



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

**Данијела Цветковић**

**УЛОГА МОЛЕКУЛАРНИХ МЕХАНИЗАМА НЕОАНГИОГЕНЕЗЕ**  
**КАО ТУМОР МАРКЕРА У ИНДИВИДУАЛИЗАЦИЈИ ТЕРАПИЈЕ**  
**ПАЦИЈЕНАТА СА КАРЦИНОМОМ ДОЈКЕ**

**Докторска дисертација**

**Крагујевац, 2017. године**

## Докторска дисертација

<b><i>I Аутор</i></b>
Име и презиме: Данијела М Цветковић
Датум и место рођења: 07.03.1982. године у Руми
Садашње запослење: Институт за биологију и екологију, звање истраживач-сарадник, Природно-математички факултет у Крагујевцу
<b><i>II Докторска дисертација</i></b>
Наслов: Улога молекуларних механизма неоплазме као тумор маркера у индивидуализацији терапије пацијената са карциномом дојке
Број страница: 197
Број слика: 39 графикона, 25 слика, 11 табела
Број библиографских података: 385 референци и 14 интернет извора.
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Биологија, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија, карцином дојке; УДК: 577.2:591.1(497.11); 618.19-006.6(497.11) (Биологија, Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија, карцином дојке, Србија).
Ментор: Др Снежана Марковић, доцент Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу
<b><i>III Оцена и одбрана</i></b>
Датум пријаве теме: 09.09.2015. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-01-485/10; 09.09.2015. године
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: <ol style="list-style-type: none"><li>1. <b>Др Снежана Марковић, доцент</b>, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија;</li><li>2. <b>Др Оливера Милошевић-Ђорђевић, редовни професор</b>, председник Комисије, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа област: Генетика и еволуција;</li><li>3. <b>Др Ненад Филиповић, редовни професор</b>, Факултет инжењерских наука, Универзитет Крагујевцу, ужа научна област: Примењена механика и примењена информатика и рачунарско инжењерство;</li><li>4. <b>Др Срђан Нинковић, доцент</b>, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Хирургија;</li><li>5. <b>Др Ивана Гађански, доцент</b>, Иновациони центар Машинског факултета, Универзитет у Београду; Метрополитан универзитет, Београд, ужа научна област: Теквено инжењерство;</li></ol>

Комисија за оцену докторске дисертације:

- 
- 1 **Др Оливера Милошевић-Ђорђевић, редовни професор**, председник Комисије  
Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу  
ужа област: Генетика и еволуција;
- 
- 2 **Др Милена Милутиновић, научни сарадник**,  
Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу  
научна област: Биологија
- 
- 3 **Др Ненад Филиповић, редовни професор**,  
Факултет инжењерских наука, Универзитет у Крагујевцу  
ужа научна област: Примењена механика и примењена информатика и рачунарско инжењерство;
- 
- 4 **Др Срђан Нинковић, доцент**,  
Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу  
ужа научна област: Хирургија;
- 
- 5 **Др Ивана Гађански, доцент**,  
BioSense Институт, Универзитет у Новом Саду,  
Метрополитан универзитет, Београд,  
ужа научна област: Теквно инжењерство;

Датум одбране дисертације:

*Докторска дисертација*

*.....Породици*

## **Захвалница**

*Експериментални део истраживања реализован је у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Истраживање представљало део пројеката Министарства на науку и образовање Републике Србије број III41010 и III41007. Узорци (туморско и перитуморско ткиво) су сакупљани у сарадњи са Клиником за општу и грудну хирургију и Службом за патолошку анатомску дијагностику Клиничког Центра у Крагујевцу. Креирање и обрађивање резултата нумеричког модела у овом истраживању остварено је у сарадњи са тимом истраживача под ингеренцијом проф др Ненада Филиповића, редовног професора, Факултета инжењерских наука у Крагујевцу.*

*Огромну захвалност дугујем свом ментору проф. др Снежани Марковић, доценту Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, на знању које ми је преносила током израде докторске дисертације и несебичној помоћи коју ми је пружила. Захваљујем се за велико разумевање и драгоцене савете који су омогућили да ова дисертација буде успешно финализована.*

*Захваљујем се професору, др Ненаду Филиповићу, редовном професору Факултета инжењерских наука у Крагујевцу на указаном поврењу и дивној сарадњи током свих ових година мог стручног и личног напредовања. Његово искуство, пријатељство и подршка били су ми од пресудног значаја да истрајем у напорном раду.*

*Желела бих да се захвалим свим члановима комисије проф.др Оливери Милошевић-Борђевић, редовном професору, Природно-математичког факултета у Крагујевцу, др Милени Милутиновић, научном сараднику, Природно-математичког факултета у Крагујевцу, др Ненаду Филиповићу, редовном професору, Факултета инжењерских наука у Крагујевцу, др Срђану Нинковићу, доценту, Факултета медицинских наука у Крагујевцу и др Ивани Гађански, доценту, BioSense Института, Универзитета у Новом Саду, на несебичној помоћи, сарадњи, идејама и драгоценим сугестијама током целокупне реализације ове докторске дисертације.*

*Захваљујем се својим колегама из Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију на Природно-математичком факултету у Крагујевцу на великој помоћи и позитивној атмосфери током експерименталног рада. Посебно се захваљујем пријатељима Милени Милутиновић, Данијели Никодијевић и др Бојану Милошевићу на љубави, бескрајном стрпљењу, разумевању и подршци без којих бих тешко успела да савладам све изазове са којима сам се сусретала током израде овог рада.*

*На крају, посебну захвалност дугујем својој породици Александру, Драгану, Живки, Милицы, Милошу и својим родитељима на љубави, разумевању и подршци у сваком тренутку свог живота. И највећу захвалност дугујем својој ћеркици Анастасији, зато што је унела смисао у мој живот.*

***Данијела Цветковић***

*Улога молекуларних механизма неоангиогенезе као тумор маркера у индивидуализацији терапије пацијената са карциномом дојке*

**РЕЗИМЕ**

Карцином дојке је водећи узрок смртности жена широм света када су у питању малигне болести. Светска здравствена организација је проценила да ће у овом веку свака 8. жена на планети оболети од ове болести. Упркос оствареном напретку у дијагностици и лечењу, очигледан је висок морбидитет и морталитет од карцинома дојке, тако да су неопходни нови приступи у лечењу ове болести. Чињеница је да су данашњи онколошки протоколи превише крути и апроксимативни и донекле занемарују особености пацијента и биологију тумора сваког пацијента. Стога се тежи индивидуализацији/персонализацији терапије, која ће одговарати биолошком профилу сваког пацијента понаособ, што би водило увођењу нових и побољшању постојећих онколошких протокола лечења. За то је неопходан мултидисциплинарни приступ, у коме ће сарађивати експерти из различитих области, а који укључује *data mining* системе за обраду података и обећавајуће, али недовољно истражене модалитете лечења, као што су електропорација, електрохемиотерапија и фитотерапија.

Први део истраживања представља проспективну студију која укључује пацијенте са дијагнозом карцинома дојке КЦ Крагујевац у петогодишњем периоду праћења. Током операције која се рутински изводи на Клиници за општу и грудну хирургију у КЦ Крагујевац узимани су узорци карцинома дојке и перитуморског ткива, а потом су поред стандардних патохистолошких прегледа спроведене и додатне анализе: одређивање концентрације металопротеиназе 9 (MMP-9); испитивање генске експресије параметара неоангиогенезе *VEGF-A*, *HIF-1*, *CXCL-12* и *iNOS* (*Quantitative/Real Time PCR*) и протеинске експресије имунофлуоресцентном методом (*VEGF<sub>165b</sub>* и *CXCR-4*). Други део истраживања, представља *in vitro* испитивање нових видова терапије-електропорације и електрохемиотерапије на карциномским (MDA-MB-231, MCF-7, SW-480, HCT-116) и здравим (MRC-5, HUVEC и hAoSm) имортализованим ћелијским линијама. Цитотоксични ефекти електропорације и електрохемиотерапије на испитиваним ћелијским линијама, праћени су у реалном времену, применом *xCELLigence* система (*Real Time Cell Analysis-RTCA*), као и на основу анализирања типа ћелијске смрти акридин оранж/етидијум бромид микроскопском методом. У циљу проналажења нових антинеопластичних третмана карцинома дојке, испитивано је антиинвазивно дејство екстраката листова инвазивних биљака

*Robinia pseudoacacia* (L) и *Amorpha fruticosa* (L) на MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама, праћењем релативне експресије *MMP-9*, *VEGF-A*, *HIF-1 $\alpha$* , *CXCL-12* и *iNOS* гена (*Quantitative/Real Time PCR* методом). За *data mining* обраду података су коришћени софтвери (*Machine Learning Techniques*) који су тренирани за конкретан проблем предикције рецидива и метастаза, као најзначајније прогностичке параметре исхода болести.

Наша студија јасно указује да карцином изазива промене у туморском и перитуморском ткиву детектабилне на молекуларном, али не и на патохистолошком нивоу. Није довољна само детаљна анализа туморског, већ обавезно и перитуморског ткива, јер се често значајније промене на молекуларном нивоу дешавају у микроокружењу карцинома. Перитуморско ткиво није само пасиван чинилац, већ активно учествује у процесу раста и развоја тумора, као и у процесима рецидивирања и појаве метастаза. Маркери неоангиогенезе у туморском и перитуморском ткиву као што су концентрација *MMP-9*, експресија *VEGF-A*, *CXCL-12*, *HIF-1* и *iNOS* гена као и протеинска експресија *VEGF* и *CXCR-4* рецептора, могу послужити као поуздани предиктори исхода болести код пацијената са карциномом дојке, што може дати корисне сугестије у избору третмана. Електропорација и електрохемиотерапија су на изучаваним ћелијским линијама дале обећавајуће резултате, нарочито у компарацији ефеката између карциномских и здравих ћелија, што као резултат ове дисертације доприноси увођењу ових метода у клиничку праксу. Третмани екстрактима инвазивних врста биљака *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* су показали антиинвазивно дејство на карциномске ћелијске линије. *Data-mining* техника обраде података заснована на компјутерским експертским системима вештачке интелигенције може обрадити претходно наведене изучаване параметре, тако да кориснички оријентисан софтвер изврши веома тачну предикцију исхода болести у смислу појаве рецидива тумора и метастаза, што је веома корисно за лекаре при доношењу одлуке о даљим модалитетима лечења. На овај начин, комбинацијом клиничких, патохистолошких и молекуларних параметара туморског и перитуморског ткива као *input* параметара за *data mining* софтвер можемо са великом вероватноћом (око 90%) предвидети да ли ће код сваког појединачног пацијента доћи до појаве метастаза или рецидива болести, са свим импликацијама на избор оптималног онколошког третмана.

