + 1 μ M HNE	KOLAGEN + 10 μ M HNE
0	nula	100%	100%	100%	100%
	slab	0	0	0	0
	srednje jak	0	0	0	0
	jak	0	0	0	0
1	nula	100%	86%	95,33%	100%
	slab	0	14%C	4,67%C	0
	srednje jak	0	0	0	0
	jak	0	0	0	0
5	nula	100%	25,66%	82,66%	77,33%
	slab	0	62%C	16,67%C	22,67%C
	srednje jak	0	12,34%C	0,67%C	0
	jak	0	0	0	0
10	nula	48,67%	5%	1,33%	0
	slab	48%C	30%C	86%C,N	95%C,N
	srednje jak	0	60%C	11%C,N	5%C,N
	jak	3,33%C,N	5%C	1,67%C,N	0
25	nula	51,66%	3,33%	0	0
	slab	44%C	52,33%C,N	84,66%C,N	97%C,N
	srednje jak	4%C	40%C,N	15%C,N	3%C,N
	jak	1,34C,N	4,34%C,N	0,34%C,N	0
50	nula	80%	82,66%	16%	0
	slab	20%C,N	16%C,N	76%C,N	100%C,N
	srednje jak	0	0	4%C,N	0
	jak	0	1,34%C,N	4%C,N	0
75	nula	59,66%	2,33%	0	0
	slab	40,34%C,N	97,64%C,N	100%C,N	100%C,N
	srednje jak	0	0	0	0
	jak	0	0	0	0
100	nula	19,72%	27%	8%	0
	slab	39,16%C,N	73%C,N	91%C,N	100%C,N
	srednje jak	30%C,N	0	1%C,N	0
	jak	11,12%C,N	0	0	0

HNE (μM)	PS PODLOGA	KOLAGEN	KOLAGEN + 1 μM HNE	KOLAGEN + 10 μM HNE
0	stanice su pojedinačno na podlozi	50% stanica okruglo, 50% vretenasto stanice pojedinačno, 9 mitozna na 100 st.	stanice vretenaste i okrugle, pojedinačno i u malim nakupinama, 5 mitozna na 100 st.	stanice vretenaste i okrugle, pojedinačno i u malim nakupinama, 4 mitozna na 100 st.
1	stanice su pojedinačno na podlozi po koja mala nakupina	stanice vretenaste i okrugle, pojedinačno i u malim nakupinama, 12 mitozna na 100 st.	stanice vretenaste i okrugle, pojedinačno i u malim nakupinama, 6 mitozna na 100 st.	stanice vretenaste i okrugle, pojedinačno i u malim nakupinama, 13 mitozna na 100 st.
5	podloga vrlo blago smeđa	stanice vretenaste i okrugle, pojedinačno i u malim nakupinama, 3 mitoze na 100 st.	stanice vretenaste i okrugle, pojedinačno i u malim nakupinama, 3 mitoze na 100 st.	stanice vretenaste i okrugle, pojedinačno i u malim nakupinama, 6 mitozna na 100 st., podloga homogena, smečkasta
10	stanice u malim nakupinama, poneka pojedinačno, podloga homogena i blaga neravnomjerno na podlozi, stanice piknotične s nuklearnim +	stanice vretenaste okrugle, pojedinačno i u malim nakupinama, tamne st.piknotične kod jakog i srednje jakog intenziteta, boja se u 50% st. nakuplja uz jezgru, žarišno homogena smeđa podloga	stanice vretenaste, po koja okrugla, pojedinačno i u malim nakupinama, kod jakog i srednje jakog intenziteta boja se u 50% st. nakuplja uz jezgru, i unilateralno u citoplazmi, pozitivitet postaje i nuklearni, žarišno homogena smeđa podloga	stanice vretenaste okrugle, pojedinačno i u malim nakupinama, podloga homogena, smečkasta, pozitivitet postaje i nuklearni
25	stanice u malim nakupinama ali i pojedinačno, podloga homogena, smečkasta, kod srednje jakog pozitiviteta on je u sredini citoplazme i prema vanjskoj membrani	stanice vretenaste i okrugle, pojedinačno i u malim nakupinama, kod srednje jakog intenziteta boja se u 50% st. nakuplja uz jezgru i u obliku grudica unilateralno u citoplazmama, pozitivitet postaje i nuklearni, homogena, smeđa podloga	stanice vretenaste, po koja okrugla, pojedinačno i u malim nakupinama, kod jakog i srednje jakog intenziteta boja se u 50% st. nakuplja uz jezgru, tamne st.piknotične, žarišno homogena, smeđa podloga	stanice vretenaste okrugle, pojedinačno i u malim nakupinama, u srednje jako obojenim stanicama boja je grudasta u citoplazmama i uz jezgru stanica, podloga smečkasta, homogena

50	pojedinačno i u malim nakupinama, puno pozadinskog smeđeg materijala, stanice izgledaju mrtvo	sve stanice okrugle, pojedinačno i u nakupinama, tek po koja ima citoplazmatski pozitivitet, kod srednje jakog intenziteta boja se nakuplja uz vanjsku membranu homogena, smeđa podloga	sve stanice okrugle, kod srednje jakog i jakog pozitiviteta boja se nakuplja uz vanjsku membranu homogena, smeđa podloga po svuda	sve stanice okrugle, skvrčene, izgledaju mrtvo
75	stanice u malim nakupinama, ali i pojedinačno, izrazito mnogo pozadinskog smeđeg grudastog materijala, stanice izgledaju mrtvo	stanice su okrugle, sitne, skvrčene, izgledaju mrtvo, jako puno boje izvan stanica ali je još uvijek homogena	stanice su okrugle, sitne, skvrčene, izgledaju mrtvo, podloga je svuda homogena, smeđa	sve stanice okrugle, skvrčene, izgledaju mrtvo
100	stanice u malim nakupinama, ali i pojedinačno izrazito mnogo pozadinskog smeđeg grudastog materijala, stanice izgledaju mrtvo	stanice su okrugle, sitne, skvrčene, izgledaju mrtvo, jako puno boje izvan stanica, ali je ona grudasta	stanice su okrugle sitne, skvrčene, izgledaju mrtvo, podloga je svuda homogena, smeđa žarišno grudasta	sve stanice okrugle, skvrčene, izgledaju mrtvo



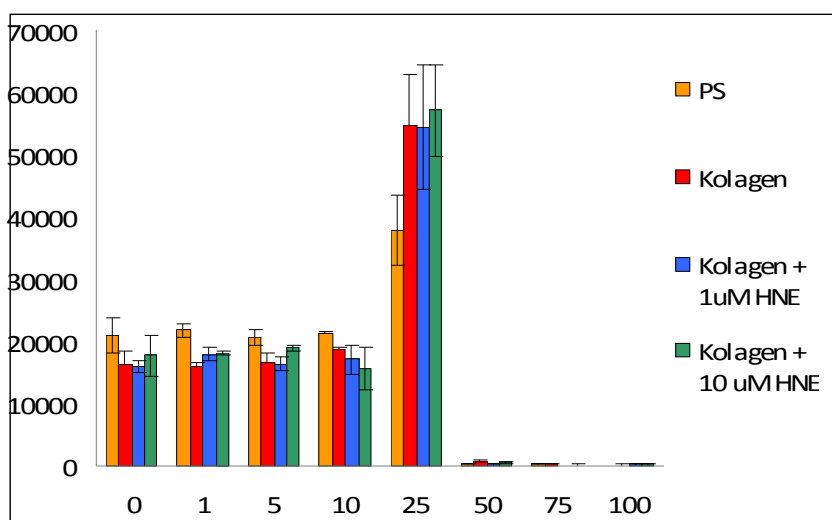
Slika 12. Kolagen uz izlaganje $10\mu\text{M}$ HNE-u, povećanje 40x. Stanice su vretenaste. Vidi se jak citoplazmatski pozitivitet uz nakupljanje boje uz jezgru. Podloga je žarišno smečkasta.



Slika 13. Kolagen + $1\mu\text{M}$ HNE uz izlaganje $25\mu\text{M}$ HNE-u, povećanje 40X. Stanice su vretenaste. Vidi se jak citoplazmatski pozitivitet uz nakupljanje boje uz jezgru. Podloga je žarišno smečkasta.

5.6. UTJECAJ KRONIČNOG STRESA NA PROLIFERACIJU STANICA

Iz dobivenih se podataka na slici 14. vidi da su, nakon desetodnevnog tretmana stanica, koncentracije od 25 μM HNE-a izrazito poticajne za proliferaciju stanica na svim podlogama, a naročito na kolagenu i kolagenu izloženom tretmanu s 1 i 10 μM HNE-om. Prilikom izlaganja koncentracijama HNE-a od 0-10 μM , stanice su se dijelile podjednakim intenzitetom na sve četiri podloge da bi se njihov rast udvostručio tj. utrostručio na svim podlogama uz izlaganje koncentraciji od 25 μM HNE-a. Drastičan je pad proliferacije uz izlaganje koncentracijama od 50 i više μM HNE-a, u biti se ne bilježi proliferacija stanica na tim koncentracijama.



Slika 14. Rezultati nakon desetodnevnog tretmana (svaki drugi dan) različitim koncentracijama reaktivnog aldehida HNE-a koji je dugoživući za razliku od hidroksilnog radikala. Vidljiva je podjednaka proliferacija stanica na svim podlogama prilikom izlaganja HNE-u od 0-10 μM , dvostruki do trostruki porast proliferacije na svim podlogama uz izlaganje 25 μM HNE-u te drastičan pad proliferacije uz izlaganje 50 i više μM HNE-u.

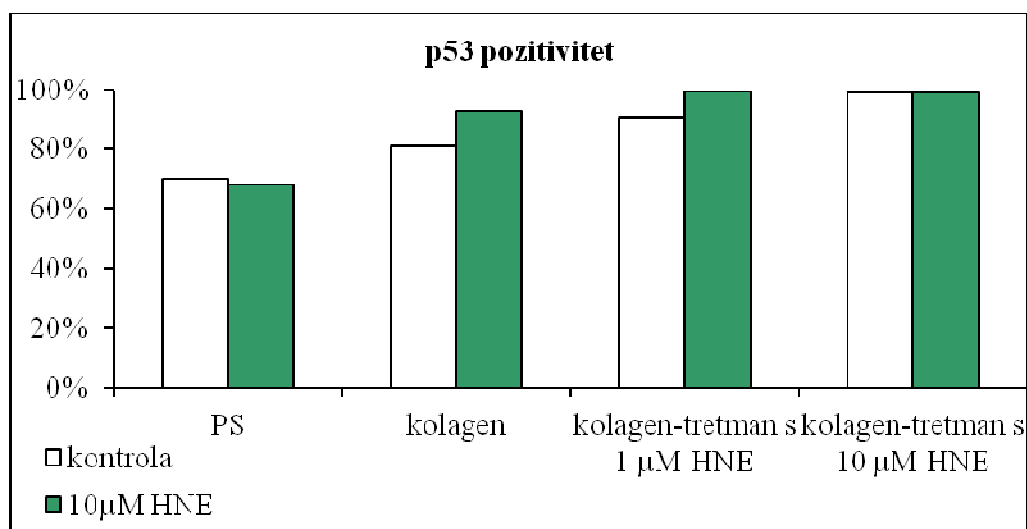
5.7. UTJECAJ KRONIČNOG STRESA NA DIFERENCIJACIJU STANICA

5.7.1. Imunocitokemijsko određivanje markera diferencijacije

5.7.1.1. Imunocitokemijsko bojanje na p53

Protein p53 koristi se prilikom dijagnostike tumora kao indikator agresivnosti tumora. Naime, pokazalo se da postoji povezanost između mutacije proteina p53 i kliničkog fenotipa karcinoma dojke, karcinomi bez mutacija bili su srednjeg kliničkog fenotipa, dok su oni s mutacijom bili izrazito agresivni.

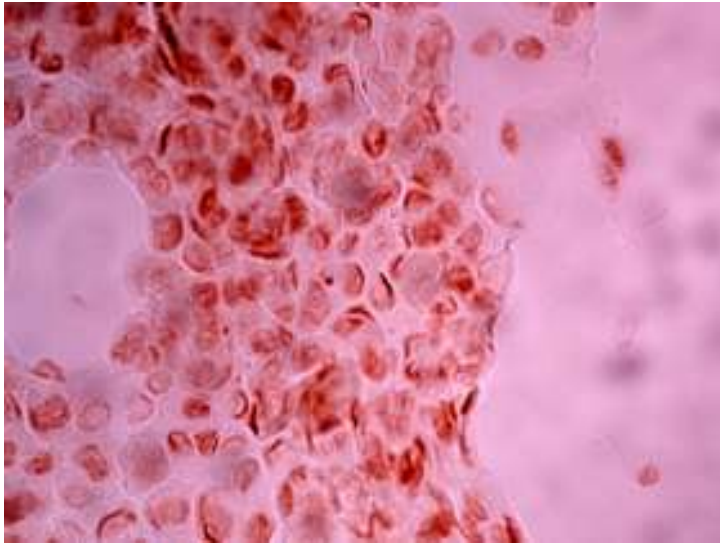
Na podlozi PS jednak je postotak stanica pozitivan bez obzira na izlaganje HNE-u (Tablica 15.) Vidljivo je da je postotak pozitivnih stanica ovisan o podlozi, a izlaganje se HNE-u nije pokazalo da utječe na količinu pozitivnih stanica osim u manjoj mjeri na podlogama kolagena i kolagena izloženog tretmanu s 1 μM HNE-om. Oko 10% više stanica je pozitivno na spomenutim podlogama nakon izlaganja koncentracijama od 10 μM HNE-a. Najmanji broj pozitivnih stanica je na PS-u i iznosi oko 70%, a najveći na kolagenu izloženom tretmanu s 10 μM HNE-om bez obzira na izlaganje HNE-u.



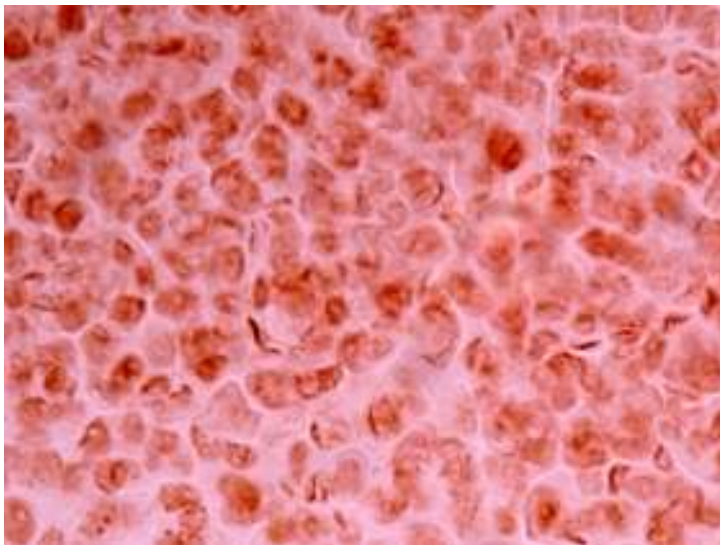
Slika 15. Rezultati imunocitokemijskog bojenja na p53 na četiri različite podloge (polistirenska, kolagen, kolagen izložen tretmanu s 1 µM HNE-om i kolagen izložen tretmanu s 10 µM HNE-om). Na svakoj podlozi je jedna skupina stanica. Vidljivo je da je postotak pozitivnih stanica ovisan o podlozi, a izlaganje se HNE-u nije pokazalo da utječe na količinu pozitivnih stanica osim u manjoj mjeri na podlogama kolagena i kolagena izloženog tretmanu s 1 µM HNE-om.

Tablica 5. Imunocitokemijsko bojenje na p53. Očitava se nuklearni pozitivitet u svakoj skupini stanica kao i odsutnost (nula) i prisutnost (pozitivno) reakcije

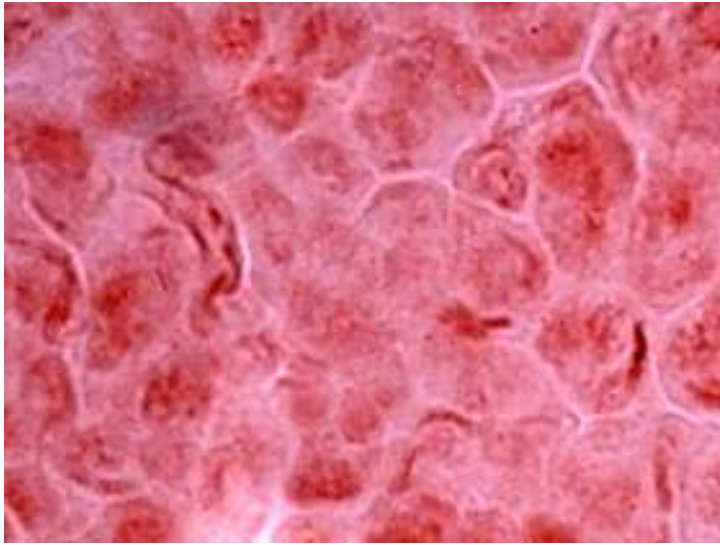
DODATAK	INTENZITET	PS	KOLAGEN	KOLAGEN + 1 µM HNE	KOLAGEN + 10 µM HNE
nula	nula	29,84%	19,00%	9,24%	1,06%
	pozitivno	70,16%	81,00%	90,76%	98,94%
10 µM HNE	nula	32,15%	7,15%	0,68%	1%
	pozitivno	67,85%	92,85%	99,32%	99%



Slika 16. Protein p53 na PE podlozi presvučenoj kolagenom izloženoj tretmanu s 1 μ M HNE-om uz izlaganje 10 μ M HNE-u, povećanje 20X. Stanice su grupirane u manje i veće nakupine te gotovo sve stanice pokazuju nuklearni pozitivitet na p53.



Slika 17. Protein p53 na PE podlozi presvučenoj kolagenom izloženoj tretmanu s 10 μ M HNE-om, povećanje 20X. Stanice su u velikim plažama i sve pokazuju nuklearni pozitivitet na p53.



Slika 18. Protein p53 na PE podlozi presvučenoj kolagenom izloženoj tretmanu s $10\mu\text{M}$ HNE-om uz izlaganje koncentraciji od $10\mu\text{M}$ HNE-a, povećanje 40X. Stanice su u velikim plažama i sve pokazuju nuklearni pozitivitet na p53.

Stanice su pozitivne na p53 na svim podlogama u intenzitetu od 81-99%. (Slike 16-18).

Obrazac rasta i adherencije stanica na plastičnoj podlozi je takav da su stanice pojedinačno i u vrlo malim nakupinama, te su rijetke. Na podlozi kolagena (bez i s izlaganjem $10\mu\text{M}$ HNE-u) stanice su rijetke, pojedinačne, a većina ih je u malim nakupinama s po kojom plažom. Na podlozi kolagena izloženoj tretmanu s $1\mu\text{M}$ HNE-om nema pojedinačnih stanica već su sve stanice u manjim i većim nakupinama te plažama (bez i s izlaganjem $10\mu\text{M}$ HNE-u). Na podlozi kolagena izloženoj tretmanu s $10\mu\text{M}$ HNE-om (bez i s izlaganjem $10\mu\text{M}$ HNE-u) stanice su samo u plažama.

5.7.1.2. *Imunocitokemijsko bojanje na ER i PR*

Imunocitokemijskim bojanjem na estrogenske i progesteronske receptore pratilo se da li su se stanice pod utjecajem različitih podloga i tretmana promjenile i diferencirale.

Budući da je poznato da reaktivni aldehidi, posebice HNE, utječu na diferencijaciju stanica, bilo je potrebno ispitati da li u slučaju rasta stanica na kolagenu i HNE-u izloženom kolagenu dolazi do diferencijacije. Posebice je od interesa ispitati da li višekratno/trajno izlaganje oksidacijskom stresu dovodi do diferencijacije. Stoga se kao parametar diferencijacije matičnih stanica karcinoma dojke pratila količina stanica imunocitokemijski pozitivnih na ER i PR.

Tablica 6. Pozitivitet i intenzitet imunocitokemijskog bojanja na ER nuklearne receptore na četiri različite podloge (polistirenskoj, kolagena, kolagena izloženog tretmanu s 1 μ M HNE-om i kolagena izloženog tretmanu s 10 μ M HNE-om). Sve su stanice podijeljene u dvije skupine, bez izlaganja HNE-u i one izložene 10 μ M HNE-u. Intenzitet reakcije podijeljen je na četiri jačine- bez reakcije (nula), slabog, srednje jakog i jakog intenziteta

DODATAK	INTENZITET	PS	KOLAGEN	KOLAGEN + 1 μ M HNE	KOLAGEN + 10 μ M HNE
nula	nula	100%	29,43%	60,00%	88,60%
	slab	0%	18,35%	9,60%	6,61%
	srednje jak	0%	52,21%	25,99%	2,22%
	jak	0%	0%	4,34%	1,60%
10 μ M HNE	nula	100%	30,24%	19,83%	89,93%
	slab	0%	17,28%	37,55%	4,39%
	srednje jak	0%	49,38%	25,79%	3,03%
	jak	0%	3,08%	18,44%	2,73%

DODATAK	INTENZITET	PS	KOLAGEN	KOLAGEN + 1 μ M HNE	KOLAGEN + 10 μ M HNE
nula	nula	100%	29,43%	60%	88,60%
	pozitivitet	0	70,57%	40%	11,40%
10 μ M HNE	nula	100%	30,24%	19,83%	89,93%
	pozitivitet	0	69,76%	80,17%	10,07%



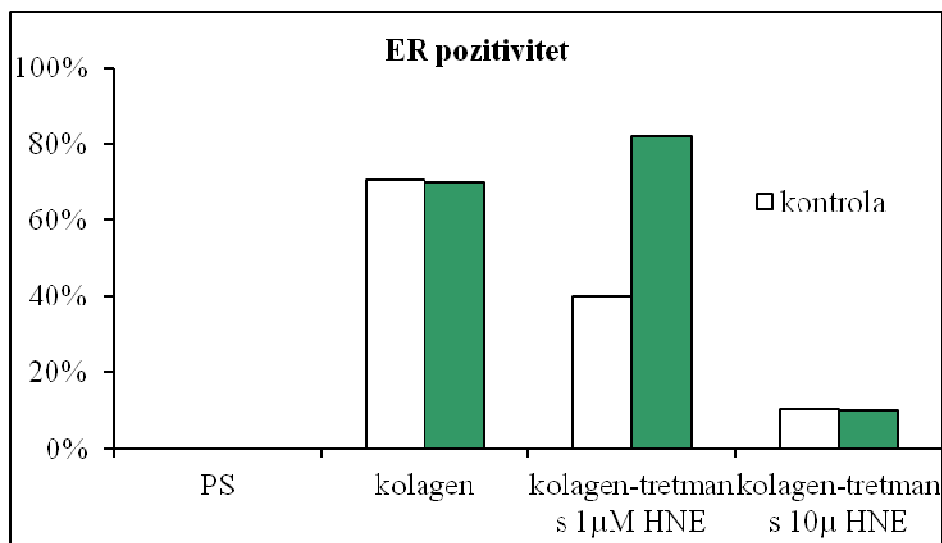
Slika 19. A) ER na PE podlozi, povećanje 40X. Stanice su pojedinačne te negativne na ER bojenja.



Slika 19. B) ER na PE podlozi presvučenoj kolagenom, povećanje 20X. Stanice su u plažama, vide se različiti intenziteti obojenja od slabog do srednje jakog.



Slika 19. C) ER na PE podlozi presvučenj kolagenom izloženj tretmanu s 10 μ M HNE-om uz izlaganje 10 μ M HNE-u, povećanje 20X. Stanice su u plažama, vide se različiti intenziteti obojenje od slabog do srednje jakog.

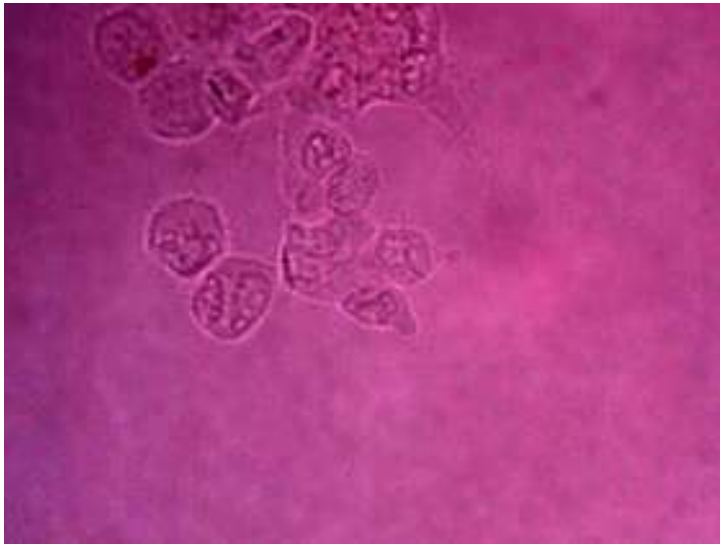


Slika 20. Intenzitet pozitiviteta na estrogenske receptore (ER) kod SUM159 stanica uzgajanih na različitim podlogama. Vidljivo je da su stanice koje su rasle na PS podlozi ostale negativne na ER. Najviše stanica pozitivnih na ER, dakle onih koje su najbolje diferencirane, bilo je na podlogama kolagena i kolagena izloženog tretmanu s 1 μ M HNE-om nakon izlaganja 10 μ M HNE-u kroz 10 dana. Nadalje, na podlozi kolagena izloženog tretmanu s 10 μ M HNE-om i bez obzira na izlaganje HNE-u manje od 10% stanica bilo je pozitivno na ER.

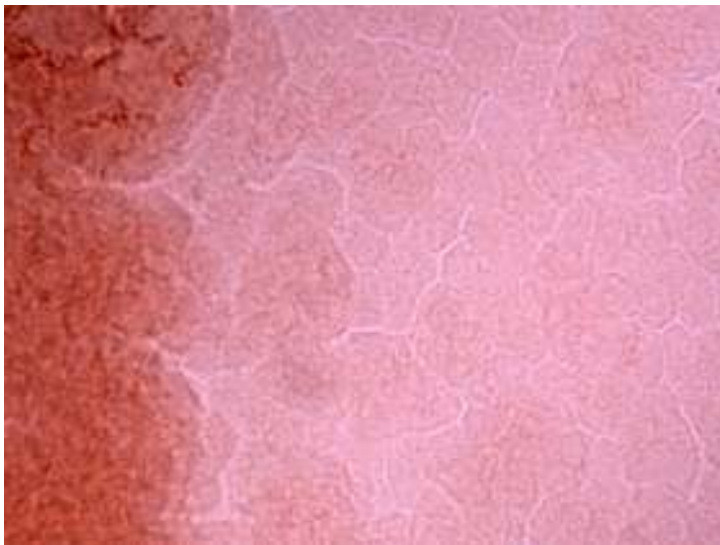
Tablica 7. Pozitivitet i intenzitet imunocitokemijskog bojanja na PR nuklearne receptore na četiri različite podloge (polistirenskoj, kolagena, kolagena izloženog tretmanu s 1 μ M HNE-om i kolagena izloženog tretmanu s 10 μ M HNE-om). Sve su stanice podijeljene u dvije skupine, bez izlaganja HNE-u i one izložene 10 μ M HNE-u. Intenzitet je reakcije podijeljen na četiri jačine- bez reakcije (nula), slabog, srednje jakog i jakog intenziteta

DODATAK	INTENZITET	PS	KOLAGEN	KOLAGEN + 1 μ M HNE	KOLAGEN + 10 μ M HNE
nula	nula	98,06%	79,35%	61,91%	93,40%
	slab	1,04%	13,22%	9,68%	4,47%
	srednje jak	0	2,90%	23,62%	0,29%
	jak	0	4,52%	4,78%	1,87%
10 μ M HNE	nula	94,24%	96,81%	51,65%	93,53%
	slab	5,76%	1,74%	10,80%	6,11%
	srednje jak	0	1,45%	13,65%	0,17%
	jak	0	0	2,59%	0,17%

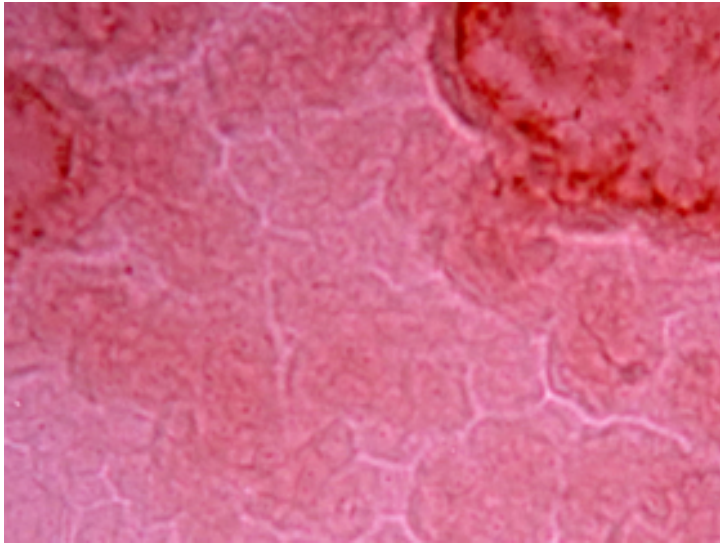
DODATAK	INTENZITET	PS	KOLAGEN	KOLAGEN+1 μ M HNE	KOLAGEN + 10 μ M HNE
nula	nula	98,06%	79,35%	61,91%	93,40%
	pozitivan	1,94%	20,65%	38,09%	6,60%
10 μ M HNE	nula	94,24%	96,81%	51,65%	93,53%
	pozitivan	5,76%	3,19%	48,35%	6,47%



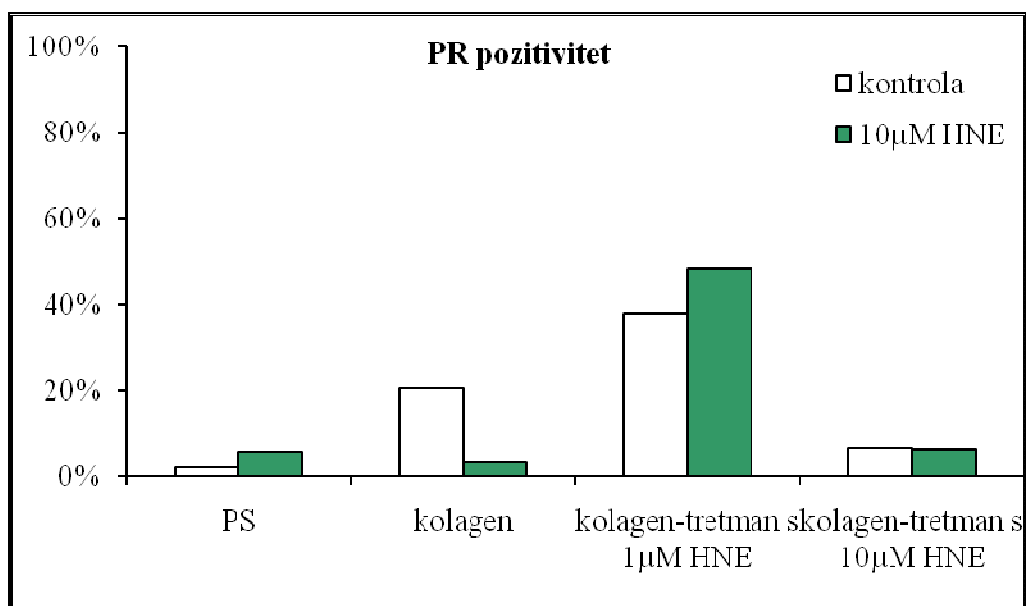
Slika 21. A) PR na PE podlozi uz izlaganje $10\mu\text{M}$ HNE-u, povećanje 40X. Stanice su pojedinačno, negativne na PR.



Slika 21. B) PR na PE podlozi presvučenog kolagenom koji je izložen tretmanu s $1\mu\text{M}$ HNE-om, povećanje 20X. Stanice su u plažama, na lijevoj strani slike vidljive su stanice koje pokazuju srednje jak i jak intenzitet obojenja na PR.



Slika 21. C) PR na PE podlozi presvučenoj kolagenom koji je izložen tretmanu s 1 μ M HNE-om uz izlaganje 10 μ M HNE-u, povećanje 40X. Stanice su u plažama, na gornjoj strani slike vidljive su stanice koje pokazuju srednje jak i jak intenzitet obojenja na PR.



Slika 22. Intenzitet pozitiviteta na progenske receptore (PR) kod SUM159 stanica uzgajanih na različitim podlogama. Kao i kod ER, samo 1-5% stanica koje su rasle na PS podlozi bilo je pozitivno na PR. Najviše stanica pozitivnih na PR bilo je na podlogama kolagena i kolagena izloženog tretmanu s 1 µM HNE-om bez i uz izlaganje 10 µM HNE-u kroz 10 dana. Kao i kod ER, na podlozi kolagena izloženog tretmanu s 10 µM HNE-om, bez obzira na izlaganje HNE-u, pozitivno je između 5 i 10% stanica.

Nakon što su stanice izlagane HNE-u svaki drugi dan kroz deset dana, imunocitokemijskim bojanjem dokazana je količina ER i PR kao markera diferencijacije. Iz dobivenih je rezultata vidljivo da su stanice koje su rasle na PS podlozi ostale negativne na ER. Najviše stanica pozitivnih na ER, dakle onih koje su najbolje diferencirane, bilo je na podlogama kolagena i kolagena izloženog tretmanu s 1 µM HNE-om nakon izlaganja 10 µM HNE-u kroz 10 dana. Nadalje, na podlogama kolagena izloženog tretmanu s 10 µM HNE-om i bez obzira na izlaganje HNE-u manje od 10% stanica bilo je pozitivno na ER.

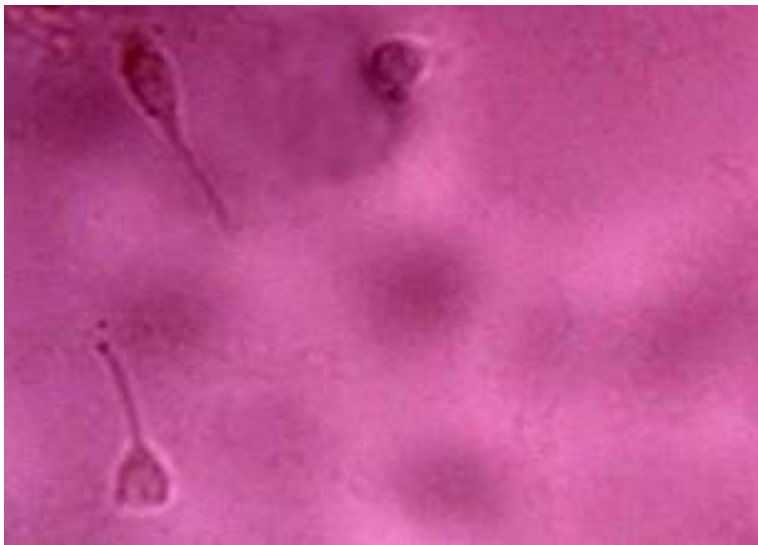
Rezultati imunocitokemijskog bojenja na PR, bili su slični kao i kod ER, samo 1-5% stanica koje su rasle na PS podlozi bilo je pozitivno na PR. Najviše stanica pozitivnih na PR bilo je na podlogama kolagena izloženog tretmanu s 1 μ M HNE-om bez i uz izlaganje 10 μ M HNE-u kroz 10 dana. Kao i kod ER, na podlozi kolagena izloženog tretmanu s 10 μ M HNE-om, bez obzira na izlaganje HNE-u, pozitivno je između 5 i 10% stanica. U te su dvije skupine brojne stanice u velikim plažama poput saća, nediferencirane, priljepljene za podlogu.

5.7.1.3. Bojanje na HER 2

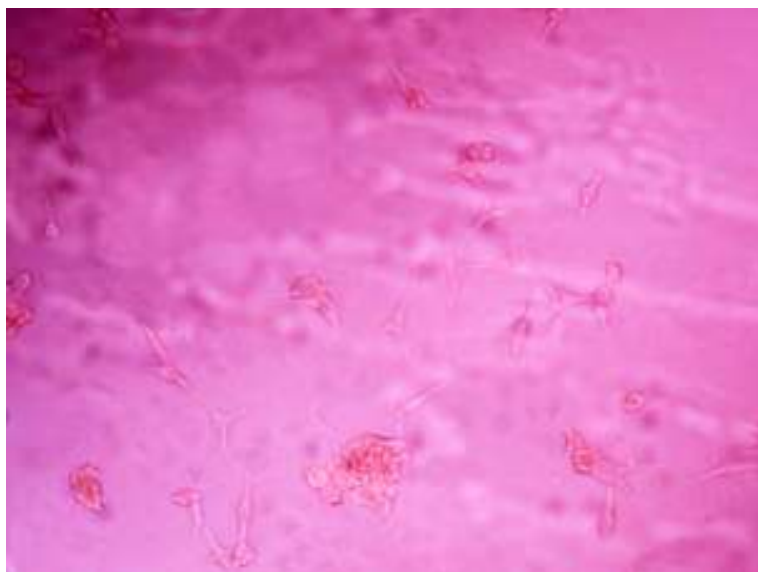
Imunocitokemijskim bojanjem na HER2 pratilo se da li su se stanice pod utjecajem različitih podloga i tretmana promijenile na način da su promijenile ekspresiju terapijski značajnog HER2. Jedna od mogućnosti terapije kod pacijentica s tumorima dojke je i terapija Herceptinom. Kako bi se vidjelo da li pacijentica može primiti ovu terapiju radi se imunohistokemijsko bojanje na HER2.

Tablica 8. Intenzitet imunocitokemijskog bojanja na HER2 membranske receptore na četiri različite podloge (polistirenskoj, kolagena, kolagena izloženog tretmanu s 1 μ M HNE-om i kolagena izloženog tretmanu s 10 μ M HNE-om). Sve su stanice podijeljene u dvije skupine, bez izlaganja HNE-u i one izložene 10 μ M HNE-u. Intenzitet je reakcije podijeljen na četiri jačine-bez reakcije (nula), slabog, srednje jakog i jakog intenziteta.

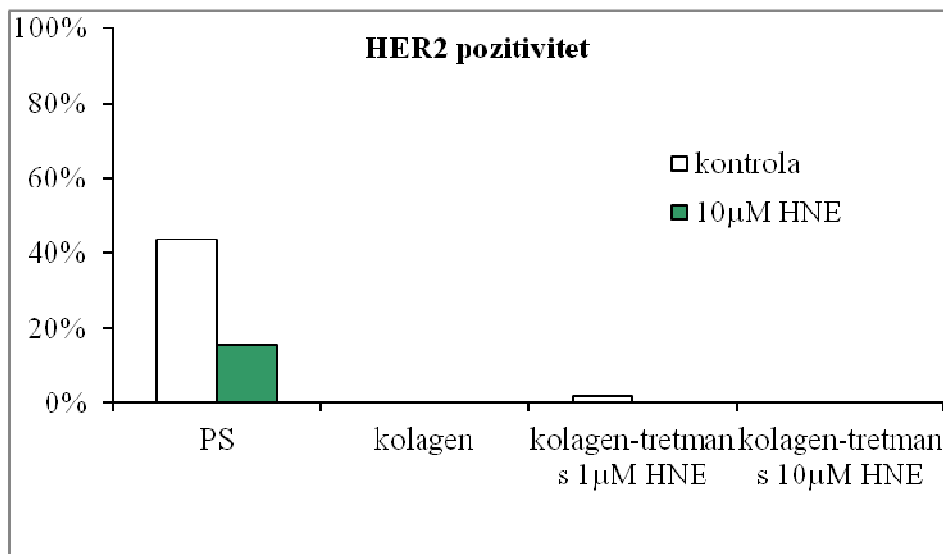
DODATAK	INTENZITET	PS	KOLAGEN	KOLAGEN + 1 μ M HNE	KOLAGEN + 10 μ M HNE
nula	nula	56,22%	98,13%	97,21%	100%
	slab	37,76%	1,87%	2,78%	0
	srednje jak	5,76%	0	0	0
	jak	0,25%	0	0	0
10 μ M HNE	nula	84,46%	100%	100%	100%
	slab	15,54%	0	0	0
	srednje jak	0	0	0	0
	jak	0	0	0	0



Slika 23. A) HER2 na PE podlozi izloženoj tretmanu s kolagenom, povećanje 40X. Stanice su pojedinačno i negativne na HER2.



Slika 23. B) HER2 na PE podlozi, povećanje 20X. Stanice su pojedinačno i u manjim nakupinama te negativne na HER2.



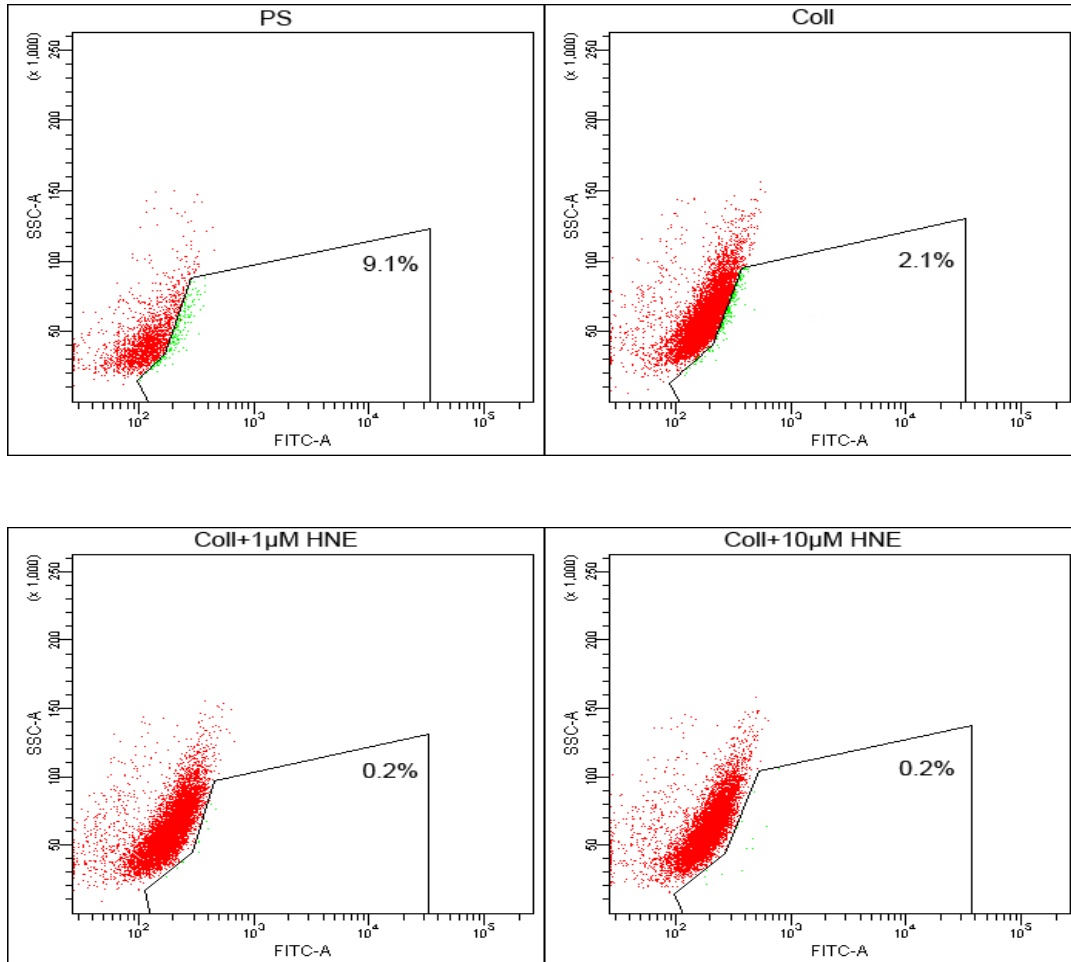
Slika 24. Imunocitokemijsko određivanje ekspresije HER2 na SUM159 stanicama uzgajanima na različitim podlogama. Najveći pozitivitet na HER2 bio je na PS podlozi. Nakon izlaganja 10 µM HNE-u količina pozitivnih stanica smanjena je za više od 50%, te je pala ispod razine od 20% ukupnog broja stanica. Na svim su ostalim podlogama bez obzira na izlaganje tretmanu s HNE-om i izlaganje HNE-u stanice negativne na HER 2.

Zanimljivo, najveći pozitivitet na HER2 bio je na PS podlozi. Nakon izlaganja 10 µM HNE-u količina pozitivnih stanica smanjena je za više od 50%, te je pala ispod razine od 20% ukupnog broja stanica. Na svim su ostalim podlogama bez obzira na tretman kolagena i izlaganje HNE-u stanice negativne na HER 2. Na plastičnoj podlozi se vidi tek po koja rijetka pojedinačna stanica te vrlo male nakupine. Na podlogama kolagena izloženog tretmanu s HNE-om stanice su pojedinačno, najviše u malim nakupinama, a pozitivno obojane stanice i u malim plažama. Na kolagenu izloženom tretmanu s 1µM HNE-om ne nalazi se pojedinačnih stanica, one su u manjim i većim nakupinama te plažama dok su stanice na kolagenu izloženom tretmanu s 10µM HNE-om u velikim plažama koje pokrivaju gotovo sva vidna polja. Reakcija na plastičnoj podlozi je u 15-30% stanica pozitivna, dok je na svim ostalim podlogama negativna.