Коришћењем описане методологије креира се биолошки и молекуларни профил тумора за сваког појединачног пацијента, што води индивидуализацији онколошке терапије, која неће одговарати само ригидним протоколима, већ биолошким карактеристикама тумора. Додатни видови лечења као што су електропорација, електрохемиотерапија и фитотерапија могу значајно

## *Докторска дисертација*

повећати квалитет онколошког тремана. *Data mining* методологија је веома корисна, јер аутоматизовано, али свакако уз надзор искусног клиничара може извршити селекцију најзначајнијих параметара, који имају утицаја у процесу туморогенезе и метастазирања.



**The role of molecular mechanisms of neoangiogenesis as tumor markers in the treatment individualization of breast cancer patients**

**SUMMARY**

Breast cancer is the leading cause of mortality related to cancer among women around the world. The World Health Organization estimated that in this century, every eighth woman on the planet will be affected by this disease. Despite the progress made in diagnosis and treatment, high morbidity and mortality from breast cancer is evident, so new approaches are needed in the treatment of this disease. The fact is that today's oncology protocols are too rigid and approximate and somewhat neglect the patient's specificity and biology of the tumor of each patient. It therefore seeks individualization / personalization of therapy, corresponding to the biological profile of each patient individually, which would lead to the introduction of the new and improvement of the existing oncological protocols. This requires a multidisciplinary approach, with collaboration of experts from different fields, which will include *data mining* systems for data processing as well as promising, but so far insufficiently investigated treatment modalities, such as electroporation, electrochemotherapy and phytotherapy.

The first part of the study is a prospective study involving patients with breast cancer diagnosis at CC Kragujevac in a five-year follow-up period. During the surgery performed routinely at the Clinic for General and Chest Surgery in CC Kragujevac, samples of breast and peritumor tissue were taken, followed by the analyzes in addition to standard pathohistological examinations: determining the concentration of metalloproteinase 9 (MMP-9); gene expression of neoangiogenesis parameters of *VEGF-A*, *HIF-1*, *CXCL-12* and *iNOS* (Quantitative / Real Time PCR) and protein expression using the immunofluorescence method (VEGF165b and CXCR-4). The second part of the study is an in vitro examination of new forms of therapy-electroporation and electrochemotherapy in cancer (MDA-MB-231, MCF-7, SW-480, HCT-116) and healthy (MRC-5, HUVEC and hAoSm) immortalized cell lines. The cytotoxic effects of electroporation and electrochemotherapy on the examined cell lines were monitored in real time by using the xCELLigence system (*Real Time Cell Analysis-RTCA*) as well as by analyzing the cell-death by acridine orange/ethidium bromide microscopic method. In order to find new antineoplastic breast cancer treatments, the anti-invasive effects of leaf extracts of *Robinia pseudoacacia* (L) and *Amorpha fruticosa* (L) invading plants on MRC-5 and MDA-MB-231 cells were studied, followed by gene expression of *MMP-9*, *VEGF-A*, *HIF-1 $\alpha$* , *CXCL-12*, and *iNOS* (Quantitative / Real

Time PCR method). For *data mining*, data processing was used (Machine Learning Techniques) trained for the specific problem of recurrence and metastasis prediction as the most important prognostic parameters of the disease outcome.

Our study clearly indicates that cancer causes changes in the tumor and peritumor tissue detectable on the molecular but not at the pathohistological level. Therefore, detailed analysis not only of tumor but also of the peritumor tissue should be obligatory because often significant changes at the molecular level occur in the microenvironment of the carcinoma. Peritumor tissue is not only a passive factor, but actively participates in the process of tumor growth and development, as well as in relapse and metastasis processes. Markers of neoangiogenesis in tumor and peritumor tissue such as MMP-9 concentration, expression of *VEGF-A*, *CXCL-12*, *HIF-1* and *iNOS* gene as well as protein expression of VEGF and CXCR-4 receptors can serve as reliable predictors of disease outcome in patients with breast cancer, which can give useful suggestions in the choice of treatment. Electroporation and electrochemotherapy have yielded promising results on the studied cell lines, especially comparing the effects between cancer and healthy cells, contributing this way to the introduction of these methods into clinical practice. Treatments with extracts of invasive plant species *Robinia pseudoacacia* and *Amorpha fruticosa* have shown anti-invasive effects on cancer cell lines. *The data mining* processing technique based on computer artificial intelligence systems can process the previously mentioned parameters so that user-oriented software performs a very accurate prediction of the disease outcome in terms of tumor recurrence and metastases, which is very useful for doctors when deciding on further treatment modalities. In this way, by combining the clinical, pathohistological and molecular parameters of tumor and peritumor tissue as input parameters for *data mining* software, we can predict with high probability (about 90%) whether there will be a metastasis or recurrence of the disease in each individual patient with all implications on the choice of optimal oncological treatment.

Using the described methodology, the biological and molecular profile of the tumor is created for each individual patient, leading to individualization of oncology therapy, which will not only correspond to rigid protocols but biological characteristics of the tumor as well. Additional treatments such as electroporation, electrochemotherapy and phytotherapy can significantly increase the quality of oncological treatment. *Data mining* methodology is very useful because in an automated fashion, but certainly with the supervision of an experienced clinician, it can perform the selection of the most important parameters, which have an influence on the tumor growth and metastasis process.

**САДРЖАЈ:**

<b>I УВОД</b> .....	1
1. Опште карактеристике и карцином дојке .....	1
1.1 Ембриологија дојке.....	1
1.2 Грађа дојке.....	2
1.3 Карцином дојке - (Carcinoma mamme).....	2
1.4 Епидемиологија карцинома дојке .....	3
1.5 Етиологија карцинома дојке .....	5
1.6 Макроскопске карактеристике малигнух тумора дојке.....	6
1.7 Микроскопске карактеристике малигнух ћелија .....	7
1.8 Класификација тумора дојке.....	8
1.9 Патохистолошка испитивања карцинома дојке - TNM класификација .....	9
1.10 Молекуларни механизми карцинома дојке .....	13
1.11 Епигенетски механизми.....	16
2. Ангиогенеза - настанак и развој крвних судова .....	18
2.1 Биомаркери ангиогенезе - Матрикс металопротеиназа-9 .....	21
2.2 Васкуларни ендотелијални фактор раста-VEGF.....	25
2.3 Хипоксија у малигнух ћелијама и HIF .....	28
2.4 Сигнални пут CXCL-12 / CXCR-4.....	32
2.5 Азот моноксид и реактивне врсте азота (RNS) .....	36
3. Ћелијске линије као модел системи за изучавање карцинома дојке и тестирање нових терапијских модалитета .....	41
3.1 Електропорација и електрохемиотерапија .....	43
3.2 Преклиничка испитивања биоактивних супстанци.....	44
3.2.1 Биљке са антитуморским својствима .....	45
4. Data-mining .....	48
<b>II ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	50
<b>III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	52
1. Хемикалије и реагенси.....	52
2. Критеријуми за укључивање пацијената у студију .....	53
3. Припрема узорака ткива .....	53
3.2 Одређивање концентрације протеина методом по Lowry-у.....	54
3.3 Одређивање концентрације металопротеиназе 9 (MMP-9).....	54
3.4. Одређивање протеинске експресије VEGF и CXCR-4 рецептора на мембрани.....	55
3.4.1 Припрема препарата за бојење .....	55
3.4.2 Имунофлуоресценца.....	56
4. Испитивање експресије информационе РНК за <i>β-actin</i> , <i>VEGF-A</i> , <i>HIF-1</i> , <i>CXCL-12</i> и <i>iNOS</i> гене	57
4.1. Изолација рибонуклеинске киселине из ткива и ћелија .....	57
4.2. Реверзна транскрипција (RT-PCR) .....	58
4.3. Квантитативна ланчана реакција полимеразе (qRT-PCR).....	58
5. Ћелијске линије као модел системи – потенцијални видови терапије .....	60
5.1. Ћелијске линије као модел систем .....	60
5.2. Електропорација и електрохемиотерапија.....	62
5.2.1. Праћење ћелијске вијабилности xCELLigence технологијом ( <i>Real Time Cell Analysis-RTCA</i> ) .....	62
5.2.2. Акридин оранж/етијидијум бромид микроскопска метода .....	64

5.3.	Генска експресија параметара инвазивности након третмана биоактивним супстанцама .....	64
6.	Статистичка обрада резултата.....	65
7.	Data mining.....	66
7.1.	Проблем: предвиђање појаве метастазе .....	67
<b>IV</b>	<b>РЕЗУЛТАТИ</b> .....	<b>69</b>
1.	Молекуларни параметри неоангиогенезе код пацијената са карциномом дојке .....	69
1.1	Концентрација MMP-9 у перитуморском и карциномском ткиву пацијената са карциномом дојке .....	70
1.2	Испитивање релативне експресије информационе РНК гена укључених у неоангиогенетске процесе .....	75
1.2.1	Експресија иРНК за $\beta$ -actin и релативне експресије испитиваних гена неоангиогенезе .....	75
1.2.2	Релативна експресија иРНК VEGF-A гена .....	77
1.2.3	Релативна експресија иРНК HIF-1 $\alpha$ гена.....	80
1.2.4	Релативна експресија иРНК CXCL-12 гена.....	83
1.2.5	Релативна експресија иРНК iNOS гена .....	85
1.3	Протеинска експресија CXCR-4 и VEGF рецептора у перитуморском и туморском ткиву код пацијената са карциномом дојке .....	88
1.3.1	Протеинска експресија CXCR-4 .....	88
1.3.2	Протеинска експресија VEGF165b рецептора .....	91
2.	Примена нестандартних модалитета лечења.....	93
2.1	Цитотоксични ефекти електропорације на карциномским и здравим ћелијским линијама .....	93
2.1.1	Ефекти електропорације на вијабилност ћелијских линија и процена цитотоксичности .....	93
2.1.3	Ефекат електрохемиотерапије на ћелијским линијама карцинома дојке.....	103
2.2	Ефекти екстраката биљака на параметре неоангиогенезе у ћелијским линијама MRC-5 и MDA-MB-231 .....	108
3.	Data-mining.....	112
3.1	Прогноза преживљавања.....	113
3.2	Предикција рецидива и метастазе карцинома дојке .....	115
3.3	Предикција метастаза карцинома дојке .....	116
<b>V</b>	<b>ДИСКУСИЈА</b> .....	<b>119</b>
	Ефекат електрохемиотерапије на ћелијским линијама.....	145
<b>VI</b>	<b>ЗАКЉУЧЦИ</b> .....	<b>154</b>
<b>VII</b>	<b>ЛИТЕРАТУРА</b> .....	<b>158</b>
<b>ПРИЛОЗИ</b>	.....	<b>181</b>