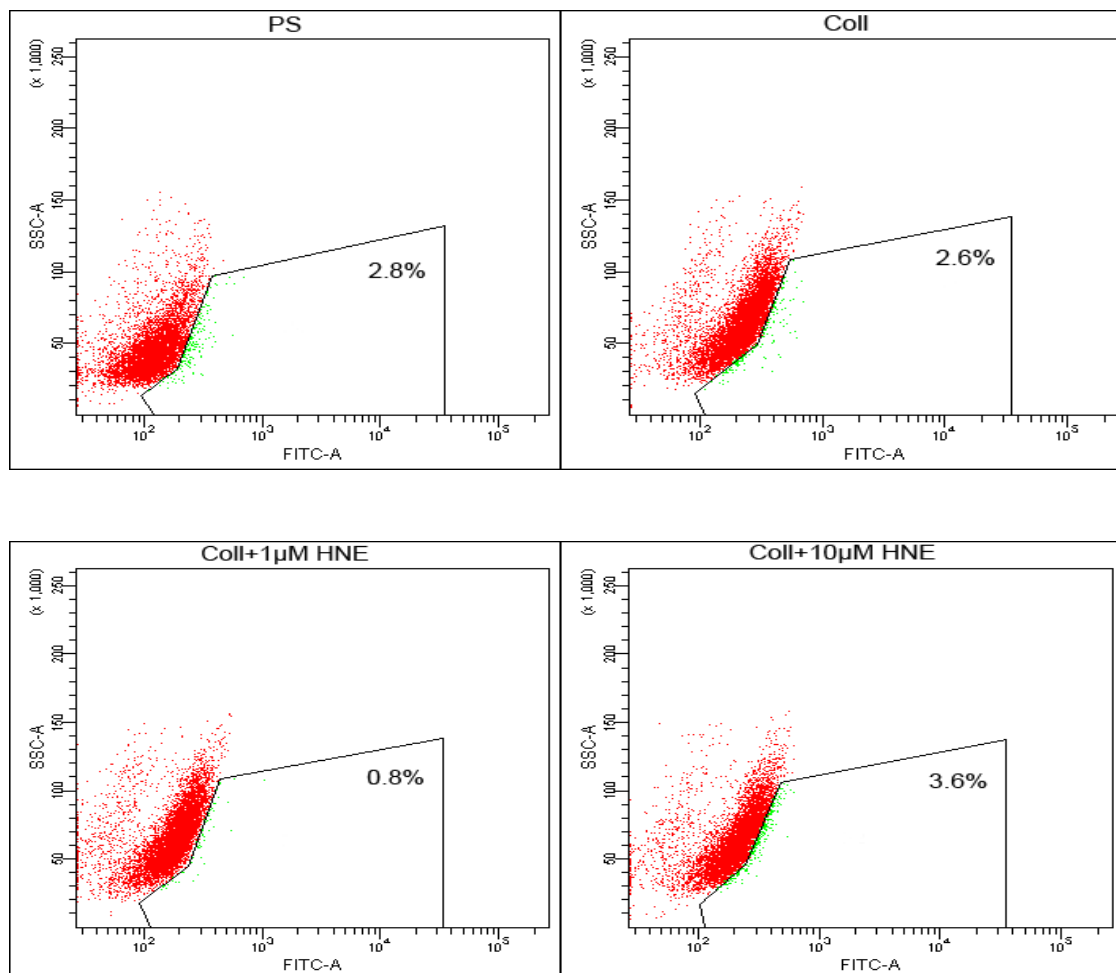
5.7.2. Određivanje markera tumorskih matičnih stanica protočnom citometrijom

ALDH (aldehid dehidrogenaza) je enzim odgovoran za detoksifikaciju intracelularnih aldehida, direktno smanjujući oštećenja u stanicama nastala oksidacijskim stresom konvertirajući produkte lipidne peroksidacije u nereaktivne karboksilne kiseline, a povezana je i s drugim mehanizmima povišene antioksidativne aktivnosti (206). Ima ulogu u ranoj diferencijaciji matičnih stanica oksidirajući retinol u retinoičnu kiselinu. Pokazano je da stanice sa ALDH aktivnošću izolirane iz tkiva dojke imaju fenotipske i funkcionalne karakteristike matičnih stanica, a Aldefluor pozitivne stanice izolirane iz humanih tumora dojke sadrže populaciju matičnih stanica karcinoma dojke. Naime, Aldefluor test služi za dokazivanje ekspresije spomenutih enzima. Pokazano je i da je ekspresija ALDH moćan prediktor lošeg kliničkog toka bolesti.

BEZ IZLAGANJA



IZLAGANJE 10 μ M HNE-u (svaki drugi dan)



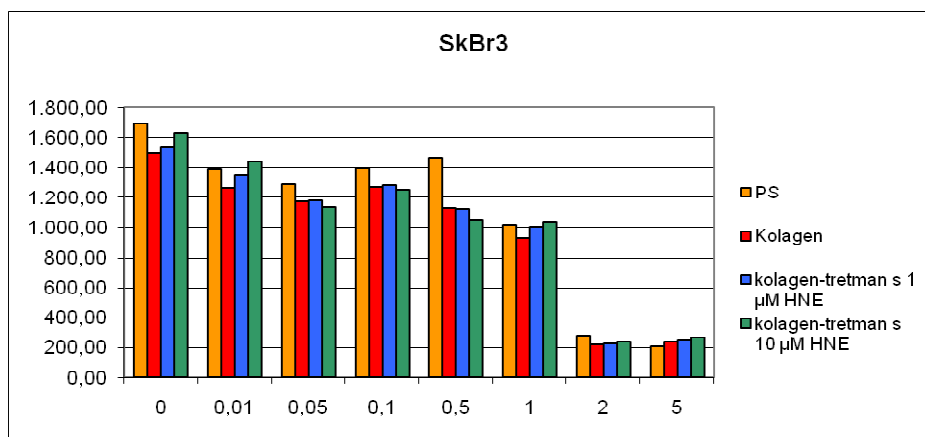
Slika 25. Mjerenjem aktivnosti ALDH vidi se njegova znatno manja razina u usporedbi sa PS podlogom. Najmanje su aktivnosti ALDH zabilježene na podlogama kolagena izloženog tretmanu s 1 i 10 μ M HNE-om bez izlaganja 10 μ M HNE-u. Na podlozi kolagena izloženog tretmanu s 10 μ M HNE-om diferenciralo se oko 10% stanica. Količina ALDH enzima u tim stanicama bez izlaganja 10 μ M HNE-u jednaka je onoj u stanicama nasadenima na kolagen izložen tretmanu s 1 μ M HNE-om.

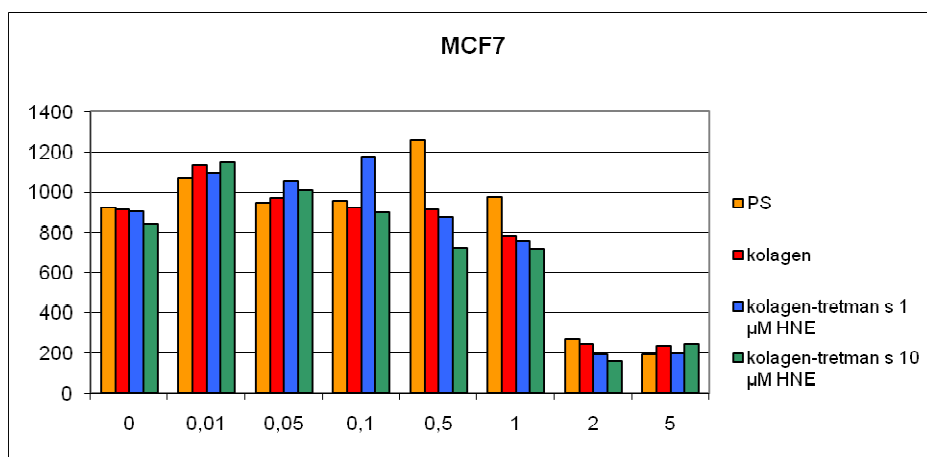
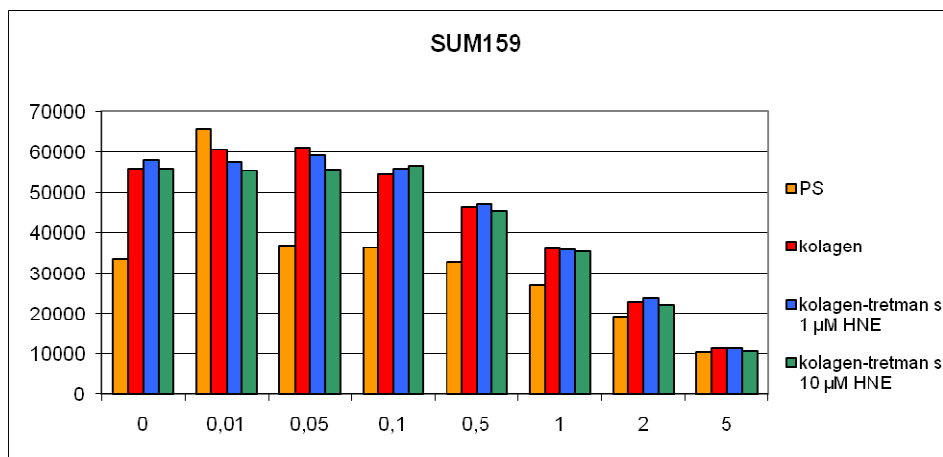
Stanice na PS podlozi se niti nakon 10 dana nisu diferencirale u smislu izražavanja ER i PR. Ekspresija je ALDH na toj podlozi znatno viša bez izlaganja HNE-u (9.1 v. 2.8%). vjerojatno zbog toga što je izlaganje HNE-u „potrošilo“ veliku količinu unutarstaničnih ALDH. Stanice nasadene na kolagen su nakon deset dana u 70% ispoljavale ER, bez obzira da li su bile izložene HNE-u, dok su više PR ispoljile bez izlaganja HNE-u (25 v. 5%). Mjerenjem aktivnosti ALDH vidi se njegova znatno manja razina u usporedbi sa PS podlogom (2.1 v. 9.1%). Najmanje su aktivnosti ALDH zabilježene na podlozi kolagena izloženog tretmanu s 1 μ M HNE-om bez izlaganja 10 μ M HNE-u, gdje je nađena i najveća razina ER. Razlike u postotku svake skupine stanica u kojima je zabilježena ALDH aktivnost na podlogama kolagena i kolagena izloženog tretmanu s 1 i 10 μ M HNE-om bez i s izlaganjem 10 μ M HNE-u je 0.5 0.4 i 3.4% veća za svaku podlogu u korist stanica izloženih 10 μ M HNE-u. Na podlozi kolagena izloženog tretmanu s 10 μ M HNE-om količina ALDH enzima bez izlaganja 10 μ M HNE-u jednaka je onoj u stanicama nasadenima na kolagen izložen tretmanu s 1 μ M HNE-om.

5.8. UTJECAJ DOKSORUBUCINA

5.8.1. Utjecaj doksorubicina na proliferaciju

Doksorubicin je kemoterapeutik koji se primjenjuje u terapiji uznapredovalog trostruko negativnog karcinoma dojke. Njegova primjena indicira nastanak oksidacijskog stresa. Kako bi se pratio utjecaj kemoterapije na matične stanice karcinoma dojke, tri linije matičnih stanica su se nasadile na predhodno pripremljene podloge. Korištene su linije stanica MCF7, SkBr3 te SUM159 te je svaka zasebno bila izložena utjecaju doksorubicina. MCF7 stanice su pozitivne na estrogenske, progesteronske receptore i p53, SkBr3 stanice su pozitivne na HER2 a linija stanica SUM159 je trostruko negativna.





Slika 26. Rezultati usporedbe tri linije stanica SUM 159, MCF7 i SkBr3 nasadene na četiri različite podloge (polistirenskoj, kolagena, kolagena izloženog tretmanu s 1 µM HNE-om i kolagena izloženog tretmanu s 10 µM HNE-om). Sve tri linije stanica izložene su različitim koncentracijama doksorubicina od 0-5 µM.

Iz rezultata su vidljive razlike kad uspoređujemo SUM 159 stanice s linijama stanica MCF7 i SkBr3.

U linijama stanica SkBr3 i MCF7 koncentracije od 2µM doksorubicina pokazale su se toksičnima dok je ta koncentracija u stanicama SUM159 ona od 5µM. Pri svim dodanim koncentracijama doksorubicina osim od 0.01 µM stanice SUM159 na PS-u su rasle upola sporije od stanica na drugim podlogama dok su u ostale dvije linije stanice podjednakog ponašanja na

svim podlogama, pa čak i uz porast proliferacije na PS-u pri određenim koncentracijama doksorubicina.

Porastom koncentracije doksorubicina primijenjenog na MCF7 stanice, vidjeli smo proliferaciju kod koncentracija od 0.01 na svim podlogama, da bi se ona smanjila pri koncentraciji od 0.05 i 0.1 na svim podlogama osim onoj izloženoj tretmanu s 1 μM HNE-om. Dodatkom 0.5 μM doksorubicina bilježimo nagli porast proliferacije na PS podlozi, dok na ostalim podlogama bilježimo pad proliferacije. Simetričan je pad proliferacije na svim podlogama, iako neznatan, prilikom dodavanja 1 μM doksorubicina. Toksičnim koncentracijama pokazale su se one od 2 i 5 μM doksorubicina pri kojima proliferacija stanica pada na $\frac{1}{4}$ početne.

U usporedbi s početnim koncentracijama, dodavanjem doksorubicina stanicama SkBr3, proliferacija je linearno padala na svim podlogama pri koncentracijama od 0.01 i 0.05 μM . Koncentracije od 0.1 dovele su do laganog porasta proliferacije na svim podlogama, a koncentracije od 0.5 i 1 μM do laganog pada. Proliferacija stanica se bilježila jedino na PS podlozi prilikom dodavanja 0.5 μM . Toksične su koncentracije kao i kod MCF7 stanica bile prilikom dodavanja 2 i 5 μM doksorubicina, pri kojima je proliferacija stanica pala na $\frac{1}{6}$ početne.

Bez dodavanja doksorubicina, stanice SUM159 su znatno više narasle na kolagenu te kolagenu izloženom tretmanu s 1 i 10 μM HNE-om u usporedbi sa PS podlogom. Uz dodatak doksorubicina od 0.01-0.1 μM , nisu se bilježile promjene proliferacije na svim podlogama osim PS-a. Dodatkom 0.01 μM doksorubicina na PS podlozi došlo je do dvostrukog porasta proliferacije, da bi dodatkom 0.05 μM on opet pao na početnu razinu i takav ostao do dodanih 0.5 μM doksorubicina, uz kojeg je došlo do linearnog pada proliferacije na svim podlogama do konačnog dodavanja 5 μM doksorubicina.

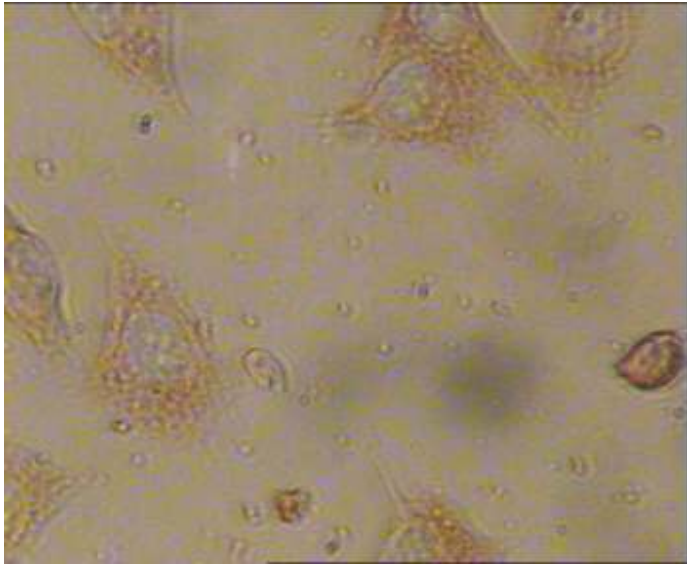
4.8.2. Rezultati imunocitokemijskog bojanja na HNE nakon izlaganja tretmanu kulture SUM159 s doksorubicinom

Tablica 9. Pozitivitet i intenzitet imunocitokemijskog bojanja na HNE na četiri različite podloge (polistirenskoj, kolagena, kolagena izloženog tretmanu s 1 μ M HNE-om i kolagena izloženog tretmanu s 10 μ M HNE-om). Stanice su izložene različitim koncentracijama doksorubicina od 0-5 μ L. Intenzitet je reakcije podijeljen na četiri jačine-bez reakcije (nula), slabog, srednje jakog i jakog intenziteta. Također je opisana morfologija stanica i obrazac rasta na svim podlogama.

DODATAK μ M DOXO	INTENZITET	PS	KOLAGEN	KOLAGEN + 1 μ M HNE	KOLAGEN + 10 μ M HNE
0	0		100%	50%	7,67%
	1			50%	4%
	2	100%			81,67%
	3				6,66%
0,01	0		100%	56,67%	32%
	1	50%		43,33%	68%
	2	50%			
	3				
0,05	0		100%	93%	35,00%
	1	50%		7%	7%
	2	50%			53,00%
	3				5%
0,1	0		100%	70,33%	43%
	1	50%		24,33%	3%
	2	50%		5,34%	7,67%
	3				46%
0,5	0	50%	100%	60%	53,67%
	1	50%		22,67%	3,67%
	2			17,33%	10%
	3				32,66%
1	0	30%	100%	83,34%	52,67%
	1	35%		16,66%	47,33%
	2	35%			
	3				
2	0	10%	100%	59,66%	42,67%
	1	70%		38,67%	57,33%
	2	20%		1,67%	
	3				
5	0	20%	100%	67,67%	13,33%
	1	70%		30,99%	83,33%
	2	10%		1,34%	3,34%
	3				

DODATAK μM DOXO	INTENZITET	PS	KOLAGEN	KOLAGEN + 1 μM HNE	KOLAGEN + 10 μM HNE
0	negativne		100%	50%	7,67%
	pozitivne	100%		50%	92,33%
0,01	negativne		100%	56,67%	32%
	pozitivne	100%		43,33%	68%
0,05	negativne		100%	93%	35%
	pozitivne	100%		7%	65%
0,1	negativne		100%	70,33%	43%
	pozitivne	100%		29,67%	57%
0,5	negativne	50%	100%	60%	53,67%
	pozitivne	50%		40%	46,33%
1	negativne	30%	100%	83,34%	52,67%
	pozitivne	70%		16,66%	47,33%
2	negativne	10%	100%	59,66%	42,67%
	pozitivne	90%		40,34%	57,33%
5	negativne	20%	100%	67,67%	13,33%
	pozitivne	90%		32,33%	86,67%

DOXO μM	PS	KOLAGEN	KOLAGEN + 1 μM HNE	KOLAGEN + 10μM HNE
0	stanice u svim bunarićima su izraziti rijetke, tek dodatkom 0.5 su u nakupinama od 4-5 stanica, a sve uz rub vidnog polja	u svim je bunarićima 70% stanica vretenasto, a 30% okruglo, pojedinačno su i u nakupinama	70% stanica vretenastih, 30% okruglih, pojedinačno i u nakupinama, pozadina je smečkasta i homogena	70% stanica vretenastih, 30% okruglih, pojedinačno i u nakupinama, pozadina je smečkasta i homogena
0.01			70% stanica vretenastih, 30% okruglih, pojedinačno i u nakupinama, pozitivne stanice uz rub bunarića negativne u sredini, pozadina je smečkasta i homogena	70% stanica vretenastih, 30% okruglih, pojedinačno i u nakupinama, jako obojane stanice uz rub bunarića, pozadina je smečkasta i homogena
0.05, 0.1, 0.5			70% stanica vretenastih, 30% okruglih, pojedinačno i u nakupinama, pozitivne stanice uz rub bunarića, negativne u sredini, pozadina je smečkasta i homogena	70% stanica vretenastih, 30% okruglih, pojedinačno i u nakupinama, jako obojane stanice uz rub bunarića, pozadina je smečkasta i homogena
1			70% stanica vretenastih, 30% okruglih, pojedinačno i u nakupinama, stanice uglavnom negativne uz rub bunarić, malo pozitivne, pozadina je smečkasta i homogena	70% stanica vretenastih, 30% okruglih, pojedinačno i u nakupinama, nema distribucije obojenja, pozadina je smečkasta i homogena
2			70% stanica vretenastih, 30% okruglih, pojedinačno i u nakupinama, po svuda ima pozitivnih stanica, i u sredini i na rubovima, pozadina je smečkasta i homogena	70% stanica vretenastih, 30% okruglih, pojedinačno i u nakupinama, nema distribucije obojenja, pozadina je smečkasta i homogena
5			70% stanica vretenastih, 30% okruglih, pojedinačno i u nakupinama, po svuda ima pozitivnih stanica, i u sredini i na rubovima, pozadina je smečkasta i homogena	70% stanica vretenastih, 30% okruglih, pojedinačno i u nakupinama, nema distribucije obojenja, pozadina je smečkasta i homogena



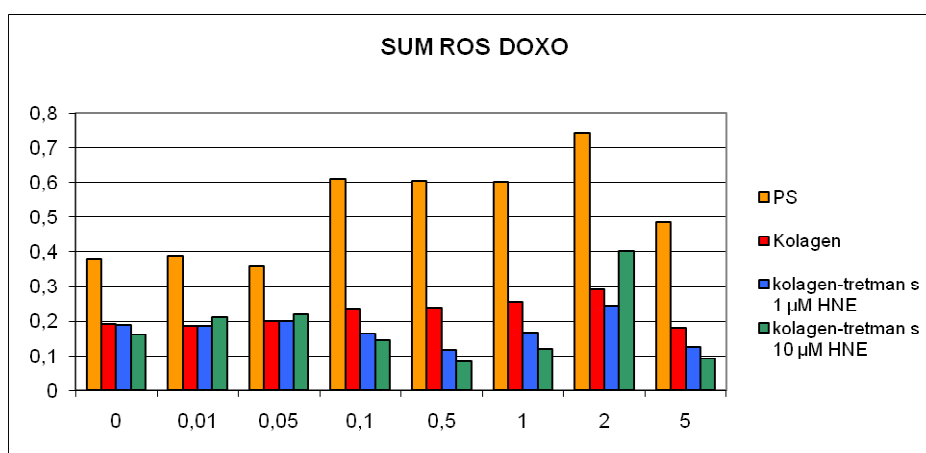
Slika 27. Podloga kolagena izloženog tretmanu s $1\mu\text{M}$ HNE-om uz dodatak $0,5\mu\text{M}$ DOXO, povećanje 40X. Stanice su okruglaste, pojedinačne i u malim nakupinama, slabo pozitivne na HNE.



Slika 28. Podloga kolagena izloženog tretmanu s $1\mu\text{M}$ HNE-om uz dodatak $1\mu\text{M}$ DOXO, povećanje 40X. Stanice su okruglaste i vretenaste, pojedinačne i negativne na HNE.

5.8.3. Utjecaj doksorubicina na stvaranje ROS-a

Nakon nasađivanja stanica na podloge PS-a, kolagena te kolagena izloženog tretmanu s HNE-om, stanice su izložene različitim koncentracijama doksorubicina te se pratio nastanak intracelularnih ROS-ova. Poznato je da doksorubicin izaziva stvaranje oksidacijskog stresa. Iz pokusa je vidljiva količina ROS-ova koju različite koncentracije doksorubicina izazivaju u matičnim stanicama karcinoma dojke.



Slika 29. Utjecaj dokсорubicina na stvaranje ROS-ova na SUM159 stanicama nasađenima na četiri različite podloge (polistirenskoj, kolagena, kolagena izloženog tretmanu s 1 μM HNE-om i kolagena izloženog tretmanu s 10 μM HNE-om). Stanice su izložene različitim koncentracijama dokсорubicina od 0-5 μM.