## **Списак слика, табела и графикона**

**Слика 1.** Развој жлезданог ткива дојке.

**Слика 2.** АнатоМСки изглед дојке.

**Слика 3.** Процент морбидитета од малигнух тумора код жена у Централној Србији до 2012. године.

**Слика 4.** Процент морталитета од малигнух тумора код жена у Централној Србији до 2012. године

**Слика 5.** Шематски приказ разлика између нормалних и карциномских ћелија.

**Слика 3.** Процент морбидитета од малигнух тумора код жена у Централној Србији до 2012. године.

**Слика 4.** Процент морталитета од малигнух тумора код жена у Централној Србији до 2012. године

**Слика 5.** Шематски приказ разлика између нормалних и карциномских ћелија.

**Слика 6.** TNM класификација.

**Слика 7.** Експресија хуманог епидермалног фактора раста у нормалној и карциномској ћелији.

**Слика 8.** Сигнални пут HER-2.

**Слика 9.** Процент добијања карцинома са мутацијама на BRCA генима .

**Слика 10.** Метилација CpG острвца.

**Слика 11.** Неоангиогенеза иницирана туморским растом.

**Слика 12.** Механизми туморске неоангиогенезе.

**Слика 13.** Физиолошки процес формирања нових крвних судова.

**Слика 14.** Деградација базалне мембране и екстрацелуларног матрикса.

**Слика 15.** VEGF у карциному дојке.

**Слика 16.** Ремоделирање екстрацелуларног матрикса.

**Слика 17.** Последице хипоксичних услова у ћелији .

**Слика 18.** Улога CXCR-4 код карцинома дојке.

**Слика 19.** Молекуларни механизми раста, инвазије, метастазе и неоангиогенезе код тумора.

**Слика 20.** Протеинска експресија CXCR-4 рецептора у перитуморском (II колона) и ткиву карцинома (I колона) код пацијената са карциномом дојке.

**Слика 21.** Протеинска експресија VEGF рецептора у перитуморском (II колона) и ткиву карцинома (I колона) код пацијената са карциномом дојке.

**Слика 22.** Типичне морфолошке промене на MDA-MB-231 (1), SW-480 (2), HCT-116 (3), MRC-5 (4), hAoSm (5) и HUVEC (6) ћелијама, добијене флуоресцентним бојењем АО/ЕВ методом на микроскопу, увећанање 400×.

**Слика 23:** Молекуларни механизми неоангиогенезе код пацијената са карциномом дојке

**Слика 24.** Протеинска експресија CXCR-4 рецептора у перитуморском (II колона) и ткиву карцинома (I колона) код пацијената са карциномом дојке.

**Слика 25.** Протеинска експресија VEGF рецептора у перитуморском (II колона) и ткиву карцинома (I колона) код пацијената са карциномом дојке.

**Табела 1.** Хистолошка класификација тумора дојке према светској здравственој организацији.

**Табела 2.** Оцена класификатора.

**Табела 3.** Клиничко-патолошке карактеристике пацијенткиња са карциномом дојке.

**Табела 4.** Разлике у релативној експресији иРНК *VEGF-A*, *HIF-1 $\alpha$* , *CXCL-12* и *iNOS* гена између перитуморског и туморског ткива код пацијената са карциномом дојке.

**Табела 5.** Цитотоксичност третмана електропорацијом - IC<sub>50</sub> вредности (Vcm<sup>-1</sup>) за MDA-MB-231, SW-480, HCT-116, MRC-5, hAoSm и HUVEC ћелије након 6, 24 и 72 h.

**Табела 6.** Квантификација вијабилних, апоптотских и некротских MDA-MB-231, SW-480, HCT-116, MRC-5, hAoSM и HUVEC ћелија мерених АО/ЕВ методом на флуоресцентном микроскопу, 24 сата након електропорације.

**Табела 7.** Цитотоксичност *наклитаксела* и електрохемиотерапије - IC<sub>50</sub> вредности ( $\mu$ M) за MDA-MB-231 и MCF-7 ћелије након 24 и 72 h.

**Табела 8.** Релативна експресија иРНК за *MMP-9*, *VEGF-A*, *HIF-1 $\alpha$* , *CXCL-12* и *iNOS* гена у нетретираним, контролним MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама.

**Табела 9.** Резултати тестирања класификационих модела за проблем преживљавања коришћењем читавог сета података.

**Табела 10.** Резултати тестирања класификационих алгоритама када је у питању рецидив болести.

**Табела 11.** Предложен класификатор је SVM (*Support Vector Machine*) алгоритмом.

**Графикон 1.** Концентрација укупне матрикс металопротеиназе-9 у перитуморском и туморском ткиву за све испитиване пацијенате са карциномом дојке.

**Графикон 2.** Средња вредност концентрације матрикс металопротеиназе-9 у перитуморском и туморском ткиву код испитиваних пацијената са карциномом дојке.

**Графикон 3.** Концентрација укупне матрикс металопротеиназе-9 у перитуморском и карциномском ткиву код карцинома дојке у односу на тип карцинома, чистоћу маргина, старост пацијента и статус хормонских рецептора.

**Графикон 4.** Концентрација укупне матрикс металопротеиназе-9 у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на TNM класификацију.

**Графикон 5.** Експресија иРНК  *$\beta$ -actin* гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке.

**Графикон 6.** Релативна експресија иРНК *VEGF-A*, *HIF-1 $\alpha$* , *CXCL-12* и *iNOS* гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке.

**Графикон 7.** Релативна експресија иРНК *VEGF-A* гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на клиничко-патолошке карактеристике.

**Графикон 8.** Релативна експресија иРНК *VEGF-A* гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на TNM класификацију и хистолошки градус.

**Графикон 9.** Релативна експресија иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на клиничко-патолошке карактеристике.

**Графикон 10.** Релативна експресија иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на TNM класификацију и хистолошки градус тумора.

**Графикон 11.** Релативна експресија иРНК *CXCL-12* гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на клиничко-патолошке карактеристике.

**Графикон 12.** Релативна експресија иРНК *CXCL-12* гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на TNM класификацију и хистолошки градус тумора.

**Графикон 13.** Релативна експресија иРНК *iNOS* гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на клиничко-патолошке карактеристике.

**Графикон 14.** Релативна експресија иРНК *iNOS* гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на TNM класификацију и хистолошки градус тумора.

**Графикон 15.** Ефекти електропорације на ћелијској линији карцинома дојке MDA-MB-231 (а). Анализирање ефеката електропорације након 6, 24 и 72 сата (б).

**Графикон 16.** Ефекти електропорације на ћелијској линији карцинома колона SW-480 (а). Анализирање ефеката електропорације након 6, 24 и 72 сата (б).

**Графикон 17.** Ефекти електропорације на ћелијској линији карцинома колона HCT-116 (а). Анализирање ефеката електропорације након 6, 24 и 72 сата (б).

**Графикон 18.** Ефекти електропорације на здравој ћелијској линији хуманих фибробласта, MRC-5 (а). Анализирање ефеката електропорације након 6, 24 и 72 сата (б).

**Графикон 19.** Ефекти електропорације на здравој ћелијској линији примарних мишићних ћелија аорте, hAoSm (а) Анализирање ефеката електропорације након 6, 24 и 72 сата (б).

**Графикон 20.** Ефекти електропорације на здравој ћелијској линији хуманих ендотелних ћелија из умбиликалне вене, HUVEC (а). Анализирање ефеката електропорације након 6, 24 и 72 сата (б).

**Графикон 21.** *Real time* праћење цитотоксичних ефеката *паклитаксела* (а) и електрохемиотерапије (б) на ћелијској линији карцинома дојке MDA-MB-231.

**Графикон 22.** *Real time* праћење цитотоксичних ефеката *паклитаксела* и комбиноване електрохемиотерапије код MDA-MB-231 ћелијске линије карцинома дојке, након 24 (а) и 72 сата (б) од третмана.

**Графикон 23.** *Real time* праћење цитотоксичних ефеката *паклитаксела* (а) и електрохемиотерапије (б) код ћелијских линија карцинома дојке MCF-7.

**Графикон 24.** *Real time* праћење цитотоксичних ефеката *паклитаксела* и електрохемиотерапије код MCF-7 ћелијске линије карцинома дојке, након 24 (а) и 72 сата (б) од третмана.

**Графикон 25.** Ефекти екстраката биљака *R. pseudoacacia* и *A. fruticosa* на експресију иРНК *MMP-9* гена у MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 сата од третмана.

**Графикон 26.** Ефекти екстраката биљака *R. pseudoacacia* и *A. fruticosa* на генску експресију иРНК *VEGF-A* гена у MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 сата од третмана.

**Графикон 27.** Ефекти екстраката биљака *R. pseudoacacia* и *A. fruticosa* на експресију *HIF-1a* гена у MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 сата од третмана.

**Графикон 28.** Ефекти екстраката биљака *R. pseudoacacia* и *A. fruticosa* на експресију иРНК *CXCL-12* гена у MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 сата од третмана.

**Графикон 29.** Анти-инвазивна активност екстраката биљака *R. pseudoacacia* и *A. fruticosa* на експресију иРНК *iNOS* гена у MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 сата од третмана.

**Графикон 30.** Двадесет одабраних параметара који су имали највећи утицај на исход болести.

**Графикон 31.** ROC крива за коришћење класификационих алгоритама обрадом редукованог сета параметара.

**Графикон 32.** ROC крива класификационог алгорита за предикцију појаве рецидива карцинома дојке.

**Графикон 33.** Најбоље рангирани атрибути у предикцији метастаза код пацијената са карциномом дојке.

**Графикон 34.** ROC крива класификационог алгоритма за предикцију појаве метастаза код пацијената са карциномом дојке.

**Графикон 35.** Нумеричка симулација дистрибуције вијабилних ћелија и концентрације кисеоника на ћелијској линији карцинома колона SW-480. Анализирање нетретираних ћелија након 6, 24, 48 и 72 сата.

**Графикон 36.** Нумеричка симулација ефекта електропорације на ћелијској линији карцинома колона SW-480. Анализирање ефеката електропорације ( $250 \text{ Vcm}^{-1}$ ) након 6, 24, 48 и 72 сата.

**Графикон 37.** Нумеричка симулација ефекта електропорације на ћелијској линији карцинома колона SW-480. Анализирање ефеката електропорације ( $375 \text{ Vcm}^{-1}$ ) након 6, 24, 48 и 72 сата.

**Графикон 38.** Нумеричка симулација ефекта електропорације на ћелијској линији карцинома колона SW-480. Анализирање ефеката електропорације ( $500 \text{ Vcm}^{-1}$ ) након 6, 24, 48 и 72 сата.

**Графикон 39.** Нумеричка симулација ефекта електропорације на ћелијским линијама MDA-MB-231, SW-480, HCT-116 и MRC-5. Анализирање ефеката електропорације у току 72 сата.



## Скраћенице:

АО - <i>Acridine orange</i>	ML - <i>Machine Learning</i>
AP-1 - активатор протеин-1	mtNOS - митохондријална азот-моноксид синтетаза
АТР - аденозинтрифосфат	NF $\kappa$ B - <i>Nuclear Factor Kappa B-NF-kB</i>
ARNT - <i>Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i>	nNOS - неуронална азот-моноксид синтетаза
ATCC - <i>The American Type Culture Collection</i>	NO- азот-моноксид
BASC - <i>BRCA1-associated genome surveillance complex</i>	NOS – азот-моноксид синтетаза
BRCA1 - <i>BReast Cancer 1</i>	NRF - нуклеарног респираторног фактора-1
BRCA2 - <i>BReast Cancer 2</i>	NO <sup>-</sup> - нитроксил анјон
BSA - говеђи албумин из серума	PBS - <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
CAF - <i>Cancer-associated fibroblasts</i>	PI3K - фосфатидилинозитол-3-ОН киназа
CP450 ароматазе - хумани цитохром CYP19 или P450 ароматазе	PIGF – плацетални фактор раста
CRM - захваћеност/удаљеност тумора од циркумферентне ресекционе маргине	PN - перинеуралне инвазије
CXCL-12 – хемокински лиганд-12	PR - прогестеронски рецептори
CXCR-4- хемокински рецептор-4	qRT-PCR - Квантитативна ланчана реакција полимеразе у реалном времену
DAG – диацилглицерол	R - резидуални статус
DMEM - <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>	RNS - <i>Reactive Nitrogen Species</i>
DMSO - <i>Dimethyl sulfoxide</i>	ROS - <i>Reactive Oxygen Species</i>
ЕВ - етидијум бромид	RT-PCR - ланчана реакција полимеразе у реалном времену
ЕСАСС - <i>The European Collection of Animal Cell Cultures</i>	SEER - <i>Surveillance Epidemiology and End Results</i>
EGFR - епидермални фактор раста	SMGM-2 - <i>Smooth Muscle Growth Medium-2</i>
EGM - <i>Endothelial Cell Growth Medium</i>	SP-1 - <i>Transcription Factor Sp1</i>
ELISA - <i>Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay</i>	TD – присуство туморских депозита
eNOS - ендотелна азот-моноксид синтетаза	TIMP – ткивни инхибитор металопротеиназа
ER - естрогенски рецептори	TNF $\alpha$ - <i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
FBS - Фетални говеђи серум	TRG – степен регресије тумора
FCR - <i>Folin-Ciocalteu reagent</i>	uPA - урокиназа плазминоген активатора
FDA - <i>Food and Drug Administration</i>	V - васкуларна инвазија
FGF - основни фактор раста фибробласта	VEGF - васкуларни ендотелијални фактор раста
FIH-1 - <i>Factor Inhibiting HIF-1</i>	VEGFR – рецептор за васкуларни ендотелијални фактор раста
HER-2 – рецептор за хумани епидермални фактор раста	VHL - <i>Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor</i>
HIF-1 $\alpha$ - Фактор индукован хипоксијом	WHO - Светска Здравствена Организација
iNOS - индуцибилна азот-моноксид синтетаза	ДНК - дезоксирибонуклеинска киселина
МАРК - <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>	ЕМТ - епително-мезенхимна транзиција
	иРНК - информациона РНК

## *Докторска дисертација*

ММР-9 - матрикс металопротеиназа

$O_2^-$  - супероксид анион радикал

$ONOO^-$  - пероксинитрит

РНК - рибонуклеинска киселина

TNM - величина тумора, статус

регионалних лимфних чвора и присуство

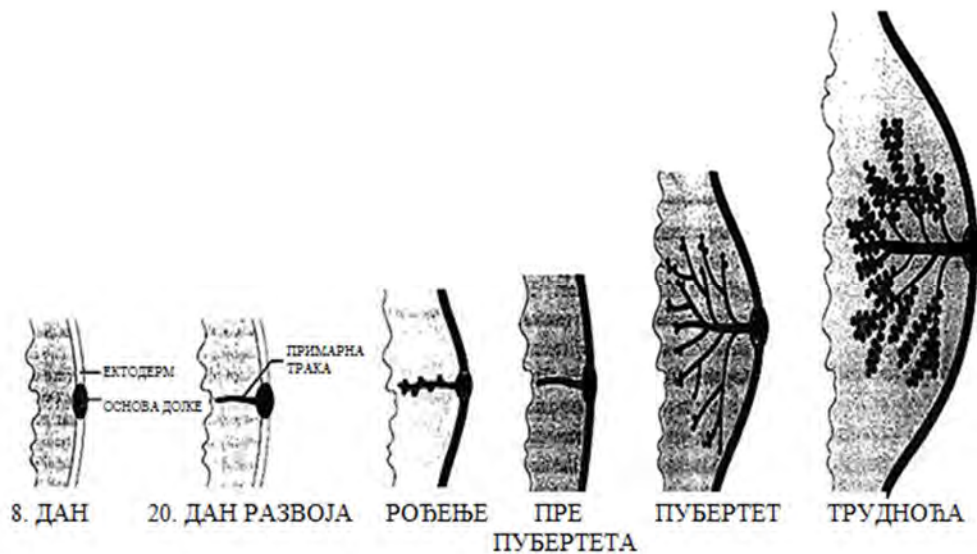
метастатских депозита

# I УВОД

## 1. Опште карактеристике и карцином дојке

### 1.1 Ембриологија дојке

Дојка или млечна жлезда (lat. *mamma*, грч. *mastos*) је ектодермалног порекла. Сматра се да представља модификовану знојну жлезду. У осмој недељи гестације, у ембриону дугачком само 8 mm у виду задебљања епидермиса или „млечне линије“ јавља се зачетак дојке (*Слика 1*). Урастањем задебљалог епидермиса у мезенхим, из његовог дисталног дела израста низ епителних трака (до 25), од којих се развијају главни одводни канали режњева млечне жлезде (*ducti lactiferi*). Пред крај феталног живота епителне траке се разгранавају и у њима се појављује лумен. Према спољашној страни *ducti lactiferi* се отварају и након рођења, формирају брадавицу, пролиферацијом мезенхима из дубине (Medicinska enciklopedija, 1967). До пубертета развој дојки је исти и код дечака и код девојчица. У току пубертета настају разлике и само код девојчица се наставља са развојем епителних трака уз истовремено гомилање масног ткива.

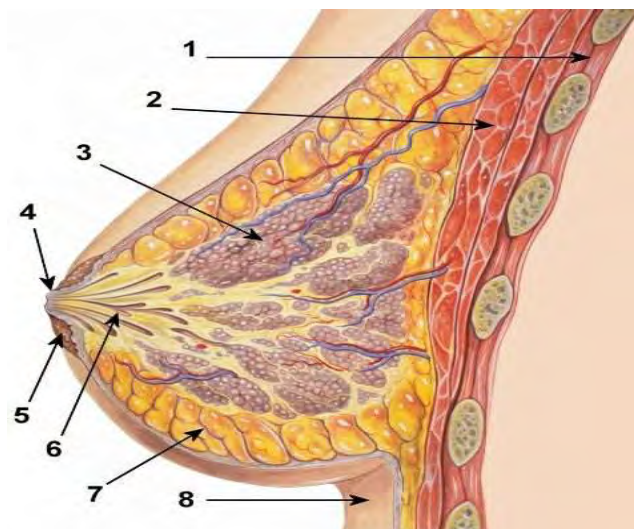


**Слика 1.** Развој жлезданог ткива дојке (модификовано из: Medicinska enciklopedija, JLZ Zagreb, 1967).

Коначно формирање жлезданих делова дојке и њихова диференцијација се завршава у време трудноће. У старости наступа сенилна инволуција (Džodić, 2005).

## 1.2 Грађа дојке

Дојка је грађена од епителног, везивног и масног ткива (**Слика 2**). Однос градивних елемената варира од узраста, хормонског статуса и генетски је детерминисан. Масно ткиво окружује млечну жлезду.



**Слика 2.** Анатомски изглед дојке. 1-грудни кош; 2-велики грудни мишић; 3-млечне жлезде; 4-брадавица; 5-ареола; 6-млечни канали; 7-масно ткиво; 8-кожа (модификовано из: Netter FH. Atlas of Human Anatomy, 2014)

Жлездано ткиво дојке се састоји од 15 до 20 режњева, који су зракасто распоређени око осовине која пролази кроз брадавицу. Сваки режањ се завршава одводним млечним каналом који се сустичу према брадавици. Основну грађу режњева дојке чине режњићи са изводним каналима. Један режњић садржи око 100 ацинуса који представљају секреторни део млечне жлезде. Зид млечних канала је грађен од унутрашњег епителног слоја, чија је деоба зависна од естрогена и миоепителних ћелија (Radojević, 1970).