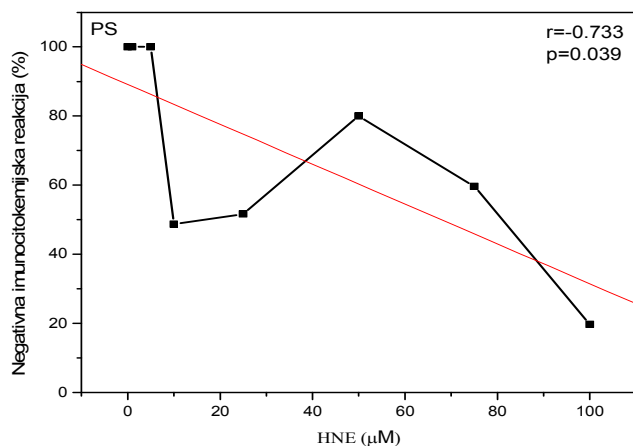
Iz dobivenih je rezultata vidljivo da se znatno veća količina ROS-ova stvarala u stanicama nasađenima na PS podlogu (2 do 3 puta veće koncentracije). Jednaka je količina ROS-ova nastala u stanicama na PS podlozi nakon izlaganja koncentracijama od 0-0.05 μM dokсорubicina, porasla je za 1/3 nakon izlaganja koncentracijama od 0.1-1, opet porasla kod koncentracije dokсорubicina od 2 μM, te zabilježila pad prilikom izlaganju 5 μM dokсорubicinu. Stanice nasađene na preostale 3 podloge nisu bilježile promjene u stvaranju ROS-ova do koncentracije od 0.1 i 0.5 μM, pri kojima se vidio pad na podlogama izloženima tretmanu s kolagenom. Stanice koje su nasađene na podloge kolagena već izloženog tretmanu s HNE-om imale su vremena razviti antioksidacijske mehanizme te brže metabolizirati ROS-e. Prilikom dodavanja

koncentracija doksorubicina od 1 i 2 μM bilježilo se povećanje intracelularnih ROS-ova vjerojatno zbog iscrpljivanja unutarstaničnih obrambenih mehanizama. Ako usporedimo dobivene rezultate s rezultatima timidinskog testa vidimo podudarnost u obrascu ponašanja stanica, naime stanice na PS podlozi su se upola sporije dijelile od ostalih stanica zbog vjerojatno duplo viših koncentracija reaktivnih kisikovih spojeva koji su djelovali inhibitorno.

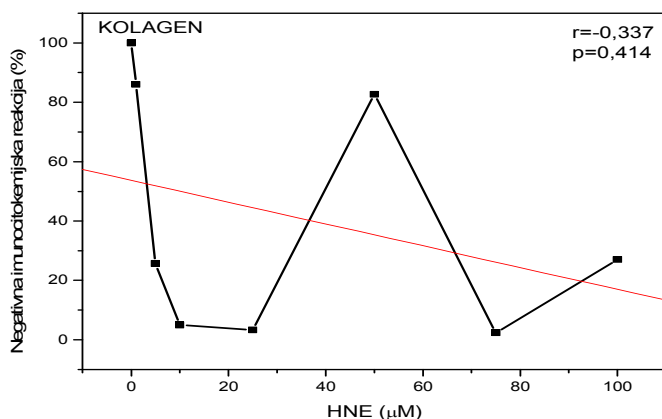
Također vidimo da je dodavanjem 2 μM doksorubicina došlo do značajnog pada proliferacije stanica, vidljivo u rezultatima pokusa s timidinom, a mjerenjem ROS-ova bilježio se značajan porast njihove koncentracije. Dodavanjem 5 μM doksorubicina koje su već toksične za stanice došlo je do pada intracelularnih ROS-ova, vjerojatno zbog toksičnih ireverzibilnih promjena na staničnoj membrani dijela stanica te „curenju“ ROS-ova izvan stanica.

6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

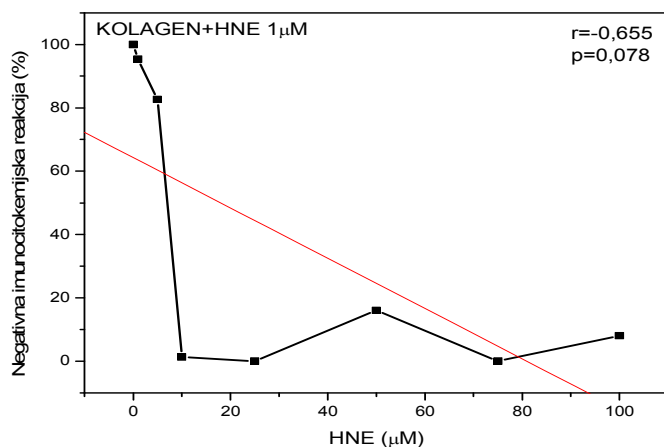
6.1. POVEĆANJEM KONCENTRACIJA HNE-A, SMANJUJE SE BROJ NEGATIVNIH IMUNOCITOKEMIJSKIH REAKCIJA.



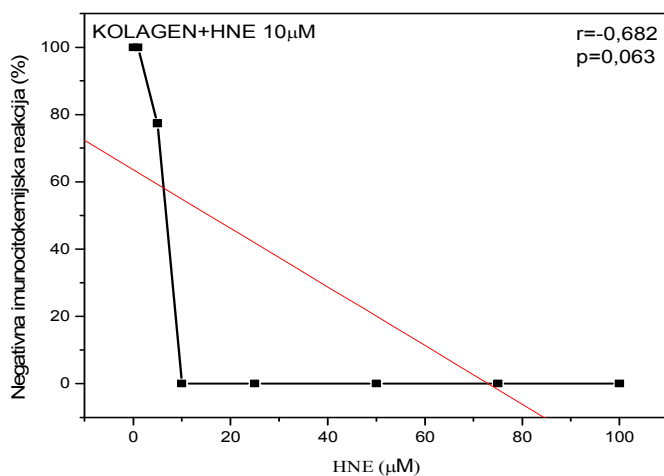
Slika 30. Linearna korelacija negativne imunocitokemijske reakcije i koncentracije HNE-a za PS. Porastom koncentracije HNE-a (0,1,5,10,25,50,100 μM), smanjuje se postotak negativnih imunocitokemijskih reakcija za PS. Korelacija je negativna $r=-0,733$ i statistički značajna $p=0,039$.



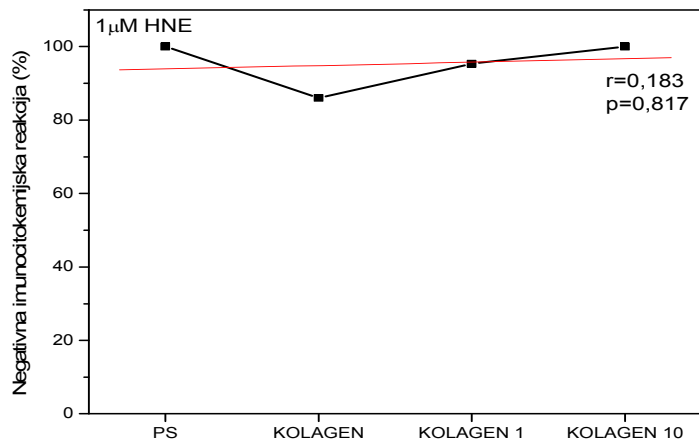
Slika 31. Linearna korelacija negativne imunocitokemijske reakcije i koncentracije HNE-a za kolagen. Porastom koncentracije HNE-a (0,1,5,10,25,50,100 μM), smanjuje se postotak negativnih imunocitokemijskih reakcija za kolagen. Korelacija je negativna $r=-0,337$ i statistički nije značajna $p=0,414$.



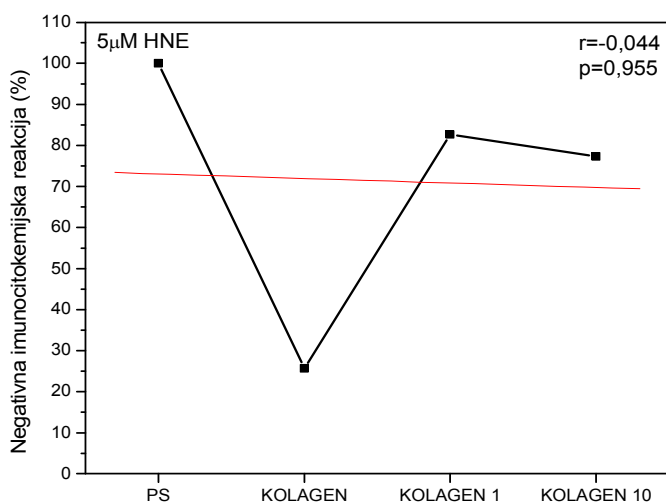
Slika 32. Linearna korelacija negativne imunocitokemijske reakcije i koncentracije HNE-a za kolagen. Porastom koncentracije HNE-a (0,1,5,10,25,50,100 μM), smanjuje se postotak negativnih imunocitokemijskih reakcija za kolagen+HNE 1μM. Korelacija je negativna $r=-0,655$ i statistički nije značajna $p=0,078$.



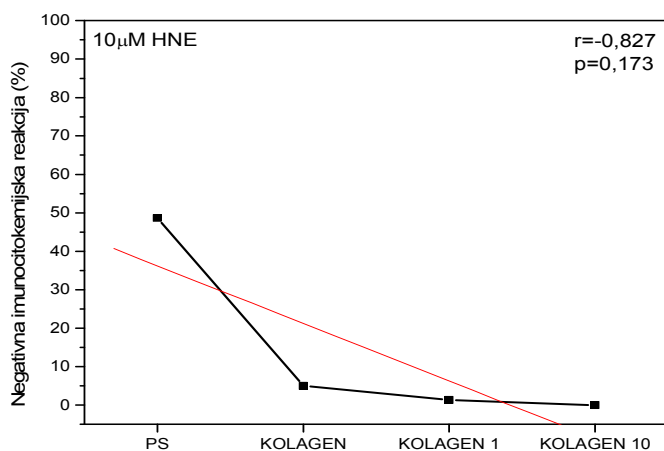
Slika 33. Linearna korelacija negativne imunocitokemijske reakcije i koncentracije HNE-a za kolagen. Porastom koncentracije HNE-a (0,1,5,10,25,50,100 μM), smanjuje se postotak negativnih imunocitokemijskih reakcija za kolagen+HNE 10μM. Korelacija je negativna $r=-0,682$ i statistički nije značajna $p=0,063$.



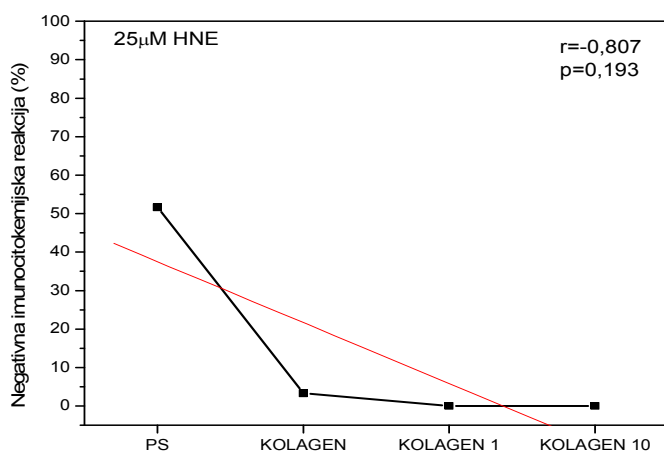
Slika 34. Linearna korelacija negativne imunocitokemijske reakcije i 1 μ M HNE-a dodane podlogama: PS, kolagen, kolagen + 1 μ M HNE, kolagen + 10 μ M HNE. Korelacija je $r=0,183$ i statistički nije značajna $p=0,817$.



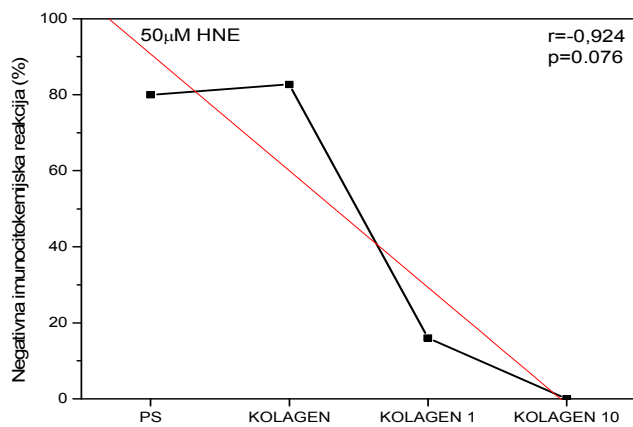
Slika 35. Linearna korelacija negativne imunocitokemijske reakcije i 5 μ M HNE-a dodane podlogama: PS, kolagen, kolagen + 1 μ M HNE, kolagen + 10 μ M HNE. Korelacija je negativna $r=-0,044$ i statistički nije značajna $p=0,955$.



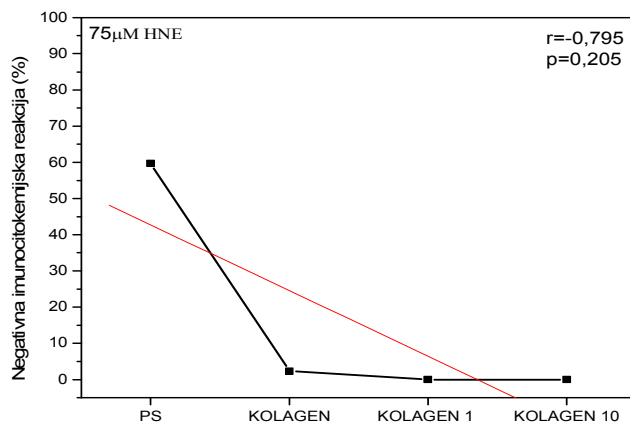
Slika 36. Linearna korelacija negativne imunocitokemijske reakcije i 10µM HNE-a dodane podlogama: PS, kolagen, kolagen + 1µM HNE, kolagen + 10µM HNE. Korelacija je negativna $r=-0,827$ i statistički nije značajna $p=0,173$.



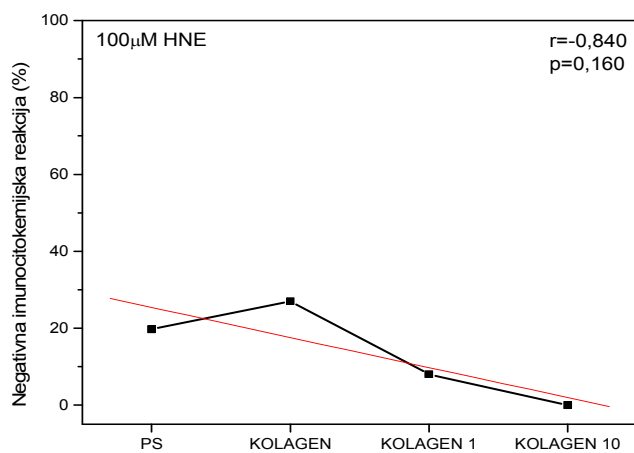
Slika 37. Linearna korelacija negativne imunocitokemijske reakcije i 25µM HNE-a dodane podlogama: PS, kolagen, kolagen + 1µM HNE, kolagen + 10µM HNE. Korelacija je negativna $r=-0,807$ i statistički nije značajna $p=0,193$.



Slika 38. Linearna korelacija negativne imunocitokemijske reakcije i 50µM HNE-a dodane podlogama: PS, kolagen, kolagen + 1µM HNE, kolagen + 10µM HNE. Korelacija je negativna $r=-0,924$ i statistički nije značajna $p=0,076$.

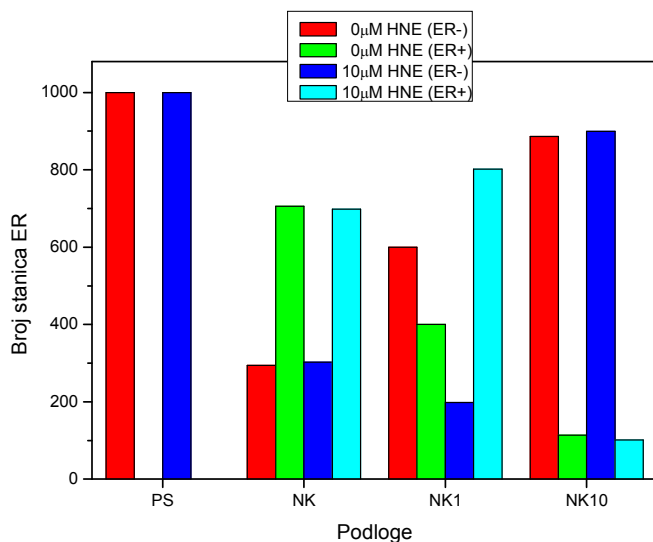


Slika 39. Linearna korelacija negativne imunocitokemijske reakcije i 75µM HNE-a dodane podlogama: PS, kolagen, kolagen + 1µM HNE, kolagen + 10µM HNE. Korelacija je negativna $r=-0,795$ i statistički nije značajna $p=0,205$.

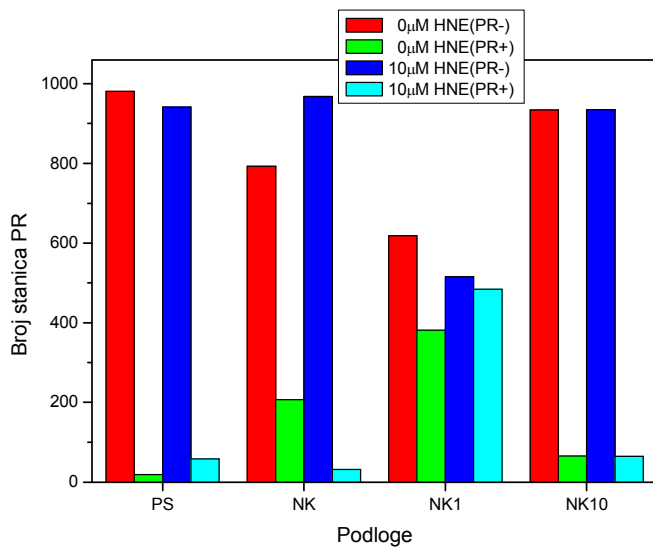


Slika 40. Linearna korelacija negativne imunocitotoksijske reakcije i 100 μ M HNE-a dodane podlogama: PS, kolagen, kolagen + 1 μ M HNE, kolagen + 10 μ M HNE. Korelacija je negativna $r = -0,840$ i statistički nije značajna $p = 0,160$.

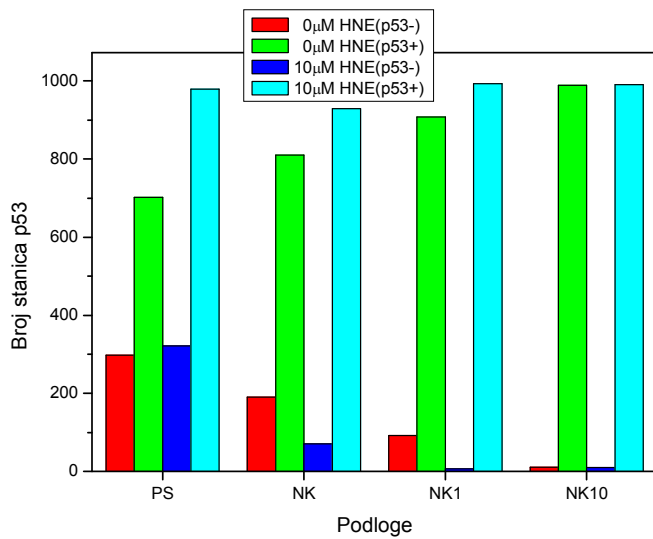
6.2. IZRAŽAJNOST ER, PR I P53 NA PODLOGAMA PS, KOLAGENA, KOLAGENA IZLOŽENOG TRETMANU S 1 I 10 μ M HNE-OM



Slika 41. Zastupljenost ER- i ER+ stanica na podlogama PS, kolagen (NK), kolagen +1 μ M HNE (NK1), kolagen +10 μ M HNE (NK10). Postoji statistički značajna razlika izražajnosti skupina ER- i ER+ stanica između svih podloga 0 μ M HNE (crveno-zelene skupine, $p < 0,001$). Postoji statistički značajna razlika izražajnosti skupina ER- i ER+ stanica između svih podloga izloženih tretmanu s 10 μ M HNE (tamnoplavo-tirkizne skupine, $p < 0,001$). Između skupina s 0 μ M HNE (crveno-zelene) i skupina s 10 μ M HNE (tamnoplavo-tirkizne) nema statistički značajnih razlika, osim u skupini kolagen +1 μ M HNE ($p < 0,001$).

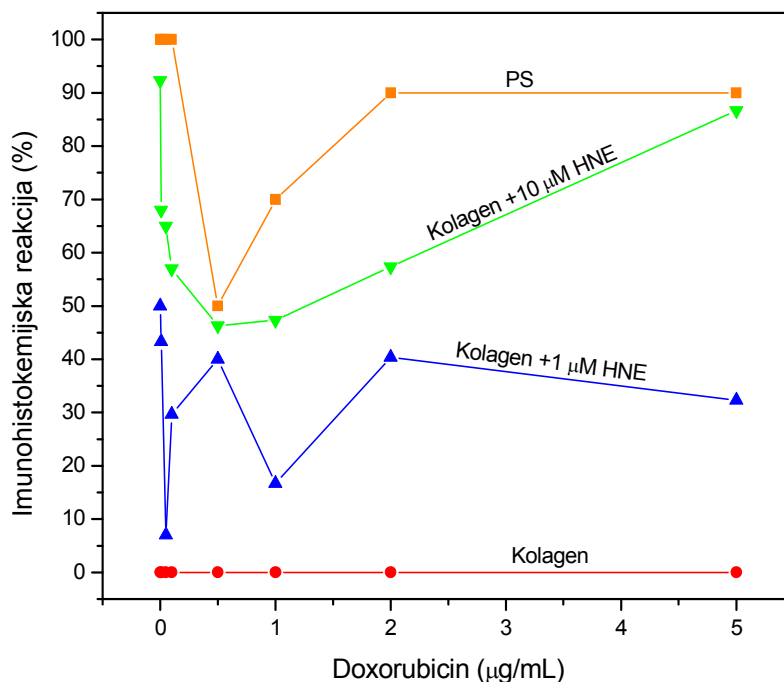


Slika 42. Zastupljenost PR- i PR+ stanica na podlogama PS, kolagen (NK), kolagen +1 µM HNE (NK1), kolagen +10 µM HNE (NK10). Postoji statistički značajna razlika izražajnosti skupina PR- i PR+ stanica između svih podloga 0µM HNE (crveno-zelene, $p < 0,001$). Postoji statistički značajna razlika izražajnosti skupina PR- i PR+ stanica izloženih tretmanu s 10µM HNE (tamnoplavo-tirkizne) između većine podloga ($p < 0,001$), osim između podloga PS i NK 10 ($p < 0,344$). Između skupina sa 0µM HNE (crveno-zelene) i skupina s 10µM HNE (tamnoplavo-tirkizne) postoji statistički značajne razlika na svim podlogama ($p < 0,001$), osim NK10 ($p < 0,899$).



Slika 43. Zastupljenost p53- i p53+ stanica na podlogama PS, kolagen (NK), kolagen +1 μM HNE (NK1), kolagen +10 μM HNE (NK10). Postoji statistički značajna razlika izražajnosti skupina p53- i p53+ stanica između svih podloga 0 μM HNE ($p < 0,001$). Postoji statistički značajna razlika izražajnosti skupina p53- i p53+ stanica izloženih tretmanu s 10 μM HNE između PS i NK podloga ($p < 0,001$), a ne postoji između podloga NK1 i NK10 ($p < 0,344$). Između skupina s 0 μM HNE (crveno-zelene) i skupina s 10 μM HNE (tamnoplavo-tirkizne) postoji statistički značajne razlika na svim podlogama ($p < 0,001$), osim NK10 ($p < 0,762$).