## 1.3 Карцином дојке - (*Carcinoma mammae*)

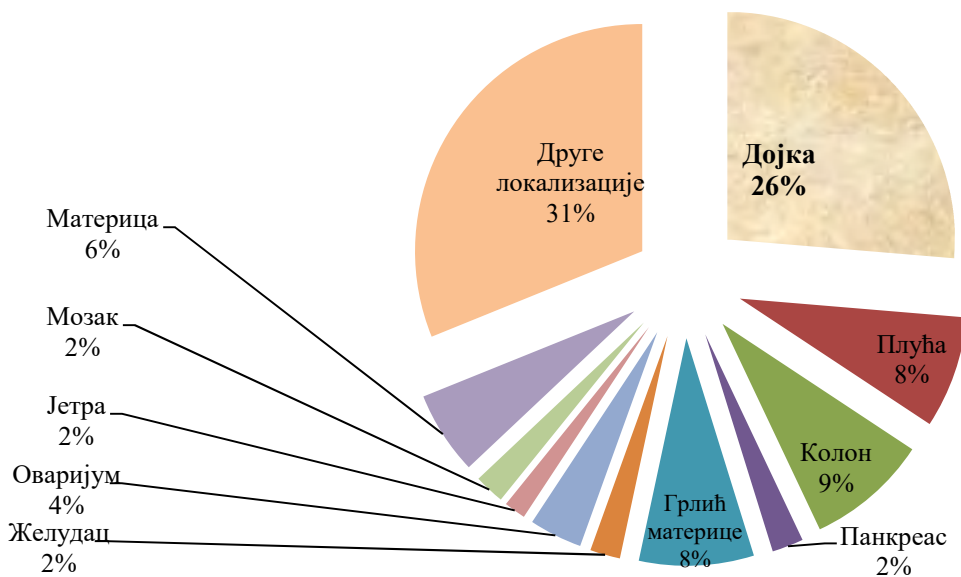
Карцином дојке, као и други видови малигних обољења настају као последица акумулације генетичких мутација, које ремете механизме пролиферације, репарације оштећења у грађи молекула ДНК, или програмиране смрти ћелије (апоптозе). Промене у грађи гена који не изазову смрт захваћених ћелија налазе се у основи настанка тумора. Гени који

учествују у овом процесу су: онкогени, тумор супресор гени, гени који су одговорни за синтезу ензима репарационог система и за регулацију апоптозе. Настале промене у геному, од тачкастих мутација, транслокација, делеција, хипердиплоидија до хромозомских реаранжмана имају за последицу активацију онкогена, инактивацију тумор супресор гена или доводе до измене гена који контролишу стабилност генома. На тај начин долази до формирања клонова туморских ћелија са високим пролиферативним потенцијалом. Клон ћелија се независно размножава и ствара масу нежељеног ткива и управо оваква ћелија формира тумор или неоплазму (Weinberg, 2014).

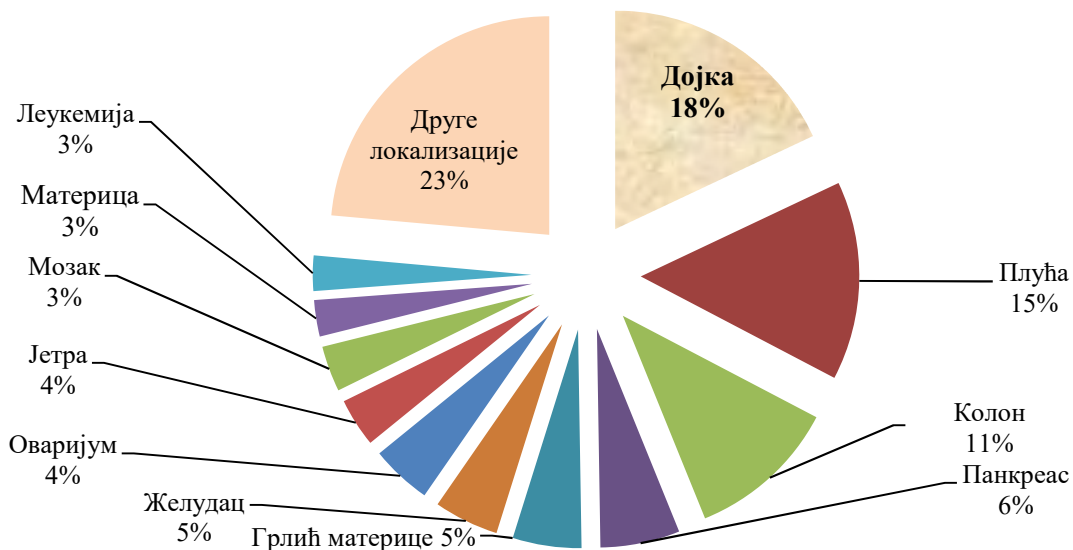
Постоји више од 100 различитих типова тумора, а већина је добила назив према органу или ткиву из ког се развија. Једна од основних подела тумора је према њиховом инвазивном потенцијалу. Већина тумора остаје локализована на месту настанка и нема инвазивна својства и способност метастазирања па се сматрају бенигним туморима. Ови тумори се лакше отклањају јер формирају компактну масу а после отклањања најчешће не рецидивирају. Уколико ћелије тумора имају способност инвазије, тј. продирања у околна ткива и способност метастазирања, онда је реч о малигном тумору - карциному (Weinberg, 2014).

#### ***1.4 Епидемиологија карцинома дојке***

Карцином дојке је најчешћи малигни тумор код жена широм света. Морталитет (смртност) од карцинома дојке у Европској унији годишње износи око 58 000 жена и процењује се да се сваке године дијагностикује нових 135 000 пацијената. У женској популацији у свету карцином дојке чини 22,9%. Према подацима до 2012. Године, од свих дијагностикованих тумора (морбидитет) код жена у Централној Србији, на карцином дојке отпада чак 26% (*Слика 3*) (Miljuš и сар., 2014). Нажалост, не смемо занемарити чињеницу да се у тренутку постављања дијагнозе само код трећине жена у Србији ради о болести у раном стадијуму, а да готово две трећине жена има регионално проширену болест или регионалне метастазе, што има катастрофалне последице. Свакако ови подаци указују на смањену шансу за њихово излечење (*Слика 4*), стога је проценат смртности (морталитет) од ове болести у Србији веома висок (18%) (Miljuš и сар., 2014). У САД и Европи се највише напредовало на пољу раног дијагностиковања, те се карцином дојке величине до 2 cm дијагностикује у 70-80% случајева, док је у Србији тај проценат знатно мањи (20%).



Слика 3. Процент морбидитета од малигнух тумора код жена у Централној Србији до 2012. године (модификовано из: Миљуш и сар., 2014).



Слика 4. Процент морталитета од малигнух тумора код жена у Централној Србији до 2012. године (модификовано из: Миљуш и сар., 2014).

### 1.5 Етиологија карцинома дојке

Старосна доб представља најзначајнији фактор ризика, који заједно са генетском предиспозицијом, трајањем и природом репродуктивног периода жене (рана менарха-касна менопауза, нулипаритет, касна прва трудноћа, недојење) и деловањем спољашњих фактора ризика (исхрана, физичка активност, пушење), чини карцином дојке најчешћим малигнитетом код жена. Водећи симптом јесте безболна, чврста, неправилно ограничена маса у дојци. Дијагноза се поставља комбинацијом физичког прегледа, биопсије и неке од *imaging* техника (мамографија, ултразвук, магнетна резонанца). Најзначајнији прогностички параметри су величина тумора, нодални статус, хистолошки градус, статус хормонских рецептора. Хируршки захват је и даље основа терапијског приступа, са зрачном-, хемио-, хормоно- или циљаном терапијом, или комбинацијом неких од наведених терапијских модалитета. И данас је петогодишње преживљавање од карцинома дојке мање од 55%, што наводи на потребу што хитнијег увођења индивидуализованог третмана ове болести у клиничку праксу (Filipović и сар., 2017). Фактори ризика за карцином дојке су бројни: генетички, хормонски, дијететски. Често су међусобно испреплетани и није могуће изоловати специфичну улогу сваког посебно међу њима.

#### **Фактори ризика за настанак карцинома дојке су:**

**Пол** - Карцином дојке се 60-100 пута чешће јавља код жена него код мушкараца (Miljuš и сар., 2014);

**Године старости** - Ризик за карцином дојке се повећава са годинама старости. Учесталост карцинома дојке код жена у Србији постепено се повећава са старашћу до 60. године живота, након чега полако почиње да опада. У нашој земљи највећа узрасно-специфична стопа инциденце карцинома дојке код жена забележена је у старосној групи од 55 до 65 година (Miljuš и сар., 2014);

**Породична историја** - (генетички фактори). Генетички фактори су одговорни за 5 до 10% случајева карцинома дојке и повезани су са мутацијама у генима *BRCA1* и *BRCA2*;

**Претходна дијагноза бенигних промена у дојци** - атипична дуктална хиперплазија, лобуларна хиперплазија, лобуларни карцином *in situ*, папиломи;

**Исхрана** - Епидемиолошким студијама утврђено је да начин исхране има значајну улогу у настајању карцинома дојке. Конзумирање великих количина висококалоричне хране, масти и протеина животињског порекла наводи се као озбиљан фактор ризика за настанак ове болести код жена у постменопаузи (Newman и сар., 1986);

**Алкохол** - Пронађена је позитивна корелација између конзумације чак и умерених количина алкохола и настанка карцинома дојке. Алкохолизам, као и други фактори средине могу изазвати

промене у генској експресији различитих сигналних путева (Solis и сар., 2016). Доказано је да мале концентрације етанола (0,06%) имају штетан ефекат на транскрипцију гена везаних за малигну пролиферацију епителних ћелија млечне жлезде. Алкохол утиче на повећану активност естрогена, индукујући пролиферацију преко СР450 ароматазе (хумани цитохром СYP19 или Р450 ароматазе) сигналног пута и претпоставља се да има кључну улогу у раном развоју аденокарцинома дојке (Etique и сар., 2004);

**Зрачење** - Литературни подаци показују да нема мале дозе озрачивања испод које не постоји ризик од канцерогенезе (Land и сар., 1997). У циљу лечења карцинома дојке често се примењује радиотерапија, за коју се сматра да носи повећан ризик од настајања карцинома у другој дојци (Voise и сар., 1992);

**Стрес** - Познато је да постоје ензимски системи за превенцију, репарацију и корекцију грешака на ДНК, а које су настале као последица различитих унутрашњих и спољашних стресних реакција. Међутим, код ћелија карцинома, стрес индукује болест, повећавајући учесталост мутација. Стрес утиче на ослобађање високих концентрација слободних радикала, које превазилазе могућности заштитних репаративних система ћелије (Cipollini и сар., 2004; Jackson и сар., 2001).

### ***1.6 Макроскопске карактеристике малигнух тумора дојке***

Макроскопске карактеристике малигнух тумора дојке су различите и у зависности су од њиховог ткивног порекла, хистолошког типа и подтипа. Карциноми су у највећем броју случајева на попречном пресеку звездастог облика, нејасно су ограничени од околине. Најчешће су чврсте конзистенције и зрнасте грађе. Површина пресека је испод нивоа околног ткива и на њој се уочавају беличасте тракасте промене. Овакав макроскопски изглед представља последицу присуства велике количине фиброзног и еластичног ткива. Само мали број карцинома је јасно ограничен од околног ткива, мекане конзистенције. Могу се уочити некротична поља као и већа поља крварења (папиларни и медуларни карциноми). Макроскопски малигни филодни карциноми су великих димензија (медијана 60 милиметара), чврсте конзистенције, јасно ограничени од околине са цистичним просторима округлог или пукотинастог облика. У њима се такође могу запазити некротична поља (Džodić, 2005).



### 1.7 Микроскопске карактеристике малигних ћелија

Малигне ћелије имају атипичну структуру, са поремећеним односом једро-цитоплазма (Слика 5). Једра су већа у односу на једра здравих ћелија, што је у корелацији са њиховом метаболичком активношћу. Често се могу уочити мегаједарне структуре. Хроматин је обично згрудван, неравномерно распоређен, смештен на периферији. Услед високог митотског индекса, карциномске ћелије садрже већи број једара, јер цитоплазма не стиже да се подели истом брзином. Један од најпоузданијих критеријума малигнитета је свакако промена броја, изгледа и величине једараца. Постоји прихваћено мишљење да свако повећање једарца за 5 микрона у пречнику сугерише малигнитет. Такође, повећање у броју нуклеолуса је индикативно за малигнитет (Džodić, 2005).



Слика 5. Шематски приказ разлика између нормалних и карциномских ћелија (модификовано са сајта: <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=2493>).

Мембрана ћелија је промењена, услед чега се губи контактна инхибиција (Јуришић и Živančević-Simonović, 2002). Способне су да измене свој енергетски метаболизам, како би пратиле потребу за брзом производњом енергије коју намеће стална пролиферација (Hanahan и Weinberg, 2011). Пролиферација малигних ћелија није контролисана постојећим регулаторним процесима ћелије. Малигне ћелије имају способност аутокрине производње фактора раста, повећања нивоа рецептора на мембрани, активације сигналних путева укључених у контролу раста ћелија (Hanahan и Weinberg, 2011). Ове ћелије су развиле различите механизме у циљу избегавања програмиране ћелијске смрти - апоптозе, најчешће губитком функције одређених протеина укључених у процес апоптозе, повећањем експресије антиапоптотских или смањењем експресије проапоптотских молекула (Hanahan и Weinberg, 2011; Wong, 2011). За константну

пролиферацију туморских ћелија одговорна је активност теломераза, ензима који су високо експримирани код брзо пролиферишућих ћелија, укључујући ћелије канцера и имају улогу да одрже стабилност теломера (Shay и сар., 2001).

Потребе за кисеоником и хранљивим материјама се повећавају са прогресијом канцера па долази до стварања нових крвних судова, неоангиогенезе. Ако се упореди метаболизам туморске ћелије са метаболизмом примитивних анаеробних организама јасно се уочава сличност коју је описао нобеловац Ото Warburg. Када су ћелије карцинома лишене кисеоника, оне прелазе на анаеробни метаболизам. Он открива да канцерозне ћелије производе енергију ферментацијом глукозе, и да би 35% редукована ћелијска респирација нормалних ембрионалних ћелија резултирала тиме да оне пређу са оксидативног метаболизма на ферментацију (Warburg, 1966). Ферментација глукозе у лимфним и крвним судовима први је корак канцерозног процеса, јер она загађује непосредну околину. Сматра се да је то још један од разлога непрепознавања канцерозних ћелија од стране имунског система. Малигне ћелије излучују ангиогене факторе који подстичу процес ангиогенезе одређеним механизмима (Hanahan и Folkman, 1996; Katić и сар., 1996). Инвазивност, способност насељавања околних ткива, последица је слабљења међућелијских веза, излучивања протеолитичких ензима и металопроотеиназа које разграђују међућелијски матрикс и олакшавају продирање малигнућих ћелија у околна ткива (Katić и сар., 1996; Ниа и сар., 2011). Метастазирање представља миграцију малигнућих ћелија са примарног места настанка на неко друго, често удаљено место у организму (Katić и сар., 1996).

### ***1.8 Класификација тумора дојке***

Класификација тумора дојке заснива се првенствено на основу њиховог хистогенетског порекла, а онда у оквиру сваке групе постоји класификација према инвазивности, хистоморфолошким, хистохемијским и биолошким особинама (Scarff и Torloni, 1968). Неопходно је дијагностиковање тумора различите хистогенезе, као и различитих хистолошких типова у оквиру једне хистогенетске групе, јер се они међусобно разликују по свом биолошком понашању, због чега су и терапијски приступи различити. Према Светској здравственој организацији (World Health Organization - WHO) сви карциноми дојке се класификују у две велике групе: неинвазивни и инвазивни карциноми дојке (*Табела 1*).

Табела 1. Хистолошка класификација тумора дојке према светској здравственој организацији

**I Епителни тумори**

- 
1. бенигни (интрадуктални, аденом брадавице, тубуларни аденом)
  2. малигни - карциноми
- 
- a. неинвазивни
 

---

    - дуктални *in situ*
    - лобуларни *in situ*

---
  - b. инвазивни
 

---

    - дуктални инвазивни
    - дуктални инвазивни са доминантном дукталном компонентом
    - лобуларни инвазивни
    - муцинозни
    - медуларни
    - папиларни
    - тубуларни
    - аденоцистични
    - секреторни
    - апокрини
    - карциноми са метаплазијом

---

**II Мешовити тумори**

- 
1. бенигни (фиброаденоми и филодни тип)
  2. малигни (филодни и карциносарком)
- 

**III Мезенхимни тумори**

2. бенигни
3. малигни саркоми (лејомиосарком, липосарком и ангиосарком)

**IV Туморске лезије**

- 
1. дуктектазије
  2. инфламаторни псеудотумори
  3. хамартоми и
  4. гинекомастија
- 

**1.9 Патохистолошка испитивања карцинома дојке - TNM класификација**

Резултати патохистолошких испитивања су кључни у свим фазама дијагностике и терапије карцинома дојке. Традиционално патохистолошки извештај се углавном односио на место и величину тумора, оређивање хистолошког типа, степена малигнитета (градус) описа захватања суседног ткива и лимфних нодуса. Модерна онколошка, хируршка и епидемиолошка испитивања су бацила светло на неке од патохистолошких параметара (патохистолошки препарат-РН), и унеле нове критеријуме и нове појмове, а самим тим и нови приступ у прегледу

који се односио на вероватноћу преживљавања и предиктивну вредност (вероватноћу одговора на терапију). TNM класификација подразумева клинички опис тумора (Т-величина, N-статус регионалних лимфних нодуса, M-присуство метастатских депозита). Што је број иза ознаке већи, болест је напреднија. Према последњој ревизији TNM класификације, односно одређивања стадијума болести, који су настали као резултат бројних клиничких студија и на основу водећих концензусних конференција, као најзначајнији фактори наводе се: укупни стадијум туморске болести (TNM), резидуални статус (R), захваћеност/удаљеност тумора од циркумферентне ресекционе маргине (CRM), присуство туморских депозита (TD), васкуларне инвазије (V), перинеуралне инвазије (PN) и степена регресије тумора (TRG) (Слика 6). То су, према америчком Националном институту за карцином најважнији прогностички параметри (Krivokarić и сар., 2012).

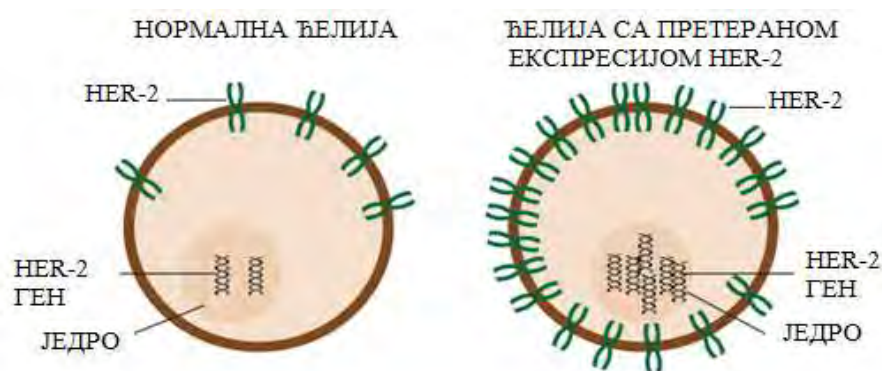
Величина тумора	Тумор ≤ од 2 cm	Тумор од 2 до 5 cm	Тумор > од 5 cm	Тумор било које величине са инфилтрацијом адвезивног коша
<b>T</b>	 T1	 T2	 T3	 T4
Лимфни нодуси	<b>N0</b> Нема регионалних лимфнодрених метастаза	<b>N1</b> Метастазе присутне у унилатералним аксиларним лимфним нодусима	<b>N2</b> Метастазе присутне у билаатералним аксиларним нодусима фиксирани један за други или друге структуре	<b>N3</b> Метастазе у истоименим интраклавикларним лимфним нодусима са или без захватања аксиларних лимфних нодуса
Удаљене метастазе	<b>MX</b> Није могуће утврдити постојање удаљених метастаза	<b>M0</b> Нема удаљених метастаза	<b>M1</b> Присутне удаљене метастазе	Категорија M1 се класификује на следећи начин: Грла, кости, јетра, мозак, лимфни чворови, кичмени мазгиња, плућа, перитонеум, надбубрег, кожа
<b>M</b>				

Слика 6. TNM класификација (модификовано са сајта: [http://www.thebestoncologist.com/breast\\_cancer.html#Pathology](http://www.thebestoncologist.com/breast_cancer.html#Pathology)).