6.3. KRATKOTRAJNA KULTURA SUM159 UZ DODATAK DOKSORUBICINA



Slika 44. Imunohistokemijska reakcija kulture stanica SUM159 nasadene na polistiren (PS), kolagen, kolagen + HNE 1µM, te kolagen + HNE 10 µM. Stanice su na sve četiri podloge izložene doksorubicinu od 8 koncentracija: 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, i 5µg/mL.

Stanice na podlozi kolagena nisu uopće reagirale. Dodatkom HNE 1µM reakcije su bile ispod linije od 50%, a dodavanjem HNE 10µM, iznad linije od 50%. Krivulje HNE 1µM i HNE 10µM statistički se značajno razlikuju (t-test:t = -4,145; df=14; p<0,001; 95% CI -49,440 do -15,725). Na podlozi PS zabilježena je jaka pozitivna imunohistokemijska reakcija.

7. RASPRAVA

Jedan od bitnih čimbenika koji utječe na sudbinu matičnih stanica karcinoma dojke je i njihov mikrookoliš, odnosno niša u koju se smještaju. Okoliš (niša) matičnih stanica po definiciji je onaj koji ih okružuje, održava zametnima i sprječava njihovu diferencijaciju. Njega, osim samih zametnih stanica, čine i okolne stanice sa svim signalima koje luče te karakteristični ekstracelularni matriks (132).

U ovom istraživanju analiziran je utjecaj ekstracelularnog matriksa (kolagena I) i oksidacijskog stresa (HNE-a i H₂O₂) na rast i diferencijaciju matičnih stanica karcinoma dojke. Radilo se na staničnoj liniji SUM159 karcinoma dojke. Stanice su uzgajane na podlogama oksidiranog i neoksidiranog (nativnog) kolagana te su izložene tretmanima s različitim koncentracijama HNE-a i H₂O₂. Praćen je njihov rast u toku 10 dana te diferencijacija stanica u vidu ekspresije hormonskih receptora (ER, PR), HER-2 te p53. Također, proučavana je toksičnost kemoterapeutika doksorubicina na matičnim stanicama karcinoma dojke u odnosu na različite podloge te količina stvorenog intracelularnog HNE-a, kao i učinak doksorubicina na proliferaciju stanica. Određivan je marker matičnih stanica ALDH protočnom citometrijom.

Karcinom dojke najčešće je sijelo karcinoma žena u svijetu ako izuzmemo nemelanotični karcinom kože te je drugi vodeći uzročnik smrti od karcinoma (nakon karcinoma debelog crijeva). Prema podacima Američkog društva za rak (American Cancer Society) za 2009. godinu bilo je dijagnosticirano 211731 novooboljelih žena, te oko 40676 smrtnih slučajeva.

Prema podacima tog istog Društva incidencija karcinoma dojki je pala za 2% između 1998. i 2007., ali samo u skupinama žena iznad 50 godina. Sve je više novooboljelih mladih žena kod kojih je tok bolesti znatno agresivniji (207).

Prema zadnjim objavljenim podacima za Hrvatsku 2010, a prema biltenu Hrvatskog Zavoda za javno zdravstvo za tu godinu, iz podataka Registra za rak, te godine je registrirano 2492 novooboljelih žena od karcinoma dojke. Mortalitet u Hrvatskoj iznosi 43/100000, a incidencija (učestalost) 109/100000. Karcinom dojke čini 26% svih karcinoma kod žena i daleko je najčešće sijelo karcinoma. Karcinom dojke je u Hrvatskoj najčešći uzrok smrti od karcinoma u žena, te najčešći pojedinačni uzrok smrti općenito u žena u dobi 35-64 godine (208). Iako je identificiran niz genetskih i okolišnih faktora koji utječu na rizik za nastanak karcinoma dojke, etiologija još

nije u potpunosti razjašnjena i još uvijek nema učinkovitih metoda za primarnu prevenciju, a porast incidencije bilježi se kako u manje razvijenim, tako i u najrazvijenijim zemljama svijeta.

Za praćenje zloćudnog potencijala karcinoma dojke, planiranje kirurške i postoperativne terapije i praćenja bolesnika, danas se koriste brojni pokazatelji vezani za bolesnika kao što su dob, hormonski status te pokazatelji vezani za tumor: veličina tumora, multicentričnost, histološka slika, tip tumora (prema WHO klasifikaciji), histološki gradus (I-III), status hormonskih receptora (ER i PR), HER2 status (IHC, CISH, FISH), limfovaskularna invazija te određivanje statusa limfnih čvorova aksile (209).

Poznavanje i ekstenzivna analiza gore navedenih pokazatelja rezultirala je prognostičkim sustavom koji omogućuje raspodjelu bolesnika s karcinomima dojke u nekoliko kategorija. Pokazalo se da su hormonski pozitivni tumori, koji su češći kod bolesnica starije životne dobi, indolentnijeg tijeka, odgovaraju na hormonoterapiju.

Amplifikacija ili pretjerana izraženost gena HER2/neu ukazuje na agresivniji fenotip i lošiju prognozu.

Uvedeni su podtipovi raka dojke bazirani na patohistološkom nalazu, a prema kojima se određuje daljnja terapija i prognoza:

LUMINALNI TIP A (ER i/ili PR+, HER2/neu-) je najčešći, najmanje agresivan tip

LUMINALNI TIP B (ER i/ili PR+, HER2/neu+) ima lošiju prognozu od luminalnog tipa A

HER2 OVISAN je manje čest ali izrazito opasan podtip. Ishod poboljšava primjena ciljane terapije usmjerene na HER2/neu.

BASAL-LIKE PODTIP (trostruko negativni, CK5/6+ i/ili EGFR+) je izrazito agresivan podtip, prognoza je loša, a tijek bolesti agresivan.

Osnovna razlika između karcinoma dojke i ostalih karcinoma je to što krivulje preživljavanja kod bolesnica s karcinomom dojke dosežu plato nakon 7- 10 godina (ovisno o stadiju bolesti i obliku liječenja) dok krivulje preživljavanja kod većine drugih karcinoma dosežu plato nakon 2- 5 godina (29).

Zaključak je da postoji vrsta tumorskih stanica otpornih na primarnu terapiju, sa sposobnošću „skrivanja“ i mirovanja unutar tijela, neotkrivenih tijekom dugog perioda vremena te sposobnih da u određenom trenutku uzrokuju rekurenciju bolesti. Istraživanja su dovela do otkrića matičnih tumorskih stanica koje zbog svojih sposobnosti samoobnavljanja, mobilnosti i rezistentnosti na kemo i radioterapiju, „miruju“ u organizmu te se nakon nekog vremena iz još nepoznatih razloga

aktiviraju te uzokuju recidiv bolesti. Zadnjih se 20-ak godina matične tumorske stanice intenzivno istražuju. Najbolje su proučene matične hematopoetske stanice, koje su i prve otkrivene a na kojima se bazira transplantacija koštane srži (30). Zadnjih 10-ak godina pručavaju se matične stanice karcinoma dojke. Do danas je objavljeno malo eksperimentalnih radova na tom području i zbog toga je ovaj rad bitan, a rezultati rada će biti još jedan korak naprijed u razumijevanju ove teške bolesti.

U prvom se dijelu istraživanja htjelo vidjeti kako na strukturu i funkciju kolagena I, kao osnovne komponente ekstracelularnog matriksa, utječu matične tumorske stanice te oksidacijski stres, na čijem se učinku baziraju radio i kemoterapija. Tretman hidroksilnim radikalom, kao najreaktivnijim slobodnim radikalom kisika, a generiranim Fentonovom reakcijom iz vodikovog peroksida i željeznog sulfata, bio je korišten za oksidativnu modifikaciju kolagena. Kolagen modificiran tako dobivenim hidroksidnim radikalom pokazao je 2 denaturacijske tranzicije s pomakom temperature denaturacije. Analizom cirkularnog dikroizma vidljivo je da je oksidacijski tretman uzrokovao značajne strukturalne promjene na molekuli kolagena, gubitak otprilike 70% nativne strukture. Također, opažen je djelomični gubitak topivosti pri ovoj promjeni. Iako nisu do kraja razjašnjene strukturalne promjene koje uzrokuju tranziciju, izgleda da je pretranzicija uzrokovana isključivo oksidacijom kolagena. U našim pokusima nemodificirani uzorak, nativni kolagen, također je pokazao blage pretranzicijske promjene. Te su promjene vjerojatno posljedica kvalitete početnog materijala, postupka izolacije, uvjeta pohranjivanja sirovog materijala ili prethodnog izlaganja tretmanu, te vrlo lako mogu simulirati prirodne utjecaje na kolagen. Iz objavljenih je radova pokazano da oksidacija dovodi do smanjenja sadržaja amino-nitrogena tj. do modifikacije epsilon-amino grupa ostataka lizin aminokiselina. Ta je pojava analogna fiziološkom procesu starenja koji se bazira na oksidaciji lizina. Stvaraju se visoko reaktivni aldehidi koji pokreću kaskadu brojnih unutar i međumolekularnih veza. U našim je pokusima također primjećena slabija topljivost kolagena nakon takvog izlaganja tretmanu, što indirektno potvrđuje opisane fiziološke procese. Poznato je da je hidroksilni radikal izrazito agresivan, te nedvojbeno utječe na promjene na proteinima unutar istog medija. Iz pokazanog denaturacijskog profila nemodificiranog i oksidacijski modificiranog kolagena jasno je vidljivo da je imao učinak na velik dio kolagena.

Kako bi se istražila specifičnost promjena značajki rasta stanica na oksidiranom kolagenu, ispitana je vijabilnost stanica na kolagenu, koji je modificiran hidroksilnim radikalom

generiranim Fentonovom reakcijom, uz dodatak HNE-a pomoću MTT testa. Vidljivo je da je dodavanjem niskih koncentracija, HNE stimulirao metaboličku aktivnost tumorskih matičnih stanica. To su potvrdila dosadašnja istraživanja o aktivaciji obrambenih mehanizama stanica koje su izložene niskim koncentracijama HNE-a. Djelovanjem na signalne puteve i transkripcijske faktore, HNE potiče svoju detoksifikaciju i stimulira stanični rast. Pri većim koncentracijama, HNE uz inhibiciju enzima izaziva apoptozu stanica, oštećuje proteine, degradira ih i uzrokuje njihovo nakupljanje te posljedično uzrokuje smrt stanica (43). Ovim smo pokusima pokazali da se opisani mehanizam djelovanja može primjeniti i na matične tumorske stanice. Poznato je da kolagen preko faktora rasta (EGF i IGF-1) (124) djeluje na proliferaciju stanica u normalnoj dojci. *In vitro* pokusi na normalnim epitelnim i mioepitelnim stanicama tkiva dojke i na staničnim linijama karcinoma dojke izvedenima na podlogama presvučenima kolagenom pokazala su da je u normalnim stanicama došlo do proliferacije i formiranja duktusa a u kulturama tumorskih stanica do njihove proliferacije (129-130). Naši pokusi su pokazali da je kolagen izložen tretmanu s HNE-om povećao vijabilnost tumorskih matičnih stanica. U usporedbi s pokusima u kojima su stanice rasle na kolagenu bez prethodnog tretmana, ovdje se vidjelo da je metabolička aktivnost stanica ipak veća nakon dodavanja istih koncentracija HNE-a u medij ako je kolagen prethodno bio izložen tretmanu s HNE-om (u koncentracijama HNE-a od 1 i 10 μM), a da je metabolička aktivnost stanica bila jednaka u stanicama na kolagenu bez prethodnog tretmana i na kolagenu izloženom tretmanu sa 100 μM HNE-a. S obzirom da aldehidi imaju šire područje djelovanja od slobodnih radikala jer difundiraju, vjerojatno djeluju proliferativno na tumorske matične stanice koje su u direktnom kontaktu s kolagenom i ako je on prethodno izložen tretmanu HNE-om.

Brojna su istraživanja pokazala da HNE stabilizira proteine tj. stvara s njima stabilne biološke konjugate (165-167) kao i da HNE potiče sintezu kolagena (168-170). Naši rezultati potvrđuju rezultate prethodnih istraživanja jer bez obzira na povišenje koncentracija HNE-a kojima je izložen kolagen (sve do velikih koncentracija od 100 μM) metabolička je aktivnost, a najvjerojatnije i broj matičnih tumorskih stanica ostao isti ili je laganom porastu. Također je vidljivo da je metabolička aktivnost stanica na kolagenu bez prethodnog tretmana manja uz izlaganje većim koncentracijama (50-100 μM) HNE-a mediju nego metabolička aktivnost stanica na kolagenu izloženom tretmanu (1-100 μM HNE-a).

Iz ovih je pokusa vidljivo da na sudbinu matičnih stanica ne utječe oksidiranost kolagena čak niti pri toksičnim koncentracijama, već količina dodanog egzogenog HNE-a.

U pokusu u kojem je bio korišten hidroksilni radikal, generiran Fentonovom reakcijom, za oksidaciju kolagena, umjesto HNE-a, uspoređivana je vijabilnost na podlogama polistirena, kolagena i oksidiranog kolagena u ovisnosti o djelovanju HNE-a. U usporedbi s PS-om, kolagen je povećao vijabilnost stanica te je suprimirao citotoksičnost HNE-a. Ti su se stimulirajući i zaštitni učinci kolagena izgubili nakon njegove oksidacije. Tretman HNE-om stanica na oksidiranom kolagenu rezultirao je značajnim smanjenjem njihove vijabilnosti, kao i u skupini stanica koje su rasle na PS podlozi, dok je oksidirani kolagen smanjio vijabilnost stanica u usporedbi s kolagenom. Ove rezultate podržali su rezultati analize stanične morfologije. Za pretpostaviti je da je kolagen vezao HNE i time smanjio njegov citotoksični učinak. Osnovna je karakteristika HNE-a veliki afinitet vezanja na aminokiseline, prvenstveno histidin, lizin, arginin i cistein (158-160). Na taj bi se način smanjila mogućnost HNE-a da se veže na tumorske stanice i reducira njihovu vijabilnost. Kako bi se to dalje istražilo učinjena je dot-blot analiza na HNE-histidinske konjugate na podlogama kolagena i oksidiranog kolagena. Neočekivano, rezultati su pokazali da je oksidirani kolagen imao više HNE-proteinskih konjugata nego obični kolagen. Kako bi se to dalje istražilo, učinjeno je imunocitokemijsko bojanje na HNE-histidinske konjugate na stanicama nasadenima na podloge kolagena i oksidiranog kolagena uz izlaganje HNE-u. Rezultati su pokazali više HNE pozitivnih stanica na podlozi oksidiranog kolagena, što objašnjava njihovu smanjenu vijabilnost na ovoj podlozi.

S druge strane, izloženost HNE-u nije značajno utjecala na rast stanica na kolagenu, iz čega je za pretpostaviti da je oksidacijski modificiran kolagen nakon tretiranja hidroksilnim radikalom, generiranim Fentonovom reakcijom, ušao u lančanu reakciju oksidacije, što je vjerojatno utjecalo na njegov afinitet prema HNE-u, ako ne i masnim kiselinama. Te je pretpostavke potrebno dalje istražiti kako bi se razjasnio mehanizam interakcije produkata lipidne peroksidacije i kolagena na rast matičnih stanica karcinoma dojke.

Bitno je napomenuti da bi HNE mogao utjecati ne samo na citotoksičnost aldehida već i na rast stanica. Poznato je da je utjecaj HNE-a na rast stanica ovisan o njegovoj koncentraciji, utječe na autokrine i parakrine puteve regulacije rasta i staničnog odgovora na stres. S obzirom da učinci HNE-a ovise o intenzitetu njegovog vezanja na proteine, za pretpostaviti je da HNE također mijenja strukturu i funkciju proteina ekstracelularnog matriksa, prvenstveno kolagena. Ako je ta

pretpostavka točna, mogao bi utjecati na stanice direktno vezanjem na membranske proteine i indirektno mijenjajući proteine mikrookoliša.

Kako bi se vidjelo da li vodikov peroksid utječe na vijabilnost matičnih, stanice su nasadene na četiri različite podloge kao i u prvim pokusima i izložene rasponu koncentracija vodikovog peroksida do 200 μM , ali nije zabilježeno značajnijih promjena u vijabilnosti niti nakon najvećih doza H_2O_2 .

Nadalje, proučavan je utjecaj akutnog stresa na proliferaciju stanica, a mjeren je timidinskim testom.

U usporedbi s MTT testom na istoj staničnoj liniji vidljivo je da su se stanice nakon izlaganja 50 μM i više HNE-a potpuno prestale dijeliti na svim podlogama, dok je MTT testom na tim istim stanicama vidljivo da su one bile još vijabilne, tj. da je postojala metabolička aktivnost čak i nakon dodavanja toksičnih 100 μM HNE-a. To je od velikog značenja za kliničku praksu jer se terapija koja izaziva oksidacijski stres, prvenstveno kemoterapeutik doksorubicin daje jednokratno u bolusu (a poluvrijeme eliminacije lijeka je 30 sati). Najvjerojatnije dio stanica preživljava te bi se nakon nekog vremena mogle reaktivirati.

Također, vidjelo se da kolagen sam po sebi ima poticajnu ulogu u vijabilnosti matičnih stanica. Ako se naši pokusi usporede s pokusom od Hassane i suradnika (196), koji su matične stanice akutne mijeloične leukemije izložili djelovanju 30 μM HNE-a u jednoj dozi te vidjeli da je nakon 24 sata od izlaganja svega 29,8% stanica vijabilno u usporedbi sa stanicama bez prethodnog tretmana, koje su bile vijabilne u postotku 93,6, vidljivo je da se nakon izlaganja tretmanu onih stanica koje su rasle na kolagenu, s koncentracijama HNE-a od 25 μM , čak oko 60% stanica dijeli. Ako se napravi usporedba s MTT testom vidi se da su stanice koje su nasadene na kolagen nakon izlaganja HNE-u u koncentraciji 25 μM u oko 80% izražavale metaboličku aktivnost. To je klinički vrlo važno jer je poznato da leukemije odlično reagiraju na kemoterapiju za razliku od solidnih epitelnih tumora pa tako i karcinoma dojke, a jedan od razloga je najvjerojatnije i vezanost tumorskih stanica na podlogu kolagena. Morfologija stanica i obrazac rasta nakon imunocitokemijskog bojenja na HNE-histidinske konjugate učinjeni su na stanicama nakon provedenog timidinskog testa.

Rezultati ukazuju na aktivaciju mehanizama i puteva izbacivanja HNE-a iz stanice kod stanica koje su nasadene na kolagen izložen 10 μM HNE-u i zato se i pri izlaganju 1 μM HNE-u ne vidi HNE pozitivitet u stanicama. Interesantno je da je kod izlaganja 5 μM HNE-u čak 74% stanica

imalo negativnu intracitoplazmatsku reakciju na kolagenu, a na kolagenu izloženom tretmanu s 1 i 10 μM HNE-om svega oko 20% stanica, što govori u prilog teoriji o prethodno aktiviranim putevima razgradnje HNE-a u stanici ako je podloga ranije izložena HNE-u. Iz dobivenih se rezultata također vidjelo da HNE u niskim koncentracijama do 5 μM ima proliferacijski učinak na matične stanice karcinoma dojke budući da su se stanice aktivno dijelile (3-12 mitozna na 100 stanica). Također smo vidjeli da se stanice na PS podlozi nisu dijelile što potvrđuje rezultate iz prethodnih pokusa u kojima smo vidjeli da su matične stanice karcinoma dojke znatno bolje rasle na podlozi kolagena (bez obzira da li je oksidiran ili nije) te da su na tim podlogama bile i u nakupinama, a ne samo pojedinačno kao na PS-u. I izgled je stanica bio bitno drugačiji na PS-u. One su sve okrugle dok su na kolagenu većim dijelom vretenaste.

Jako je zanimljiv rezultat intracelularne distribucije HNE-a. Vidljivo je da se pri nižim koncentracijama izloženog HNE-a, od 10 μM on nakupljao uz jezgrenu membranu da bi pri 25 μM izloženog HNE-a (na podlozi kolagena izloženog tretmanu s 1 μM HNE-om) bio u središnjem dijelu citoplazme, unilateralno, a na 50 μM izloženog HNE-a (osim na PS-u kod 25 μM) nakupljao se uz vanjsku membranu stanice. Ta nam različita intracelularna distribucija pokazuje lokalizaciju i dinamiku metaboličkih procesa u stanici. Također je vidljivo da su kod koncentracije od 50 μM HNE-a stanice bile male, smeđe, piknotične, i da osim što se stanice nisu dijelile, većina ih je bila mrtva.

Biologija karcinoma usko je povezana s oksidacijskom stresom i lipidnom peroksidacijom. Maligna transformacija stanica i progresija karcinoma često se baziraju na mutagenim i karcinogenim utjecajima kisikovih slobodnih radikala i njihovih drugih glasnika.

S druge strane radio- i kemoterapija (naročito doksorubicin i ciklofosamid) kao i fotodinamska terapija induciraju citotoksični efekt baziran upravo na slobodnim kisikovim radikalima. Čak i oni terapijski postupci koji se ne baziraju u potpunosti na oksidacijskom stresu s njim su indirektno povezani bilo kroz promjenu protoka krvi (ishemija, reperfuzija) bilo kroz upalne promjene. FDA (Američka Food and Drug Administration) odobrila je 132 lijeka u borbi protiv karcinoma, a njih 56 inducira oksidacijski stres, prvenstveno antraciklini (doksorubicin) ciklofosfamidi, cisplatina (210).

Tablica 10. Popis konvencionalnih kemoterapeutika i njihovog glavnog mehanizma protutumorskog djelovanja

Mehanizam Oksidacijski stres		Ostali mehanizmi djelovanja		
Kemoterapeutik	Primjena	Kemoterapeutik	Mehanizam djelovanja	Primjena
daunorubicin	ALL, MLL	trastuzumab	HER2/neu receptor	karcinom dojke i želuca
doxorubicin	karcinom dojke, limfom	cetuximab	preko EGFR	metastatski karcinom kolorektuma
mitoxantron	karcinom prostate, dojke	vinkristin	vezanjem na tubulin inhibira formiranje mikrotubula	nefroblastom, non-Hodgkin limfom, Hodgkin limfom
ciclofosfamidi	karcinom ovarija, mokraćnog mjehura	etopozid	inhibira topozimerazu i replikaciju DNA	Kaposi i Ewing sarkom
cisplatina	limfom, planocelularni ca.	taxani	inhibiraju stvaranje tubula i diobu stanica	karcinom prostate, dojke i ovarija
busulfan	CML	topotekan	inhibira tip I topozimerazu	karcinom ovarija i pluća
mitomicin	karcinom ezofagusa i anusa	bevacizumab	VEGF inhibitor	metastatski kolorektalni karcinom
fluorouracil	karcinom kolona i pankreasa	sunitinib	multikinazni inhibitor	metastatski RCC, neuroendokrini karcinom pankreasa
bleomicin	karcinom testisa, Hodgkin limfom	pazopanib	VEGF inhibitor	uznapredovali RCC
citarabin	AML, non-Hodgkin limfom	sorafenib	VEGF inhibitor	hepatocelularni karcinom, RCC

Tumorske su stanice na žalost često otporne na oksidacijski stres, stoga je moderan pristup onkologa prema stanicama karcinoma da su one konstantno u stanju blagog oksidacijskog stresa.