Нормалне и малигне ћелије дојке експримирају рецепторе за хормоне и факторе раста од којих су најважнији: естрогенски (ER), прогестеронски (PR) и рецептор за хумани епидермални фактор раста, HER 2 (енгл. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*). Експресија ових рецептора у малигним ћелијама није регулисана, а може бити и повећана или смањена, може доћи и до губитка њихове експресије. Тумори дојке чије ћелије не експримирају ниједан рецептор се називају троструко негативни (*Triple Negative Breast Cancer*). Спадају у групу најагресивнијих облика малигнитета код дојке, лоше реагују на хормонску, радио и хемиотерапију и имају најлошију прогнозу. Око 75% карцинома дојке експримира повишене количине рецептора за

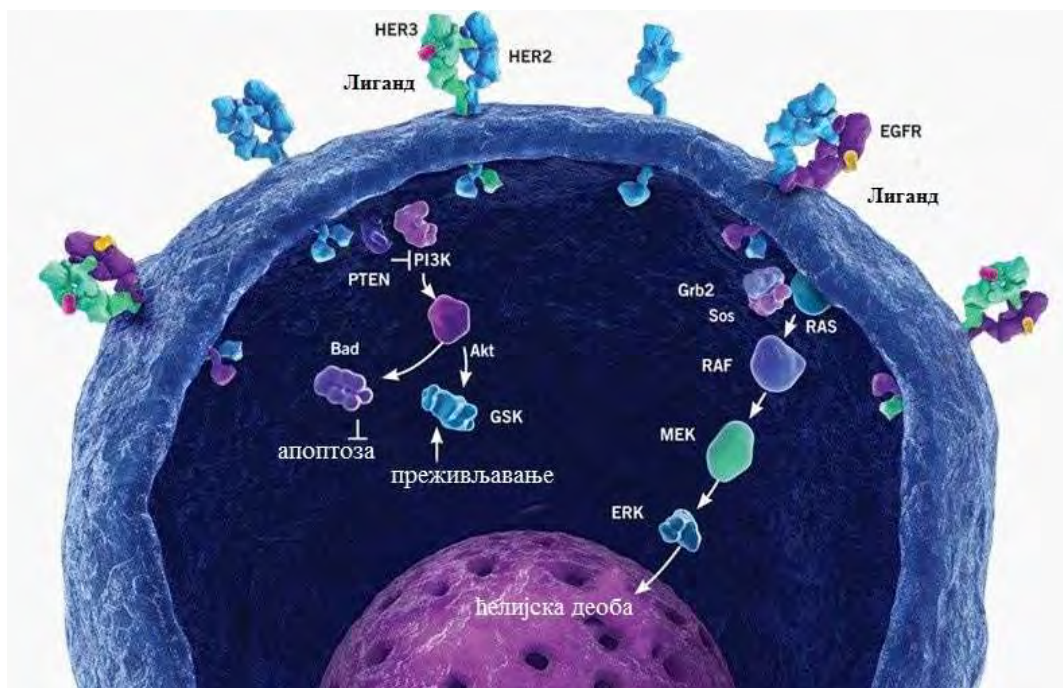
естроген, па се они називају естроген позитивни (ER+), док је 65% карцинома прогестерон позитивни тип (PR+). Карциноми дојке који имају ER+/PR+ фенотип у 60% случајева реагују на хормоналну терапију (нпр. тамоксифен), док ER-/PR- у 5-10% случајева одговарају на терапију (Pegou и сар., 2000).

Дојке су естроген зависна ткива. Почевши од пубертета, епител дојке пролиферише брзо као одговор на флукутирајући ниво естрогена. Пре открића естрогенских рецептора који припадају великој класи нуклеарних рецептора, сви карциноми дојке су се сматрали потенцијално осетљивим на ендокрину терапију. Клиничким и лабораторијским истраживањима утврђено је да једино карциноми који садрже естрогенске рецепторе (естроген - зависни карциноми) реагују на лечење ендокрином терапијом. Године 1985. је откривен други битан рецептор за фактор раста, HER-2 или erb-B2/neu протеин (*Слика 7*). Овај протеин је производ *Erb B2*-гена чија је експресија појачана у око 20% хуманог карцинома дојке (*Слика 8*). *HER-2* или *erb-B2/neu* је протоонкоген, који се налази на хромозому 17. *HER-2* (хумани епидермални фактор раста) припада фамилији гена који имају улогу у регулацији ћелијског раста (Nocera и сар., 2016).



**Слика 7.** Експресија хуманог епидермалног фактора раста у нормалној и карциномској ћелији (модификовано са сајта: <http://www.whathealth.com/breastcancer/her2receptor.html>).

Протеински продукт овог гена представља рецептор за епидермални фактор раста, са тирозин киназном активношћу, експримиран је на површини ћелија нормалног ткива и има улогу у регулацији ћелијског раста и пролиферацији. У случају карцинома, срећемо се са амплификацијом овог гена и, уместо да постоје две генске копије, као што је случај у нормалним ћелијама, у ћелијама карцинома постоје његове мултипле копије. Као резултат тога, долази до прекомерне експресије HER-2 протеина на површини ћелије, што за последицу има поремећај ћелијске деобе и раста (Ménard и сар., 2000).



**Слика 8.** Сигнални пут HER-2  
(модификовано са сајта <http://flipper.diff.org/app/items/info/7263>).

Будући да је присутан повећан број рецептора на површини ћелије за епидермални фактор раста, долази до неконтролисане пролиферације ћелија, а то представља једну од основних карактеристика тумора. Тумори који имају повећан број ових рецептора на површини својих ћелија расту брже, агресивнији су и мање сензитивни на хемио- и хормонску терапију. Спољашњи домен рецептора је присутан на површини ћелије карцинома дојке, док се интрацелуларни ензим тирозин киназа везује са унутрашње стране за рецептор. Постоје три везујућа лиганда за HER-2 рецептор, укључујући HER-1, или епидермални фактор раста (EGFR), HER-3, и HER-4. Тирозин киназа HER-2 протеина се активира везивањем фактора раста за ове рецепторе и тако за последицу имамо „укрштено активирање” HER-2 киназе. Појачање доводи до прекомерне протеинске експресије, што се клинички мери имунохистохемијском методом (Gagliato и сар., 2016).

### 1.10 Молекуларни механизми карцинома дојке

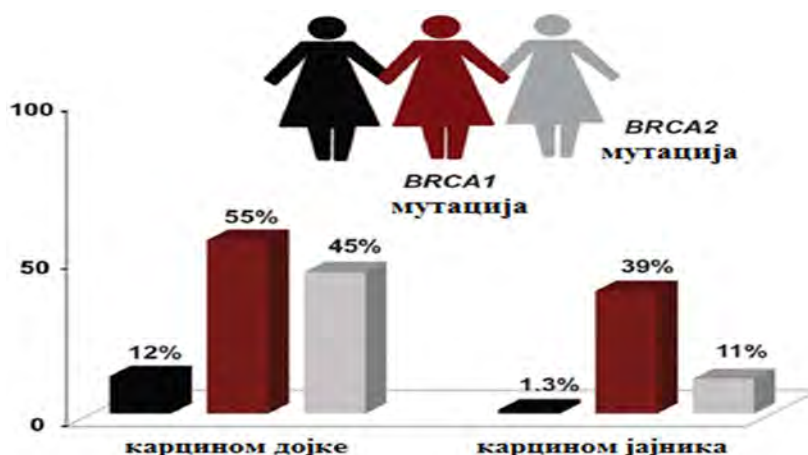
Карцином дојке је болест комплексне етиологије, карактеристика и одговора на терапију. Напредак у молекуларној биологији имао је велики утицај на разумевање премалигних процеса у ткиву дојке. Установљени су модели за настанак карциномских формација у овом ткиву. Наиме, прва од утемељених хипотеза је „клонална еволуциона хипотеза“ према којој је свака ћелија ткива дојке подложна мутацијама, које јој омогућавају пут ка бесмртности, односно канцерогености. Према другој хипотези претпоставља се да у сваком ткиву постоје туморске матичне ћелије и да је ова врста ћелија одговорна за иницијацију и прогресију туморског ткива (Nowell, 1976; Reya и сар., 2001). Бројна истраживања су показала да је за настанак карцинома, у просеку, потребно четири до седам мутација у кључним генима (Armitage и Doll, 1954; Peto и сар., 1975). Међутим, геноми ћелија карцинома садрже више од хиљаду промена, од којих само поједине погађају специфичне гене. Лоеб и сарадници су претпоставили да преканцерозне ћелије испољавају тзв. “мутатор фенотип”, којим се обезбеђује селекција најприлагођенијих клонова и еволуција тумора (Loeb, 2001). Према хипотези “мутатор фенотипа” насумичне мутације у генима који одржавају стабилност генома доводе до стања повећане мутабилности, тј. повећавају фреквенцу настанка нових мутација које обезбеђују позитивну селекцију својим носиоцима (Loeb и сар., 2003). Иако је могуће да оштећења услед нагомиланих мутација буду толика да доведу до апоптозе и самим тим негативне клоналне селекције, одржавање “мутатор фенотипа” током канцерогенезе представља вероватнији догађај. Постоји неколико аргумената против ове хипотезе у којима се наводи да стање тзв. хипермутабилности није неопходно за настанак карцинома (Tomlinson и сар., 2002), као и да се промене у генима одговорним за одржавање интегритета секвенци ДНК јављају са изузетно ниском фреквенцом (Futreal и сар., 2004).