Konvencionalne terapije karcinoma dojke kao što su kemo-, radioterapija i kirurgija su skupe, uzrokuju ozbiljne i opsežne nuspojave, a nisu efikasne u liječenju agresivnih oblika karcinoma. Najbolji je primjer nedavno istraživanje poteklo iz Curieovog Instituta na tkivima humanog „basal-like“ (nalik bazalnom) trostruko negativnog agresivnog karcinoma dojke, uzetima od pacijenata nakon provedene kemoterapije koja nije polučila uspjeha (211).

Vidjelo se da:

- a) je kemoterapija potakla proliferaciju CD44+ stanica
- b) te su stanice pokazale visok KI67 indeks te visoke Mib1 proteine što govori u prilog aktivne proliferacije stanica
- c) pojedini geni Hedgehog signalnog puta koji je jedan od glavnih signalnih puteva u matičnim stanicama karcinoma dojki, kao što su Ptc1 i Shh, bili su prekomjerno eksprimirani u rezidualnim karcinomskim stanicama u usporedbi s primarnim tumorom prije primjene kemoterapije
- d) primjena monoklonskog protutijela anti- CD44 za vrijeme remisije reducirala je učestalost relapsa tumora, sugerirajući da CD44 pozitivne stanice imaju direktnu ulogu u *in vivo* rekurenciji tumora

Jedan od modela koji se predlaže kako bi se povećala osjetljivost stanica na zračenje je upotreba vodikovog peroksida, tvari koja može radiorezistentne tumore pretvoriti u radioosjetljive, reoksigenirajući tumorsko tkivo (212). Vidjelo se da su pacijenti s inače radiorezistentnim tumorima, u kliničkom ispitivanju, podvrgnuti injekcijama vodikovog peroksida u kombinaciji s natrijevim hijaluronatom direktno u tumorsko tkivo prije zračenja, postigli značajno kliničko poboljšanje bez ikakvih nuspojava osim blagog dermatitisa (213). Poznato je da matične stanice imaju znatno veće koncentracije antioksidacijskih enzima nego normalne stanice, a samim time i bolje mogućnosti obrane od oksidacijskog stresa. Indirektno je za pretpostaviti da je jedan od razloga radiorezistentnosti veća količina matičnih stanica u tim tumorima, te da je njima potrebna veća količina slobodnih kisikovih radikala da bi postali radiosenzitivni. U našim pokusima akutnog stresa koji je bio izazivan koncentracijama do 200 μM H_2O_2 nije došlo do promjene vijabilnosti matičnih tumorskih stanica, a nije postignuta letalna doza. Stoga je vjerojatno da su u praksi potrebne daleko veće koncentracije vodikovog peroksida i uopće slobodnih kisikovih radikala da bi došlo do uništavanja matičnih tumorskih stanica.

Ako povučemo paralelu između rezultata naših pokusa s djelovanjem doksorubicina kao kemoterapeutika (po preporuci zaključaka St. Gallenske konvencije iz 2011) (214), on se prvenstveno daje za liječenje trostruko negativnih, bazaloidnih karcinoma dojke koji imaju najveću količinu matičnih stanica, a djelovanje mu se bazira na oksidacijskom stresu, te ako se zna da su matične stanice karcinoma dojke u direktnom kontaktu s kolagenom, može se pretpostaviti da bi primjena kemoterapije dovela do proliferacije matičnih stanica.

Iz rezultata pokusa utjecaja kroničnog stresa na proliferaciju stanica vidljivo je da je kolagen izložen tretmanu s HNE-om u koncentracijama do 10 μM bio pogodan za rast matičnih stanica karcinoma dojke. Također se vidjelo da stanice nakon 10 dana bolje rastu, tj. veća je proliferacija bila na oksidiranom kolagenu nego na kolagenu bez prethodnog tretmana, pri izlaganju 25 μM HNE-u. Što je količina oksidiranosti kolagena bila veća to su stanice bolje rasle. Najbolje su rasle stanice na kolagenu izloženom 10 μM HNE-om. Pri izlaganju koncentracijama od 50 μM HNE- a i više, nije došlo do proliferacije stanica. Poznato je da je osnovni biološki efekt ionizirajućeg zračenja posredovan homolognom rekonstitucijom i nehomolognim spajanjem na razini DNK. Gubitak funkcije p53 aktivira homolognu rekonstituciju koja sudjeluje u popravcima oštećenja na dvostrukoj uzvojnici DNK u S i G2 fazi što je izrazito bitno jer su takve stanice sposobnije popraviti oštećenja nastala zračenjem. Nakon zračenja stanice imaju veću proliferacijsku frakciju u S i G2 fazi staničnog ciklusa. Na taj bi način gubitak proteina uključenih u homolognu rekonstituciju pogodovao većem uništavanju stanica nakon zračenja (106).

Matične stanice karcinoma dojke nastaju ili iz transformiranih somatskih matičnih stanica ili iz progenitorskih tumorskih stanica koje su se dediferencirale kao rezultat onkogenih mutacija te stekle sposobnost samoobnavljanja i ostale karakteristike matičnih stanica karcinoma (39,43).

Matične stanice karcinoma dojke su kao i normalne matične stanice rezistentnije na konvencionalnu kemoterapiju nego diferenciranije karcinomske stanice. Zato je bitno koristiti terapije koje ne ciljaju samo stanice u proliferaciji već i matične stanice. Prvi korak u uništenju karcinoma je ciljanje stanica u proliferaciji zbog toga što se te stanice učestalo dijele i imaju sposobnost brzog ubijanja oboljelog. Stoga je ciljanje matičnih stanica drugi korak u borbi protiv karcinoma. Jedan od načina kako se boriti protiv matičnih stanica karcinoma je potaknuti njihovu diferencijaciju. Poticaj za diferencijaciju može usporedno dovesti do nestanka njihove sposobnosti samoobnavljanja. Za sada je u tu svrhu u primjeni samo retinoična kiselina (vitamin A) koja se koristi kod liječenja akutne promijeloične leukemije koja je uz tu primjenu postala

izlječiva bolest. Mehanizam djelovanja retinoične kiseline je kroz povišenje reaktivnih kisikovih tvari (ROS-a) tj. induciranje nastanka oksidacijskog stresa (215). Nažalost, ona je pokazala slabe rezultate u liječenju solidnih tumora.

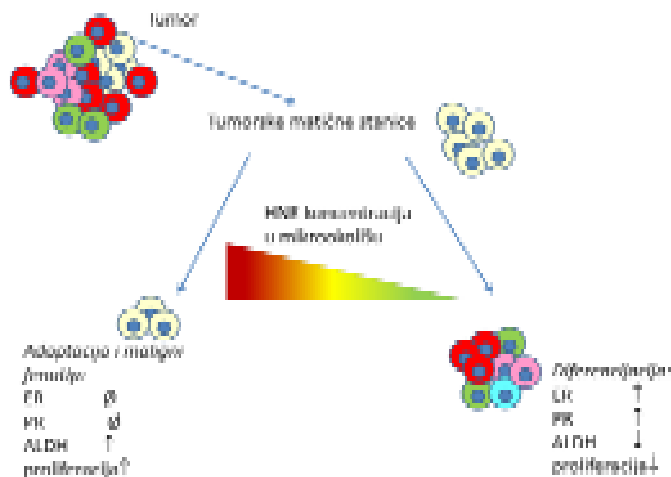
Modulacije diferencijacije matičnih stanica ROS-om proučene su na neuronalnim stanicama. Kulture stanica koje su pod stalnim blagim oksidacijskim stresom mogu zadržati pluripotentnost humanih embrionalnih matičnih stanica kao i mogućnost samoobnavljanja. Povećana koncentracija kisika tokom diferencijacije matičnih stanica povezana je s prebačajem glikolitičkog na oksidacijski metabolizam (216). Sukladno tome Chao i suradnici (217) su pronašli da je do spontane diferencijacije humanih embrionalnih matičnih stanica dovelo četverostruko povećanje intracitoplazmatskog ATP-a i 2,5x povećanje ROS-a. Endogeni stanični obrambeni mehanizmi protiv stresa (u svrhu prevencije i popravka oštećenja DNK ili kao obrana protiv oksidacijskog stresa) efikasniji su u matičnim stanicama nego u diferenciranim somatskim stanicama (218). Razine ekspresije citoplazmatske i mitohondrijske superoksid dismutaze (SOD) i katalaze smanjene su tijekom rane faze diferencijacije (216). Nasuprot tome diferencijacija je povezana s povećanom koncentracijom kisika i intracelularnom proizvodnjom ROS-a (216). To se može objasniti na slijedeći način; kao prvo embrionalne matične stanice moraju imati bolje održavanje i sistem popravka da održe genetičku stabilnost kroz brojne generacije, kao drugo ROS su sami po sebi bitni drugi glasnici u diferencijaciji matičnih stanica. Jako je značajan rad Hwanga i suradnika (219) koji je otkrio da u bolesnika s infarktom miokarda dolazi do poticanja neurogeneze tj. diferencijacije matičnih neuralnih stanica u supranuklearnom sloju gyrus dentatusa uslijed povišenja ROS-a koji potiče sintezu NADPH oksidaze. Mogla bi se povući paralela zašto matične stanice karcinoma dojke miruju u koštanoj srži tijekom dugog niza godina, a onda ih aktivira neki nepoznati mehanizam, možda jaki oksidacijski stres kao i u ovom slučaju, a u koštanoj srži zbog aktivne mijelopoeze ima obilje glukoze koja je potrebna za glikolitički metabolizam. Nedavne su studije pokazale da normalne hematopoetske matične stanice i normalne epitelne matične stanice mliječne žlijezde održavaju ROS-ove na niskim koncentracijama u usporedbi sa zrelijim progenitorskim stanicama da bi spriječile staničnu diferencijaciju i održale dug život (220-222). U prilog tome govore i rezultati studije Schmeltera i suradnika (223) koje govore o ulozi povišenih koncentracija ROS-a na kardiovaskularnu diferencijaciju embrionalnih matičnih stanica.

Philips i suradnici (224) objavili su rad u kojem su pokazali da su matične stanice radiorezistentne. Autori su istraživali razine ROS-a i fosforilaciju histona u kulturi matičnih stanica. Frakcijska radioterapija je povećala broj neadherentnih matičnih stanica karcinoma dojke sugerirajući da relativna radiosenzitivnost te populacije može dovesti do njihove ekspanzije. Tijekom radioterapije uz povišenje razine ROS-a prvo dolazi do proliferacije stanica, a pri višim koncentracijama do njihove diferencijacije. Apoptoza se dešava kod još viših koncentracija ROS-a te može služiti kao spas (izlaz) kada se stanice počnu nekontrolirano dijeliti u stanju trajnog oksidacijskog stresa (225).

Poznato je da maligne stanice imaju veće koncentracije endogenog oksidacijskog stresa *in vivo* i *in vitro* (226,227). Stanični okoliš objašnjava zašto je učinak ROS-a različit između tumorskih stanica i ishemijskih stanica. U tumorskim je stanicama hipoksija duža i stanice su navikle na anaerobni metabolizam i relativno stabilne koncentracije ROS-a za razliku od ishemijskih stanica. U stanicama karcinoma ROS i vodikov peroksid dodatno se proizvode mitohondrijskom respiracijom dok su u ishemiji stanice dodatno pogođene ROS-om zbog reperfuzije.

Kako bi se ustanovio utjecaj oksidacijskog stresa na diferencijaciju matičnih stanica karcinoma dojke, učinjeni su pokusi diferencijacije stanica SUM159 kroz 10 dana, a dobiveni su vrlo značajni rezultati. Potvrđena su opažanja iz prethodnih pokusa da su matične stanice karcinoma dojke znatno bolje rasle na podlozi kolagena u usporedbi sa plastičnom podlogom, a što je oksidiranost kolagena bila veća, brojčano je bilo više matičnih stanica koje su se lijepile za podlogu formirajući velike plaže. Izlaganje HNE-u nema utjecaja na broj stanica niti obrazac njihove adherencije za podlogu. Druga važna stvar koja je bila pokazana u ovima pokusima je činjenica da se veliki dio nediferenciranih matičnih stanica diferencirao nakon 10 dana. Naročito su se izrazili ER receptori ali i PR u nešto manjoj mjeri što je logično s obzirom da aktivacija PR ide preko aktivacije ER. Najveći broj stanica bio je pozitivan na kolagenu, neoksidiranom i oksidiranom (1 μ M HNE) bez obzira na izlaganje HNE-u. Stanice koje su nasadene na plastičnu podlogu nisu izrazile hormonske receptore, a stanice na oksidiranom kolagenu (10 μ M HNE) su izrazile hormonske receptore u 10% stanica bez obzira na izlaganje HNE-u. To je izrazito važno jer je za pretpostaviti da se veliki dio ostatnih matičnih stanica nakon primjene kemo- i radioterapije diferencira te bi se mogla primjenjivati hormonska terapija koja se po preporuci Američkog udruženja patologa i NCCN-a (National Comprehensive Cancer Network) (228) preporuča ako je najmanje 1% stanica pozitivnih (u ovim je pokusima bilo pozitivno 10-80%

stanica). To bi vjerojatno značajno produljilo preživljenje jer liječnici pacijenticama s trostruko negativnim karcinomima dojke daju samo kemo- i radioterapiju s obzirom da nema osnova za davanje hormonske terapije. Ključna je uloga kolagena i njegova oksidiranost na rast i diferencijaciju matičnih stanica jer izlaganje HNE-u nije utjecalo na razliku u broju, obrascu rasta i diferencijaciji stanica. Stanice su bile negativne na HER 2. Prema konvenciji iz St. Gallena iz 2011, više od 30% tumorskih stanica mora pokazivati pozitivitet u obliku 3+ ili 2+ (uz pozitivnu amplifikaciju gena dokazanu CISH metodom) da bi se provela terapija Herceptinom. Stanice su bile pozitivne na p53 na svim podlogama u intenzitetu od 81-99%. S obzirom na istraživanje koje su proveli Cicalese i sur. (107) vidjeli su da gubitak p53 potiče simetričnu diobu matičnih stanica karcinoma dojke kojom nastaju nove matične stanice. Yan i sur. (108) pokazali su da gubitak p53 povećava ekspresiju CD44, markera matičnih stanica koji potiče njihovu ekspanziju. Istraživanja provedena na trostruko negativnim „basal-like“ (nalik bazalnim) karcinomima dojke koji se u većem dijelu, ako ne i u cijelosti sastoje od matičnih tumorskih stanica, pokazali su gubitak funkcije p53. S obzirom na navedene podatke iz prethodnih istraživanja, kao i na rezultate izrazito visokog pozitiviteta p53 u matičnim stanicama nakon desetodnevne diferencijacije te pozitiviteta hormonskih receptora, za pretpostaviti je da je većina stanica u našem pokusu nakon 10 dana diferencirana s ponovno aktivnim p53 koji potiče asimetričnu diobu, tj. diferencijaciju stanica.



Slika 45. Učinak HNE-a ovisno o koncentraciji na fenotip i diferencijaciju tumorskih matičnih stanica

U slijedećim pokusima usporedbe izražavanja hormonskim receptora ER i PR te količine ALDEFLUOR pozitivnih stanica, određivano protočnom citometrijom te usporedbom grafova, vidljivo je da se stanice na PS podlozi nakon 10 dana nisu diferencirale u smislu izražavanja ER i PR receptora vjerojatno zbog toga što je izlaganje HNE-u „potrošilo“ veliku količinu unutarstaničnih ALDH. Ekspresija je ALDH na toj podlozi bila znatno viša bez izlaganja HNE-u (9.1v. 2.8%). Stanice nasađene na kolagen su nakon deset dana u 70% ispoljavale ER receptore, bez obzira da li su bile izložene HNE-u, dok su više PR receptora ispoljile bez izlaganja HNE-u. Mjerenjem aktivnosti ALDH vidi se njegova znatno manja razina u usporedbi sa PS podlogom. Najmanje su aktivnosti ALDH zabilježene na podlogama kolagena izloženog tretmanu s 1 i 10 μM HNE-om bez izlaganja 10 μM HNE-u. Na podlozi kolagena izloženog tretmanu s 10 μM HNE-om diferenciralo se oko 10% stanica. Količina ALDH enzima u tim stanicama bez izlaganja 10 μM HNE-u jednaka je onoj u stanicama nasađenima na kolagen izložen tretmanu s 1 μM HNE-om.

Metastaze karcinoma predstavljaju najveći izazov u liječenju onkoloških pacijenata. Pretpostavlja se da je 90% smrti od karcinoma uzrokovano lokalnom invazijom i metastazama (229). Najčešće korišteni protokoli kemoterapije usmjereni su na direktnu inhibiciju staničnog rasta, pa bi razvoj antimetastatskih lijekova, koji bi prevenirali kolonizaciju, znatno smanjio smrtnost kod onkoloških pacijenata (230). U potrazi za antitumorskim lijekom s antiinvazivnim osobinama, najnovija istraživanja pokazala su da antraciklini inhibiraju invaziju tumorskih stanica (231). Doksorubicin i srodni lijekovi kao što su aclacinomycin, DA-125 analog doksorubicina, inhibiraju pri niskim koncentracijama *in vitro* invaziju brojnih staničnih linija porijekla solidnih tumora. Jedno od ograničenja tih studija je to što su bile provedene na supstratima uobičajenih staničnih kultura, te nisu uzimale u obzir stanični mikrookoliš s kojim stanice *in vivo* razvijaju kompleksne međuodnose, kako sa susjednim stanicama tako i s ekstracelularnim matriksom. Naime, pokazalo se da je to ključna odrednica u staničnom odgovoru na kemoterapiju, a uključuje ograničeno prodiranje lijeka, staničnu prilagodbu na hipoksiju, prisutnost kiselog ekstracelularnog pH te stanično posredovanu kontaktnu inhibiciju (232). Serrout i suradnici (233) napravili su pokus u kojem su pokazali da 3D kolagen I matriks štiti stanice humanog fibrosarkoma od antimigratornog efekta subtoksičnih koncentracija doksorubicina. U toj studiji korištene su koncentracije lijeka koje umjereno utječu ili ne utječu na

proliferaciju stanica (2.5, 5 nM- ne utječu značajno na proliferaciju stanica i 7.5 nM- umjeren citostatski efekt) u svrhu isključivanja mogućnosti da antimigratorni efekt ne proizlazi zapravo iz citotoksičnog efekta. Tip I kolagena je glavna komponenta ekstracelularnog matriksa kroz koji stanice moraju proći da bi metastazirale (234). Koristeći kvantitativnu mikrospektrofluorimetriju, pokazalo se da doksorubicin brzo prolazi kroz 3D kolagen, tako da su, 1 sat nakon inkubacije, koncentracije lijeka identične u 3D matriksu kao i u mediju koji prekriva gel. Rezultati ovog rada sukladni su rezultatima sličnih pokusa koji pokazuju da komponente ekstracelularnog matriksa imaju inhibitorni efekt na citotoksični mehanizam brojnih antitumorskih lijekova (235). Svi ti radovi provedeni su na staničnim linijama koje potječu od solidnih i hematopoetskih tumora. Pokazalo se da su te stanice zaštićene od lijekom posredovane apoptoze kada su bile nasadene na proteine ekstracelularnog matriksa, fibronektin, laminin 1 i kolagene (236). *In vivo*, proteini ekstracelularnog matriksa kao što je kolagen I značajno moduliraju farmakološke osobine antraciklina, te uzrokuju intrinzičnu rezistenciju na kemoterapiju.

Kemoterapija djeluje na brzo dijeleće stanice. Kada se primjenjuje kod metastatske bolesti učinak je mjerljiv „imaging“ metodama kao smanjenje tumorske mase što odgovara fazi remisije. Na žalost, često dolazi do rekurencije bolesti. Na modelu karcinoma dojke Li i suradnici (237) pokazali su da konvencionalna kemoterapija ubija diferencirane stanice karcinoma a potiče proliferaciju matičnih stanica karcinoma dojke. Neoadjuvantna kemoterapija kod uznapredovalog HER-2 negativnog karcinoma dojke s docetakselom, doksorubicinom i ciklofosamidom dovela je do povećanja količine matičnih stanica karcinoma dojke u biopsijama pacijentica uzetima 12 tjedana nakon kemoterapije (238).

Perou i suradnici napravili su pokus sa staničnom linijom MCF7 koja ima karakteristike luminalnih stanica te HME linijom stanica koja ima karakteristike bazaloidnih karcinoma dojke. Proučavali su utjecaj kemoterapeutika na njih, među njima i doksorubicina. Nakon njegove primjene vidjelo se da linija bazaloidnih stanica karcinoma dojke nije pokazala represiju gena odgovornih za proliferaciju, ali je „utišala“ gene odgovorne za diferencijaciju. Ako povučemo paralelu između bazaloidnih karcinoma dojke i matičnih stanica karcinoma dojke, to bi značilo da doksorubicin ne sprječava njihovu diferencijaciju, ali koncentracije doksorubicina primjenjene na te stanice bile su 0,2 μ M. S obzirom da znamo da doksorubicin potiče oksidacijski stres, a znamo da u tako malim koncentracijama oksidacijski stres potiče proliferaciju stanica, ne uništava ih i ne uzrokuje njihovu diferencijaciju (239).

U slijedećim je pokusima proučavan utjecaj doksorubicina na proliferaciju tri linije stanica (SkBr-3, MCF-7 i SUM159), a rezultati očitavani timidinskim testom. Dobivene razlike u proliferaciji između 3 različita tipa stanica proizlaze najvjerojatnije iz drugačijih metaboličkih puteva u liniji stanica SkBr-3 i MCF7 u usporedbi sa SUM159. Moglo bi se pretpostaviti da im i pri visokim, inače toksičnim koncentracijama, doksorubicin služi kao faktor rasta, sve do koncentracije od 2 μM . Proliferacija u liniji SUM159 linearno je padala prema višim koncentracijama (do 5 μM) dok je u ostale dvije linije stanica bio zabilježen trostruki pad nakon koncentracije od 1 μM doksorubicina, a jednako su niske koncentracije bile pri dodanim 2 i 5 μM .

Kako bi se vidjela količina intracelularnih ROS-eva nastalih uslijed dodavanja različitih koncentracija doksorubicina, učinjeno je imunocitokemijsko bojenje na HNE te pokusi sa korištenjem boje 2',7-diklofluorescin diacetat (DCFH-DA, Fluka), koja se koristi za mjerenje ROS-a u stanicama. Na PS podlozi se pri svim dodanim koncentracijama doksorubicina vidio intracelularni HNE, a nakon markiranja stanica DCFH-DA dvostruko do trostruko veće koncentracije ROS-ova pri svim dodanim količinama doksorubicina u usporedbi s ostalim podlogama. Zanimljivi su rezultati na podlozi kolagena na kojoj se niti pri najvišim dodanim koncentracijama od 5 μM doksorubicina nije vidio intracelularni HNE, ali su zabilježeni intracelularni ROS-evi čija je koncentracija rasla s porastom koncentracije doksorubicina sve do 5 μM . Na podlogama kolagena izloženog tretmanu, usklađeni su rezultati intracelularnog HNE-a i ROS-ova.

Konačno, rezultati pokazuju kako je modifikacija ekstracelularnog matriksa bitan čimbenik u reakciji matičnih tumorskih stanica na (kemo)terapeutike. Također, ti isti kemoterapeutici mogu biti i dvosjekli mač, jer ako ne uzrokuju staničnu smrt ili diferencijaciju, guraju stanice u još maligniji fenotip, čime se pogoršavaju prognoze pacijentica. Razumijevanje interakcija oksidacijskog stresa, ekstracelularnog matriksa i tumorskih matičnih stanica pruža nove pristupe u razumijevanju i liječenju malignih bolesti.

8. ZAKLJUČCI

1. Oksidacijski tretman uzrokuje značajne strukturalne promjene na molekuli kolagena, gubitak oko 70% native strukture.
2. Oksidacijski tretman uzrokuje slabiju topljivost kolagena.
3. Matične stanice karcinoma dojke znatno bolje rastu na podlozi kolagena i oksidiranog kolagena nego na plastičnoj podlozi.
4. Na sudbinu matičnih stanica karcinoma dojke na podlozi kolagena ne utječe njegova oksidiranost čak niti pri toksičnim koncentracijama, već količina dodanog HNE-a.
5. Nakon izlaganja matičnih stanica karcinoma dojke koncentracijama HNE-a od 50 μM i više, stanice se prestaju dijeliti, ali su i dalje vijabilne.
6. Izlaganje matičnih stanica karcinoma dojke doksorubicinu u koncentracijama do 1 μM dovodi do proliferacije stanica. Toksične su koncentracije doksorubicina od 2 i 5 μM .
7. Kronični stres uzrokovan HNE-om u trajanju 10 dana uzrokuje diferencijaciju većine matičnih stanica karcinoma dojke, nasadenih na podlogu kolagena bez obzira na njegovu oksidaciju, uz prvenstveno ekspresiju estrogenih receptora ali i progesteronskih u manjoj mjeri.
8. Ključna je uloga kolagena i njegova oksidiranost na rast i diferencijaciju matičnih stanica jer izlaganje HNE-u ne utječe na razliku u broju, obrascu rasta i diferencijaciji stanica.
9. Kronični stres uzrokovan HNE-om u trajanju 10 dana ne utječe na ispoljavanje transmembranskog receptora HER2.
10. Kronični stres uzrokovan HNE-om u trajanju 10 dana rezultira izrazito visokim pozitivitetom p53 u matičnim stanicama karcinoma dojke.

9. LITERATURA

1. Lakhani SR, O'Hare MJ. The mammary myoepithelial cell: Cinderella or ugly sister? *Breast Cancer Res.* 2001;3: 1-4.
2. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell.* 1987;51: 941-51.
3. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson J-A. Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal location and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82: 4258-65.
4. Hall J, McDonnell D. The estrogen receptor β -isoform (Er β) of the human estrogen receptor modulates *Era* transcriptional activity as is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology.* 1999;140: 5566-78.
5. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogen. *N Engl J Med.* 2002;346: 340-52.
6. DeMayo FJ, Zhao B, Takamoto N, Tsai SY. Mechanisms of action of estrogen and progesterone. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;955: 48-59.
7. Moggs JG, Orphanides G. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep.* 2001;2: 775-81.
8. Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP. Human progesterone receptor A form is a cell and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 1993;7: 1244-55.
9. Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB. Differential gene regulation by the two progesterone receptors isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2002;277: 5209-18.
10. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57: 339-55.
11. Laron Z, Pauli R, Pertzelan A. Clinical evidence on the role of estrogens in the development of the breasts. *Proc R Soc Edinburgh B1.* 1989;95:13-22.
12. Key TJA, Pike MC. The role of oestrogen and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1984;24:29-43.

13. Fisher B, Constantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin W, Vogel V, Rabidoux A, Dimitrov N, Atkins J, Daly M, Wieand S, Tan-Chiu E, Ford L, Wolmark N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90: 1371-88.
14. Bocchinfuso WP, Korack KS. Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1997;2: 323-34.
15. Humphreys R, Lydon J, O'Malley B, Rosen J. Use of the PRKO mice to study the role of progesterone in mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1997;2: 343-54.
16. Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92: 328-32.
17. Shairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA.* 2000; 283: 485-91.
18. Clarke R, Howell A, Potten C, Anderson E. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res.* 1997;57: 4987-91.
19. Speirs V, Skliris GP, Burdall SE, Carder PJ. Distinct expression patterns of $Er\alpha$ and $Er\beta$ in normal human mammary gland. *J Clin Pathol.* 2002;55: 371-4.
20. Couse JF, Korach K. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev.* 1999;20:358-417.
21. Russo J, Ao X, Grill C, Russo IH. Pattern of distribution of cells positive for receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res Treat.* 1999;53: 217-27.
22. Khan SA, Rogers MA, Obando JA, Tamsen A. Estrogen receptor expression of benign epithelium and its association with breast cancer. *Cancer Res.* 1994;54: 217-27.
23. Lawson JS, Field AS, Champion S, Tran D, Ishikura H, Trichopoulos D. Low estrogen receptor α expression in normal human breast tissue underlies low breast cancer incidence in Japan. *Lancet.* 1999;354: 1787-88.
24. Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SAW. Histological and biochemical evolution of human premalignant breast disease. *Endocr Relat Cancer.* 2001;8: 47-61.

25. Shoker BS, Jarvis C, Sibson DR, Walker C, Sloane JP. Oestrogen receptor expression in the normal and precancerous breast. *J Pathol.* 1999;155: 1811-15.
26. Roger P, Sahla M, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res.* 2001;61: 2537-41.
27. Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptor A and B in an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;72: 163-72.
28. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer Statistics. 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006; 56: 106-30.
29. Hadden J. The immunology and immunotherapy of breast cancer: an update. *Int J Immunopharmacol.* 1999;21: 79-101.
30. Bonnet D, Dick J. Human acute myeloid leukemia is organised as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 1997;3: 730-7.
31. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito- Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100: 3983-8.
32. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005;65: 10946-51.
33. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007;67:1030-7.
34. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007;445: 106-10.
35. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, Reilly JG, Chandra D, Zhou J, Claypool K, Coghlan L, Tang DG. Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene.* 2006; 25: 1696-780.
36. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.* 2007;104: 973-8.

37. Ricci- Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007;445: 111-5.
38. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature*. 2004;432: 396-401.
39. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414: 105-11.
40. Morrison BJ, Schmidt CW, Lukhani SR, Reynolds BA, Lopez JA. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2008;10: 210-24.
41. Massard C, Deutsch E, Soria J.C. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Annals of Oncology*. 2006;17: 1620-24.
42. Slack J. Stem cells in epithelial tissues. *Science*. 2000;287: 1431-3.
43. Dayem AA, Choi HY, Kim YH, Cho SG. Role of oxidative stress in stem, cancer and cancer stem cells. *Cancers*. 2010;2: 859-884.
44. Little MP, Boice JD. Comparison of breast cancer incidence in the Massachusetts tuberculosis fluoroscopy cohort and in the Japanese atomic bomb survivors. *Radiat Res*. 1999;151: 218-24.
45. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992; 255:1707-19.
46. Reitze RL, Reynolds BA. Neural stem cell isolation and characterisation. *Methods Enzymol*. 2006;419: 3-23.
47. Dontu G, Abaallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*. 2003;17: 1253-70.
48. Bjerkvig R, Tysness BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ. The origin of the cancer stem cell. *Nat Rev Cancer*. 2005;5: 899-905.
49. George AA, Franklin J, Kerkof K, Shah AJ, Price M, Tsark E, Bockstace D, Yao D, Hart N, Carcich S, Parkman R, Crooks GM, Weinberg K. Detection of leukemic cells in the CD34+, CD38- bone marrow progenitor population in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2001;97: 3525-30.

50. Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. AML1/eto-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97: 7521-6.
51. Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Sting J, Smith KG, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman G, Visvader JE. Generation of a functional mammary gland from a single cell. *Nature*. 2006;439: 395-7.
52. Stingl J, Eirew P, Ricketson J, Shackleton M, Vaillant F, Choid D, Li H, Eaves CJ. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*. 2006;439: 993-7.
53. Going JJ, Abd EL, Nonem HM, Craft JA. Clonal origin of human breast cancer. *J Pathol*. 2001;194: 395-7.
54. Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organisation Classification of tumors, pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs, IARC Press, Lyon, France, 2003.
55. Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Cancer stem cells in breast: Current opinion and future challenges. *Pathobiology*. 2008;75: 75-84.
56. Duffy M. "Estrogen receptors: role in breast cancer", *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*. 2006;43: 325-47.
57. Schiff R, Shou J, Bharwani L, Rimawi M, Osborne C.K. Advanced concepts in estrogen receptor biology and breast cancer endocrine resistance: implicated role of growth factor signaling and estrogen receptor coregulators. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2005; 56; 10-20.
58. Ross J.S, Fletcher J.A. The Her-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells*. 1998;16:413-28.
59. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas A, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van den Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinoma distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98: 10869-10874.
60. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2000; 406: 747-52.

61. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ; Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415: 530-6.
62. Da Silva L, Clarke C, Lakhari SR. Demystifying basal-like breast carcinomas. *J Clin Pathol*. 2007;60: 1328-32.
63. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Koraca G, Hu Z, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and clinical characterisation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10: 5367-74.
64. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Koru EL, Long PM, Jazaeri A, Morrtiat P, Fox SB, Harris AL, Lin ET. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100: 10393-8.
65. Corey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007;13: 2329-34.
66. Dontu G, El-Ashry D, Wicha MS. Breast cancer, stem (progenitor) cells and the estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15: 193-7.
67. Filmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research*. 2008;10: 25-38.
68. Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, Datar RH, Cote RJ. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res*. 2006;12: 5615-21.
69. Brinkley D, Haybrittle JL. The curability of breast cancer. *Lancet*. 1975;2: 95-7.
70. Brown S, Vogl F, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GYC, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353: 793-802.
71. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*. 2001;37: 3-8.

72. Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley Am, Gabelli SB, Denney DW Jr, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin. *Fab. Nature.* 2003;421: 756-60.
73. Breannan PJ, Kumogai T, Berezov A, Murali R, Greene M. HER2/neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. *Oncogene.* 2000;19: 6093-101.
74. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2: 127-37.
75. Bargman CI, Weinberg RA. Oncogenic activation of the neu-encoded receptor by point mutation and deletion. *EMBO J.* 1988;7: 2043-52.
76. Onda M, Matsuda S, Higaki S, Iijima T, Fukushima JI, Yokokura A, Kojima T, Horiuchi H, Kurokawa T, Yamamoto T. ErbB-2 expression is correlated with poor prognosis for patients with osteosarcoma. *Cancer.* 1996;77: 71-8
77. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udore J, Ullrich A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989;244: 707-12.
78. Dori S, Vered M, David R, Buchner A. HER2/neu expression in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med.* 2002;31: 463-7.
79. Latif Z, Watters AD, Dunn I, Grigor K, Underwood MA, Bartlett JM. HER2/neu gene amplification and protein overexpression in G3 pT2 transitional cell carcinoma of the bladder: a role for anti-HER2 therapy? *Eur J Cancer.* 2004;40: 56-63.
80. Morris MJ, Reuter VE, Kelly WK, Slovin SF, Kenneson K, Verbel D, Osman I, Scher HI. HER-2 profiling and targeting in prostate carcinoma. *Cancer.* 2002;94; 980-6.
81. Safran H, Steinhoff M, Mangray S, Rathore R, King TC, Chai L, Berzein K, Moore T, Ianitti D, Reiss P, Pasquariello T, Akerman P, Quirk D, Mass R, Goldstein L, Tantravahi U. Overexpression of the HER-2/neu oncogene in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol.* 2001;24: 96-9.
82. Park DI, Yun JW, Park Jh, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, Sohn CL, Jeon WK, Kin BI, Yoo CH, Son BH, Cho EY, Chae SW, Kim EJ, Sohn JH, Ryu SH, Sepulveda AR. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig Dis Sci.* 2006;51: 1371-9.

83. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*.1987;235: 177-82.
84. Colomer R, Montero S, Lluch A, Ojeda B, Barnadas A, Cesado A, Massuti B, Cortes- Funes H, Lloveras B. Circulating HER2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2000;6: 2356-62.
85. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Sufinng the p53 network. *Nature*. 2001;408: 307-10.
86. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutatis of the p53 suppressor: The demons of the guardian of the genome. *Cancer Res*. 2000;60: 6788-93.
87. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990;250: 1233-38.
88. Bartek J, Iggo R, Gannon J, Lane DP. Genetic and immunocytochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer. *Oncogene*. 1990;5: 893-99.
89. Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD, Marks JR. Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 5006-10.
90. Pharaoh PD, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 1999;80: 1968-73.
91. Done SJ, Eskandarian S, Bull S, Redston M, Andrulis IL. P53 mis-sense mutations in microdissected high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:700-4.
92. Smith PD, Crossland S, Parker G, Osin P, Brooks L, Waller J, Philp E, Crompton MR, Gusterson BA, Allday MJ, Crook T. Novel p53 mutants selected in BRCA-associated tumours which dissociate transformation suppression from other wild-type p53 functions. *Oncogene*. 1999;18: 2451-9.
93. Phillips KA, Nichol K, Ozcelik H, Knight J, Done SJ, Goodwin PJ, Andrulis IL. Frequency of p53 mutations in breast carcinomas from Ashenazi Jewish carriers of BRCA1 mutations. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91: 469-73.
94. Greenblatt MS, Chappuis PO, Bond JP, Hamel N, Foulkes WD. TP53 mutations in breast cancer associated with BRCA 1 or BRCA2 germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution. *Cancer Res*. 2001;61.

95. De Cremoux P, Salomon AV, Liva S, Dendale R, Bouchind'homme B, Martin E, Sastre-Garau X, Magdelenat H, Fourquet A, Soussi T. P53 mutation as a genetic trait of typical medullary breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91: 641-3.
96. Moll UM, Riou G, Levine AJ. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89: 7262-6.
97. Mazars R, Spinardi L, BenCheikh M, Simony-Lafontaine J, Jeanteur P, Theillet C. P53 mutation occur in aggressive breast cancer. *Cancer Res.* 1992;52: 3918-23.
98. Alsner J, Yilmaz M, Guldberg P, Hansen LL, Overgaard J. Heterogeneity in the clinical phenotype of TP53 mutations in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6: 3923-31.
99. Maass N, Teffner M, Rosel F, Pawaresch R, Jonat W, Nagasaki K, Rudolph P. Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumour progression in ductal carcinomas of the breast. *J Pathol.* 2001;195: 321-6.
100. Aas T, Borresen AL, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA, Lonning PE. Specific p53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med.* 1996;2: 811-4.
101. Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, Lillehaug JR, Akslen LA, Borresen-Dale AL. Influence of TP53 gene alteration and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res.* 2001;61: 2505-12.
102. Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, Nguyen M. P53 mutation in plasma DNA and its prognostic value in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2001;7: 2222-7.
103. Metcale S, Wheeler TK, Picken S, Negus S, Milner AJ. P53 autoantibodies in 1006 patients followed up for breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2000;2: 438-43.
104. Bernier J. Translational breast cancer research: Recent advances through the lens of experimental radiotherapy. *The Breast.* 2010;19:23-27.
105. Liu W, Ip M, Podgorsak MB, Gas GM. Disruption of estrogen receptor alpha-p53 interaction in breast tumours: a novel mechanism underlying the antitumour effect of radiation therapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2009: 115;43-50.
106. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature.* 2006;441: 1068-74.

107. Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE, Faretta M, Ronzoni S, Giulini B, Brisken C, Minucci S, di Fiore PP, Pelicci PG. The tumor suppressor p53 regulate polarity of self-renewing divisions on mammary stem cells. *Cell*. 2009;138: 1083-95.
108. Jerry DJ, Tao L, Yan H. Regulation of cancer stem cells by p53. *Breast Cancer Research*. 2008;10: 304-307.
109. Langerod A, Zhao H, Borgan O, Nesland JM, Bukholm IR, Ik Dahl T, Karesen R, Borresen-Dale AL, Jeffrey SS. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2007;9: 30-33.
110. Herschowitz JI, Sirin K, Weigman VJ, Mikaleian J, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekaran S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kapelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchil GA, Van DT, Perou CM. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Bio*. 2007;8: 76-80.
111. Brown E, McKee T, diTomaso E, Pluen A, Seed B, Boucher Y, Jain RK. Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation. *Nat Med*. 2003;9: 796-800.
112. Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M, Lopez-Otin C, Shapiro S, Inada M, Krane S, Allen E, Chung D, Weiss SJ. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol*. 2004;167: 769-81.
113. Li XY, Ota I, Yana I, Sabeh F, Weiss SJ. Molecular dissection of the structural machinery underlying the tissue-invasive activity of membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Mol Biol Cell*. 2008;19:3221-3.
114. Pinner S, Sahai E. PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat Cell Biol*. 2008;10: 127-37.
115. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Adrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Broecker EB, Friedl P. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*. 2003;160: 267-77.
116. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays*. 2001;23: 912-23.

117. DeClerk YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L, Padarathsingh M. Proteases, Extracellular matrix, and cancer. *Am J of Pathology*. 2004;164: 1131-9.
118. Haslam SZ, Woodward TL. Tumour-stroma interactions. Reciprocal regulation of extracellular matrix proteins and ovarian steroid activity in the mammary gland. *Breast Cancer Res*. 2001;3: 365-72.
119. Xie J, Haslam SZ. Extracellular matrix regulates ovarian hormone-dependent proliferation of mouse mammary epithelial cells. *Endocrinology*. 1997;138: 2466-73.
120. Haslam SZ. Mammary fibroblasts influence on normal mammary epithelial cell responses to estrogen in vitro. *Cancer Res*. 1986;46: 310-6.
121. Haslam SZ, Nummy KA. The ontogeny and cellular distribution of estrogen receptors in normal mouse mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992;42: 589-95.
122. Cunha GR, Young P, Hom YK, Cooke PS, Taylor JA, Lubahn DB. Elucidation of a role for stromal steroid hormone receptors in mammary gland growth and development using tissue recombinants. *J Mammary Gland Biol Neopl*. 1997;2:393-402.
123. Zhang HZ, Benett JM, Smith KT, Sunil N, Haslam SZ. Estrogen mediates mammary epithelial cell proliferation in serum-free culture indirectly via mammary stroma derived hepatocyte growth factor. *Endocrinol*. 2002;143: 3427-34.
124. Woodward TL, Xie J-W, Fendrick J, Haslam SZ. Proliferation of mouse mammary epithelial cells in vitro: interactins among EGF, IGF-1, ovarian hormones and extracellular matrix proteins. *Endocrinol*. 2000;141: 3578-86.
125. Woodward TL, Lu H, Haslam SZ. Laminin inhibits estrogen action in human breast carcinoma cells. *Endocrinol*. 2000;141: 2814-21.
126. Mandal AK, Walia J. Effect of attachment surface on the growth and differentiation of breast cells. 1995;110: 403-6.
127. Yang J, Richards J, Bowman P, Guzman R, Enami J, McCosmic K, Hamamoto S, Pitelka D, Nandi S. Sustained growth and three dimensional organisation of primary mammary tumour epithelial cells embedded in collagen gels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76: 3401-5.
128. Yang J, Elias JJ, Petrakis NL, Wellings SR, Nandi S. Effects of hormones and growth factors on human mammary epithelial cells in collagen gel culture. *Cancer Res*. 1981;41: 1021-7.

129. Yang J, Guzman R, Richards J, Jentoft V De Vault MR, Wellings SR, Nandi S. Primary culture of human mammary epithelial cells embedded in collagen gels. *J Natl Cancer Inst.* 1980;65: 337-43.
130. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirschner T. Opinion: migrating cancer stem cells-an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005;21: 744-9.
131. Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, Hempen PM, Jones J, Kern SE. The desmoplastic response to infiltrating breast carcinoma. Gene expression at the site of primary invasion and implications for comparisons between tumor types. *Cancer Res.* 2002;4: 1239-1249.
132. Linheng L, Ting X. Stem cell niche: structure and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2005;21: 605-31.
133. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cell find their niche. *Nature.* 2002;414: 98-104.
134. Tumber T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry W, Reudl M, Fuchs E. Defining the epithelial stem cell niche size. *Nature.* 2004;303: 359-63.
135. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Hang J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedmann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003;425: 836-41.
136. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomodo K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cell from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131: 861-72.
137. Li L, Neaves WB. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Reserch.* 2006;66: 4553-7.
138. La Barge MA, Petersen OW, Bissell MJ. Of microenvironment and mammary stem cells. *Stem Cell Reviews.* *Nature.* 2007;448: 137-46.
139. Brisken C, Duss C. Stem cells and the stem cell niche in the breast: an integrated hormonal and developmental perspective. *Stem Cell Reviews.* 2007;3: 147-56.
140. Koenigsmann M, Griffin JD, DiCarlo J, Cannistra SA. Myeloid and erythroid progenitor cells from normal bone marrow adhere to collagen type I. *Blood.* 1992;79: 657-65.
141. Stanović S, Boranić M. Dugotrajna kultura koštane srži. *Arh hig rada tijeksikol.* 1998;49: 265-75.

142. Kansas GS, Muihead MJ, Dailey MO. Expression of the CD11/CD18, leukocyte adhesion molecule 1, and CD44 adhesion molecules during normal myeloid and erythroid differentiation in humans. *Blood*. 1990;77: 1723-8.
143. Carter WG, Wayner EA. Characterisation of the class III collagen receptor. A phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J Biol Chem*. 1998;263: 4193-9.
144. Brown TA, Bouchard T, St-John T, Wayner E, Carter WG. Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J Cell Biol*. 1991;113: 207-213.
145. Kirkland SC. Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. *British journal of cancer*. 2009;6: 30-3.
146. Halliwell B. The biological significance of oxygen-derived species: Active oxygen in biochemistry. Valentine JS et al, Blackie Academic&Professional, New York. 1995: 313-35.
147. Sies H. Oxidative stress. Academic Press, Orlando. 1985.
148. Poli G, Parola M. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radical Biol Med*. 1997;22: 287-305.
149. Žarković N, Schaur RJ, Puhl P, Jurin M, Esterbauer H. Mutant dependence of growth modifying effects of 4-hydroxynonenal and fetal calf serum in vitro. *Free Radical Biol Med*. 1994;16: 877-84.
150. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2000;29: 323-33.
151. Mattson MP, Kroemer G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med*. 2003;9: 196-205.
152. Gago-Dominguez M, Castelao JE, Yuan JM, Ross RK, Yu MC. Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radical Biol Med*. 2006;4: 721-33..
153. Cepinskas G, Kvietys PR, Aw TY. Gamma 3-lipid peroxides injure CaCo-2 cells: relationship to the development of reduced glutathione antioxidant systems. *Gastroenterology*. 1994;107: 80-6.

154. Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and /or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids*. 2009;57: 1-11.
155. Darley-Usmar VM, Mason RP, Chamulitrat W, Hogg N, Kalyanarman B. Lipid peroxidation and cardiovascular disease. *Immunopharmacology of free radical species*. Blake D, Winyard PG, Academic Press, London. 1995: 23-37.
156. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation: some problems and concepts. *B Oxygen Radicals and Tissue Injury*. Halliwell B, FASEB, Bethesda. 1998: 9-19.
157. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol Med*. 1991;11: 81-128.
158. Strohemier H, Hinghofer-Szalkay H, Shaur RJ. Detection of 4-hydroxynonenal (HNE) as physiological component in human plasma. *Lipid Mediators Cell Signaling*. 1995;11: 51-61.
159. Alevi P, Anastasia M, Cajone F, Ciuffreda P, Sanvito AM. Structural requirements of aldehydes produced in LPO for the activation of the heat-shock genes in HeLa cells. *Free Radic Biol Med*. 1995;18: 107-116.
160. Sovic A, Borovic S, Loncaric I, Kreuter T, Zarkovic K, Vukovic T, Waeg G, Hrascan R, Wintersteiger R, Klinger R, Zurak N, Schaur RJ, Zarkovic N. The carcinostatic and proapoptotic potential of 4-hydroxynonenal in HeLa cells is associated with its conjugation to cellular proteins. *Anticancer Res*. 2001;21:1997-2004.
161. Casini A, Galli A, Pignatelli P, Frulloni L, Grappone C, Milani S, Pederzoli P, Cavallini G, Surrenti C. Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) co-localized with lipid peroxidation-derived aldehydes in chronic alcoholic pancreatitis. *The Journal of Pathology*. 2000;192: 81-9.
162. Kikuta K, Masamune A, Satoh M, Suzuki N, Shimosegawa T. 4-hydroxy-2,3-nonenal activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in rat pancreatic stellate cells. *World Journal of Gastroenterology*. 2004;16: 2344-51.
163. Parola M, Robino G, Marra F, Pinzani M, Bellomo G, Leonarduzzi G, Chiarugi P, Camandola S, Poli G, Waeg G, Gentilini P, Dianzani MU. HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells. *J Clin Invest*. 1998;11:1942-50.

164. Biasi F, Tessitore L, Zanetti D, Cutrin JC, Zingaro B, Chiarpotto E, Zarkovic N, Serviddio G, Poli G. Associated changes of lipid peroxidation and transforming growth factor β 1 levels in human colon cancer during tumor progression. *Gut*. 2002;50: 361-7.
165. Jenner P. Oxidative damage in neurodegenerative diseases. *Lancet*. 1994;344: 796-8.
166. Yoritaka A, Hattori K, Uchida M, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno M. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93: 2696-701.
167. Shibata N, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Yamada S, Hirano A, Kawaguchi M, Yamamoto T, Sasaki S, Kobayashi M. Morphological evidence for lipid peroxidation and proteinglycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res*. 2001;917: 97-104.
168. Dandona P, Cook S, Synder B, Makowski J. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet*. 1996;347: 444-5.
169. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39: 44-84.
170. Ames BN, Shigenaga MK. Oxidants are major contributor to aging. *Ann NY Acad Sci*. 1992;663: 85-96.
171. Zarkovic N. Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med*. 2003;24: 281-91.
172. Szweda LI, Uchida K, Tsai L, Stadtman ER. Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Selective modification of an active-site lysine. *J Biol Chem*. 1993; 268: 3342-7.
173. Uchida K, Stadtman ER. Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *J Biol Chem*. 1993;268: 6388-93.
174. Mitchell AE, Morin D, Lane MW, Jones AD. Purification, mass spectrometric characterisation, and covalent modification of murine glutathione S-transferases. *Chem Res Toxicol*. 1995;8: 1054-62.

175. Uchida K, Shiarishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation: 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem.* 1999;274: 2234-42.
176. Ji C, Amarnath V, Pietenpol VA, Marnett LJ. 4-hydroxynonenal induces apoptosis via caspase-3 activation and cytochrome C release. *Chemic Res Toxicol.* 2001;14: 1090-6.
177. Okada K, Wangpoengtrakul C, Osawa T, Toyokuni S, Tanaka K, Uchida K. 4-hydroxy-2-nonenal mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. *J Biol Chem.* 1999;274: 23787-93.
178. Page S, Fischer C, Baumgartner B, Haas M, Kreusel U, Loidl G, Hayn M, Ziegler-Heitbrock HWL, Neumeier D, Brand K. 4-hydroxynonenal prevents NF- κ B activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting I κ B phosphorylation and subsequent proteolysis. *J Biol Chem.* 1999;274: 11611-8.
179. Kozak Kr, Marnett LJ. I κ B kinase, a molecular target for inhibition by 4-hydroxy-2-nonenal. *J Biol Chem.* 2001;276: 18223-8.
180. Parola M, Robino G, Marra F, Pinzani M, Bellomo G, Leonnarduzzi G, Camandola S, Poli G, Waeg G, Gentilini P, Dianzani MU. HNE interacts directly with JNK isoforms in humane hepatic stellate cells. *J Clin Invest.* 1998;102: 1942-50.
181. Yun MR, Im DS, Lee SJ, Park HM, Bae SS, Lee WS, Kim CD. 4-hydroxynonenal enhances CD36 expression on murine macrophages via p38 MAPK-mediated activation of 5-lipoxygenase. *Free Radical Biol. Med.* 2009;46: 692-8.
182. Suc I, Meilhac O, Laoie-Mazenc I, Vandaele J, Jurgens G, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Activation of EGF receptor by oxidized LDL. *FASEB J.* 1998; 12: 665-71.
183. Robino G, Parola M, Marra F, Caligiuri A, De Franco RM, Zamara E, Bellomo G, Gentilini P, Pinzani M, Dianzani UM. Interaction between 4-hydroxy-2,3-alkenals and the platelet-derived growth factor- β receptor: Reduced tyrosine phosphorylation and downstream signaling in hepatic stellate cells. *J Biol Chem.* 2000;275: 40561-7.
184. Chiarpotto E, Domenicotti C, Paola D, Vitali A, Nitti M, Pronzato MA, Biasi F, Cottalasso D, Marinari UM, Dragonetti A, Cesaro P, Isidoro C, Poli G. Regulation of rat hepatocyte protein kinase C β isoenzymes by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal: A signaling pathway to modulate vesicular transport of glycoproteins. *Hepatology.* 1999;29: 1565-72.

185. Rossi MA, Di Mauro C, Dianzani MU. Action of lipid peroxidation products on phosphoinositide specific phospholipase C. *Mol Aspect Med.* 1993;14: 273-9. Gueraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, Jouanin I, Siems W, Uchida K. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research.* 2010;10: 1098-1124.
186. Natarajan V, Scribner WM, Taher MM. 4-hydroxynonenal, a metabolite of lipid peroxidation, activates phospholipase D in vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 1993;15: 365-75.
187. Gueraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, Jouanin I, Siems W, Uchida K. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free radical research,* 2010;10: 1098-1124.
188. Yang Y, Sharma R, Sharma A, Awasthi S, Awasthi JC. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochimica Polonica.* 2003;50: 319-336
189. Das UN. Cis-unsaturated fatty acids as potential anti-mutagenic, tumoricidal, and anti-metastatic agents. *Asia Pacific J Pharmacol.* 1992;7: 305-27.
190. Das U. A radical approach to cancer. *Med Sci Monit.* 2002;8: 79-92.
191. Ambrosone CB, Sweeney C, Coles BF et al Polymorphisms in glutathione S-transferases (GSTM1 and GSTT1) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res.* 2001;61: 7130-5.
192. Look MP, Musch E. Lipid peroxides in the polychemotherapy of cancer patients. *Chemotherapy.* 1994;40: 8-15.
193. Faure H, Coudray C, Mousseau M et al. 5-hydroxymethyluracil excretion, plasma TBARS and plasma antioxidant vitamins in Adriamycin-treated patients. *Free Radic Biol Med.* 1996;20: 979-83.
194. Faber M, Coudray C, Hida H, Mousseau M, Favier A. Lipid peroxidation products, and vitamin a trace element status in patients with cancer before and after chemotherapy, including Adriamycin. A preliminary study. *Biol Trace Elem Res.* 1995;47: 117-23.
195. Subramaniam S, Shyamala Devi CS. Erythrocyte antioxidant enzyme activity in CMF treated breast cancer patients. *Cancer Biochem Biophys.* 1994;14: 177-82.

196. Hassane DC, Guzman ML, Corbett C, Li X, Abboud R, Young F, Liesveld JL, Carroll M, Jordan CT. Discovery of agents that eradicate leukemia stem cells using an in silico screen of public gene expression data. *Blood*. 2008;111: 5654-62.
197. Poli G, Schaur RJ. 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUMLB Life*. 2000;50: 315-321.
198. Yang Y, Sharma R, Sharma A, Awasthi S, Awasthi JC. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochimica Polonica*. 2003;50: 319-336.
199. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 2009;7239:780-783.
200. Guzman ML, Rossi RM, Karnischky L, Li X, Peterson DR, Howard DS, Jordan CT. The sesquiterpene lactone parthenolide induced apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem cells. *Blood*. 2005; 105: 4163-4169.
201. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*. 2003;17: 81-128.
202. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC. American society of clinical oncology/College of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28: 2784-96.
203. Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. *Perspectives in Cancer Research*. 1997;57: 3071-8.
204. Balic M, Rapp N, Stanzer S, Lin H, Strutz J, Szkandera J, Daidone MG, Samonigg H, Cote RJ, Dandachi N. Novel immunofluorescence protocol for multimarker assessment of putative disseminating breast cancer stem cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011. 19:33-40.
205. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Klier CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007. 1: 555-67.

206. Pearce DJ, Taussig D, Simpson C, Allen K, Rohatiner AZ, Lister TA, Bonnet D. Characterisation of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells*. 2005;23: 752-60.
207. United States Cancer Statistics: 1999-2009. Incidence and mortality web-based report. Atlanta (GA). 2010.
208. Bilten Hrvatskog Zavoda za javno zdravstvo br.35, „Incidencija raka u Hrvatskoj 2010.“
209. Lakhani SR, Ellis IA, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijer MJ. WHO Classification of Tumours of the Breast. Lyon, 2012.
210. Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M, Butterfiels DA, St. Clair DK. Collateral damage in cancer chemotherapy. *Molecular interventions*. 2007;7: 147-156.
211. Poupon MF, Lecomte M, Durand L, Fontaine JJ, Chateau-Joubert S, De Pineux G. Identification and characterisation of CD44 positive cells in tumour recurrence after chemotherapy-induced remission in basal-like human breast cancer xenografts. *Radiother Oncol*. 2009;90: 119-124.
212. Koriya S, Tijekuhiro S, Akima R, Ue H, Tsuzuki A, Nishioko A. Hydrogen peroxide enhances radiation-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Radiother Oncol*. 2009;90: 115-118.
213. Ogawa Y, Kobayashi T, Ue H, Kataoka Y, Miyataka K, Tadakoro M. Phase I study of intratumoral injection of a newly developed enzyme-targeting radio-sensitizer (KORTUC) containing hydrogen peroxide and sodium hyaluronate for breast-conservation treatment without any surgical procedure. *Radiother Oncol*. 2009;90: 73-77.
214. Gnant M, Harbeck N and Thomssen C. St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care*. 2011;6: 136-141.
215. Moharita AL, Taborga M, Corcoran KE, Bryan M, Patel PS, Rameshwar PR. SDF-1 (alpha) regulation in breast cancer cells containing bone marrow stroma is critical for normal hematopoiesis. *Blood*. 2006;108: 3245-3252.
216. Vieira HLA, Alves PM, Vercelli A. Modulation of neuronal stem cell differentiation by hypoxia and reactive oxygen species. *Progress in neurobiology*. 2001;93: 444-455.
217. Chao YM, Kwon S, Pak YK, Seol HW, Choi YM, Park do J, Park KS, Lee HK. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous

- differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348: 1472-1478.
218. Saretzki G, Armstrong L, Leake A, Lako M, von Zgalincki T. Stress defence in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells. *Stem Cells.* 2004;22: 962-971.
219. Hwang LK, Yoo KY, Han TH, Lee CH, Choi CH, Yi SS, Lee SY, Ryu PD, Yoon YS, Won MH. Enhanced cell proliferation and neuroblast differentiation in the rat hippocampal dentate gyrus following myocardial infarction. *Neurosci Lett.* 2009;450: 275-230.
220. Zhang H, Trachootham D, Lu W, Carew J, Giles FJ, Keating MJ, Arlinghaus RB, Huang P. Effective killing of Gleevec-resistant CML cells with T3151 mutation by a natural compound PEITC through redox-mediated mechanism. *Leukemia.* 2008;22: 1191-1199.
221. Naka K, Muraguchi T, Hoshii T, Hirao A. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cell. *Antiox Redox Signal.* 2008;10: 1883-1894.
222. Toyokuni S. Novel aspects of oxidative stress associated carcinogenesis. *Antiox Redox Signal.* 2006;8: 1373-1377.
223. Schmelter M, Ateghang B, Helmig S, Wartenberg M, Sauer H. Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. 2006;20: 294-306.
224. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM. WNT/ β -catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 2007;104: 618-623.
225. Efferth T, Giaisi M, Merling A, Krammer PH, Li-Weber M. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in Doxorubicin-resistant T-cell leukemia cells. *PloS ONE.* 2007;2: e693.
226. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 1991;57: 794-798.
227. Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S, Ma N, Oxidative and nitrate DNA damage in animals and patients with inflammatory disease in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biol Chem.* 2006;387: 365-372.
228. Hammond MEH, Hayes DF et al. American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2010;28: 2784-2792.

229. Dong F, Budhu AS, Wang YW. Translating the metastasis paradigm from scientific theory to clinical oncology. *Clin Cancer Res.* 2009;15: 2588-2593
230. Perez L, Danishefsky SJ. Chemistry and biology in search of antimetastatic agents. *ACS Chem Biol.* 2007;2: 159-162.
231. Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep.* 2009;61:154-171.
232. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer.* 2009;9: 665-674.
233. Millerot-Serrorot E, Guilbert M, Fourre N, Witkowski W, Said G, Gulick LV, Terryn C, Zahm JM, Garnotel R, Jeannesson P. 3D collagen type I matrix inhibits the antimigratory effect of doxorubicin. 2010;10: 26-35.
234. Srebriiskii I, Castello-Cros R, Lamb A, Golemis EA, Cukierman E. Fibroblast-derived 3D matrix differentially regulates the growths and drug-responsiveness of human cancer cells. *Matrix Biol.* 2008;27: 573-585.
235. Morin PJ. Drug resistance and the microenvironment: nature and nurture. *Drug Resist Updat.* 2003;6: 169-172.
236. Pupa SM, Giuffre S, Castiglioni F, Bertola L, Cantu M, Bongarzone I, Baldassari P, Mortarini R, Argraves WS, Anichini A. Regulation of breast cancer responses to chemotherapy by fibulin-1. *Cancer Res.* 2007;67: 4271-4277.
237. Li X, Lewis MT, Huang J. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100: 672-679.
238. Li HZ, Yi TB, Wu ZY. Suspension culture combined with chemotherapy agents for sorting of breast cancer stem cells. *BMC Cancer.* 2008;8: 135.
239. Troester MA, Hoadley KA, Sorlie T, Herbert BS, Borresen-Dale AL, Lonning PE, Shay JW, Kaufmann WK, Perou CM. Cell-type specific responses to chemotherapeutics in breast cancer. *Cancer research.* 2004;64: 4218-4226.

10. POPIS OZNAKA I KRATICA

TDLU	- terminalna duktulolobularna jedinica
ER	- estrogeni
PR	- progesteroni
DNK	- deoksiribonukleinska kiselina
RNK	- ribonukleinska kiselina
DCIS	- duktalni in situ karcinom
ATP	- adenzin 3-fosfat
ESA	- epitelni površinski antigen (od engl. epithelial surface antigen)
NOD/SCID	- nepretili dijabetičari/kombinirano imunodeficientni (od engl. nonobese diabetic/severe combined immunodeficient)
WHO	- Svjetska zdravstvena organizacija (od engl. World Health Organisation)
BRCA1	- tumor supresorski gen (od engl. breast cancer 1)
FISH	- fluorescentna in situ hibridizacija
HER2 neu/ErbB	- receptori za epidermalni faktor rasta
P53	- tumor supresorski gen
LOH	- gubitak heterozigotnosti (od engl. loss of heterozigosity)
ECM	- ekstracelularni matriks
PUFA	- višestruko nezasićene masne kiselina (od engl. Poly Unsaturated Fatty Acids)
ROS	- reaktivni kisikovi spojevi (od engl. reactive oxygen species)
GSH	- glutathion
GPX	- glutathion-peroxidaza
GST	- glutathion-S-transferaza
HNE	- 4-hidroksi-2-nonenal
MDA	- malonilaldehid
CAP	- kronični alkoholni hepatitis (od engl. chronic alcohol pancreatitis)
AML	- akutna mijeloična leukemija
CFU	- jedinica koja formira kolonije (od engl. colony forming unit)
EGF	- epitelni faktor rasta (od eng. Epithelial Growth Factor)
PDGF	- faktor rasta porijekla trombocita (od eng. Platelet- Derived Growth Factor)

FDA - Američka administracija za hranu i lijekove (od engl. American Food and Drug Administration)

MRP1 - protein otporan na brojne lijekove (od engl. Multidrug Resistance Protein 1)

11.SAŽETAK

Karcinom dojke je vodeći uzrok smrti od malignih bolesti u žena. Bitnu ulogu pri tome imaju maligne matične stanice karcinoma koje su rezistentne na kemo- i radioterapiju, te nakon diseminacije „miruju“ u organizmu do ponovne aktivacije kojom uzrokuju recidiv bolesti. Pretpostavka je ovog istraživanja da su bitni čimbenici koji utječu na ponašanje matičnih stanica karcinoma dojke okoliš u kojem se nalaze, pogotovo međustanična tvar, a također i oksidacijski stres koji ima bitnu ulogu u razvoju, ali i u terapiji karcinoma dojke. U ovom je radu analiziran utjecaj kolagena, temeljnog proteina međustanične tvari, te utjecaj oksidacijskog stresa na *in vitro* rast i diferencijaciju matičnih stanica ljudskog karcinoma dojke. Rezultati su pokazali kako oksidirani kolagen uzrokuje diferencijaciju matičnih stanica karcinoma dojke, mjereno smanjenjem markera matičnih tumorskih stanica i povećanjem hormonskih receptora. Međutim, uočeno je i da oksidacijski stres uzrokovan doksorubicinom može uzrokovati povećanje proliferacije i smanjenje diferencijacijskih markera. Stoga rezultati ovog istraživanja proširuju temeljne spoznaje o utjecaju oksidacijskog stresa na rast i diferencijaciju matičnih stanica karcinoma dojke i ukazuju na do sada nepoznato djelovanje citostatika doksorubicina koji može smanjiti, ali i povećati malignost matičnih tumorskih stanica.

12. ABSTRACT

Breast cancer accounts for the leading cause of cancer-related death among women. It is believed that malignant stem cells play important role, because they are resistant to chemo- and radiotherapy. After dissemination, they remain quiescent in the organism and after a certain period of time cause relaps of the disease. In this research, we presumed that major factors that influence breast cancer stem cells are stem cell niche, specially extracellular matrix, as well as oxydative stress with its major role in not only the development of breast cancer but also in its therapy. We have analyzed the influence of collagen, as the most abundant protein of the extracellular matrix, and oxydative stress on *in vitro* growth and differentiation of the breast cancer stem cells, as measured by the expression of steroid receptors and depletion of the stem cell phenotype. However, oxydative stress caused by doxorubicin may increase proliferation and decrease markers of differentiation. Therefore, the results of this research offer a new insight in the influence of oxydative stress on growth and differentiation of the breast cancer stem cells, along with newly discovered effects of doxorubicin which can diminish, but also increase malignancy of the tumor stem cells.

13. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Rođena sam u Zagrebu 18. svibnja 1973. godine. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja upisala sam studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala sam 1999. godine te stekla zvanje doktora medicine. Nakon završenog staža, 2001. godine sam položila stručni ispit pred ispitnom komisijom Ministarstva Zdravstva RH. Stekla sam stručnu osposobljenost za samostalan rad na poslovima doktora medicine. 2003. godine dobila sam specijalizaciju iz patološke anatomije u KB Merkur te istu završila 2007. godine polaganjem specijalističkog ispita. U sklopu specijalizacije sam završila poslijediplomski stručni studij iz područja patologije. Od 2007. godine zaposlena sam na Zavodu za onkološku patologiju, Klinike za Tumore, KBC Seste Milosrdnice.

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Sveučilišta u Dubrovniku i Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu upisala sam 2010. godine prelaskom sa poslijediplomskog studija Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Sudjelovala sam na više znanstvenih skupova u Republici Hrvatskoj i inozemstvu.

POPIS PUBLIKACIJA U CC-u:

1. M.Perić Balja, D.V.Vrdoljak, M.Stanec, **S.Šitić**, D.Krleža Supić, F.Knežević. Rectal metastases from lobular carcinoma of the breast: a case report, Coll Antropol. 2010;34: 719-721.
2. I.Cvjetko, B.Kocman, **S.Šitić**. Inflammatory Malignant Fibrous Histiocytoma of the Retroperitoneum, Coll Antropol. 2011;35: 1401-1404.
3. A.Cipak, L.Mrakovic, M.Ciz, A.Lojek, B.Mihaylova, I.Goshev, M.Jaganjac, M.Cindrić, **S.Šitić**, M.Margaritoni, G.Waeg, M.Balić, N.Žarković. Growth suppression of human breast carcinoma stem cells by lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal and hydroxyl radical.modified collagen. Acta Biochimica Polonica. 2010;57:165-171.

4. F.Knezevic, V.Duancic, **S. Sitic**, A.Horvat-Knezevic, A.Benkovic, S.Ramic, K.Kostovic, V.Ramljak, DV Vrdoljak. Histological types of polypoid cutaneous melanoma II. Coll Antropol. 2007;2: 153-156.
5. **S.Sitic**, P.Korac, P.Peharec, G.Zovko, M. Milkovic Perisa, S.Gasparov. Bcl-2 and MALT1 genes are not involved in the oncogenesis of uterine tumors resembling ovarian sex cord stromal tumors. Pathol Oncol Res. 2007;2: 153-6.
6. M.Ajduk, D.Mikulic, B.Sebecic, S.Gasparov, L.Patrlj, E.Erdelez, A.Skopljanac, M.Staresinic, S.Deskovic, T.Sosa **S.Sitic**. Spontaneously ruptured gastrointestinal stromal tumor (GIST) of the jejunum mimicking acute appendicitis. Coll Antropol. 2004;2:937-41.

RAD U SCI-u

1. **Sitic S**, Mirt- Dabic M, Brčić L, Hutinec Z, Kruslin B. DNA ploidy in thymoma and associated multiple primary malignancies in the same patient. Acta Clin Croat. 2008 (3) 155-9.

KONGRESNI SAŽECI U ZBRORNICIMA RADOVA

Gašparov S, Džebro S, Korać P, Šitić P, Borovečki A, Kušec R, Dominis M. Post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD)- case report. Book of abstracts, 3rd Croatian Congress of Pathology and Forensic Medicine, 2005.

Šitić S, Džebro S, Borovečki A, Zovko G; Gašparov S. Uterine tumor resembling ovarian sex cord stromal tumours. Book of abstracts, 3rd Croatian Congress of Pathology and Forensic Medicine, 2005.

Šitić S, Brčić L, Juroš I, Nikolić B, Krušlin B. Thymoma associated with multiple primary neoplasms in a single patient. Book of abstracts. 17th Ljudevit Jurak International Symposium of Comparative Pathology, 2006.

Pešut A, Gašparov S, Džebro S, Šitić S, Milković M, Dominis M. Cutaneous pseudolymphomas.
Book of abstracts .14th Ljudevit Jurak International Symposium of Comparative Pathology,
2003.