Тумори представљају хетерогену популацију ћелија које се, иако воде порекло од једне прекурсорске ћелије, међусобно разликују по степену и врсти промена у геному, што представља отежавајућу околност приликом њиховог проучавања. Значајну улогу у клоналној експанзији тумора имају и мутације у некодирајућим секвенцама генома. Ове промене могу погађати регулаторне елементе гена утичући директно на њихову експресију, мењати места искрајања егзона те довести до настанка аберантних протеина или утицати на стабилност РНК молекула (Venkatesan и сар., 2006). Претпоставља се да до успостављања “мутатор фенотипа” долази током почетних фаза настанка канцера, као и да не постоји тачан редослед мутација одговорних за његову појаву, већ он представља последицу насумичних промена у геному (Loeb, 2001). Присуство “мутатор фенотип”-а доводи до повећања стопе тачкастих мутација, промена у кратким понављајућим секвенцама ДНК (микросателитске секвенце), као и до кариотипских



промена, у смислу великих хромозомских реаранжмана и губитка хетерозиготности бројних гена (Loeb и сар., 2003). Све наведене промене представљају манифестацију геномске нестабилности, једне од основних карактеристика туморских ћелија и главног механизма повећања хетерогености ћелија унутар туморске масе, чиме се стварају услови за селективну клоналну експанзију у зависности од утицаја спољашње средине (Cahill и сар., 1999).

Око 10% пацијената има генетичку predisпозицију за добијање карцинома дојке у неком периоду живота (Clark и Domchek, 2011). Напредак у молекуларној биологији има значајну улогу у дијагнози, смањењу ризика и лечењу пацијенткиња са овим predisпозицијама (Clark и Domchek, 2011). Постоји више генских мутација које носе ризик за настајање карцинома дојке, али и других органа. Такође је битно поменути да не добијају све особе карцином дојке упркос постојању мутација на хромозомима. Важну улогу у настанку карцинома дојке имају мутације на *p53*, *BRCA1* и *BRCA2* генима. Гени *BRCA1* и *BRCA2* су значајни за нормално функционисање ћелија, јер учествују у контроли ћелијског раста и механизмима репарације ДНК. *BRCA* гени су велики гени, а мутације су распоређене дуж целих гена без груписања. Велики број мутација у овим генима може бити специфичан само за једну породицу, или бити обележје једне популације, односно једног региона. Мутација 5382insC у 20 егзону гена *BRCA1* је карактеристична мутација за словенске популације. Носилац ове мутације има повећан ризик за настанак карцинома дојке и јајника и велика је вероватноћа да ће мутацију пренети на потомство. Многобројна истраживања показала су да жене са мутацијом у *BRCA1* или *BRCA2* гену имају вероватноћу до 85% за настанак карцинома дојке и до 62% за настанак карцинома јајника до седамдесете године живота (Слика 9). Оба гена у немутираној форми делују као тумор супресор гени (Pharoah и сар., 2002).



Слика 9. Процент добијања карцинома са мутацијама на BRCA генима (модификовано са сајта: <https://www.geneyouin.ca/brca-mutation-testing-can-classify-type-and-severity-of-cancer/>).



*BRCA 1* ген је идентификован 1994. године. Обухвата регион од стотину килобаза и састоји се од 7800 нуклеотида организованих у 22 кодирајућа и 2 некодирајућа региона. Смештен је на q краку региона хромозома 17 у региону 21 у нормалним ћелијама (17q21). Његов продукт је протеин који се састоји од 1863 аминокиселине. *BRCA1* протеин има молекулску масу од 220 килодалтона и спада у породицу нуклеинских фосфопротеина. Најчешћи продукт мутираног *BRCA1* гена је краћи *BRCA1* протеин који губи своју функцију. *BRCA1* делује као централни протеин у одржавању геномске стабилности, репарацији ДНК, контроли ћелијског циклуса, моделирању хроматина, регулацији транскрипције и убиквитинације протеина. Као одговор на оштећење ДНК, помаже у поправци ДНК укључивањем у хомологу рекомбинацију (Pharoah и сар., 2002).

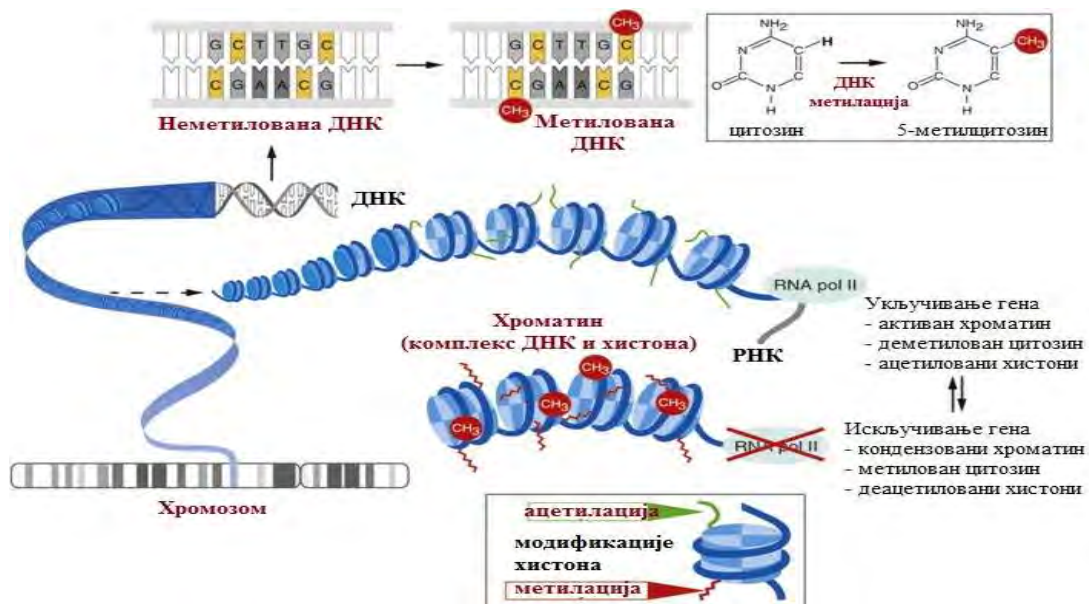
У комплексним реакцијама са групом протеина под називом *BASC* (енгл. *BRCA1-associated genome surveillance complex*), *BRCA1* се укључује у репарацију ДНК, укључујући и путеве репарација погрешног спаривања база. Експресија *BRCA1* гена повезана је са ћелијским циклусом, највећа је у S фази, и остаје константна до почетка митозе. До сада је откривено преко 300 мутација на *BRCA1* гену. *BRCA1* мутације углавном се јављају код породица које су окарактерисане као високоризичне за карцином дојке. У такве породице се сврставају оне са дијагностикованим карциномом дојке или оваријума (Yang и сар., 1997).

*BRCA2* ген је идентификован 1995. године. Смештен је на 13. хромозому, позиција 13q12.3. Садржи 27 егзона. Комплементарна секвенца ДНК за *BRCA2* ген садржи 11385 базних парова и кодира протеин који садржи 3418 аминокиселина. Највиши нивои експресије овог протеина су пронађени у ткиву дојке и тимуса, а нешто мањи у ткиву плућа, оваријума и слезине. Експресија *BRCA2* гена је регулисана у току пролиферације и диференцијације ћелије, и везана је за експресију *BRCA1* гена. За ћелије које имају мутацију у *BRCA2* гену карактеристична је генетичка нестабилност, при чему се акумулирају ДНК мутације и хромозомски реаранжмани. Сличне абнормалности примећене су и код ћелија које имају мутације на *BRCA1* гену. До сада је пронађено око 800 мутација на *BRCA2* гену (Ramus и Gayther, 2009). Протеин *BRCA2* је укључен у репарацију једноланчаних и дволанчаних прекида ДНК и учествује у цитокинези. Алтернативни механизми репарација дволанчаних прекида склони су грешкама у ћелијама са нефункционалним геном *BRCA2*, па резултирају геномском нестабилношћу ћелија и променама које доприносе промењеним особинама ћелије. Иако су мутације у овим генима ретке, постоје докази да путеви којима они делују могу бити инактивирани бројним механизмима (Foulkes и сар., 2004).

### 1.11 Епигенетски механизми

Епигенетски механизми регулишу бројне биолошке процесе, као што су инактивација X хромозома, РНК интерференција, геномски импринтинг и репрограмирање генома током диференцијације и развића (Veeck и Esteller, 2010). Било који поремећај ових процеса може да изазове болести укључујући и карцином дојке. Поремећаји епигенетских процеса се манифестују кроз аберантну метилацију гена и ацетилацију хистона при чему долази до поремећаја у регулацији експресије гена. Губитак протеина ћелијске адхезије и висока активација сигналах путева естрогенских рецептора изазива абнормални раст и диференцијацију ткива дојке, истовремено се миграције абнормалних ћелија повећавају, укључују се важни интрацелуларни процеси као што су апоптоза, ДНК репарација и детоксификација (Vo и Millis, 2012). На **Слици 10** је приказана метилација која се нормално дешава у геному и доводи до закључавања гена.

Један од најважнијих епигенетских процеса у настанку карцинома дојке јесте дисрегулација метилације CpG острваца.



Слика 10. Метилација CpG острваца (модификовано из: Krishnendu и сар., 2015).

Метилација CpG острваца у оквиру промотора гена је један од механизма закључавања генома, а проблем може настати уколико су метиловане промоторске секвенце тумор супресорских гена, што резултира закључавањем и супресијом њихове активности. Обрнуто, ако су промоторске секвенце онкогена неметиловане, то за последицу има откључавање и експресију

ових гена. И једно и друго може да иницира канцерогенезу. Опет, сама метилација одговара на разне регулаторне сигнале, а у склопу комплекса за ремоделовање нуклеозома (Vo и Millis, 2012).

Код људи најважније ДНК метилтрансферазе су DNMT1, DNMT3a и DNMT3b. DNMT1 је најзаступљенија, а улога јој је у одржавању обрасца метилације док су друге метилтрансферазе посредници *de novo* метилације (Meegan и сар., 2010). Последица хиперметилације цитозина у CpG острвцима је механизам инактивације тумор супресорских гена, а будући да је метилација облик ћелијске меморије пренеће се на следеће генерације ћелија (Vo и Millis, 2012). У ћелијама канцера долази до хипометилације геномске ДНК у кодирајућим деловима гена и до хиперметилације у нормално неметилованим промоторским регионима гена одређених ткива и на тај начин настаје метилациона неравнотежа (Baylin и сар., 1998). Метилација цитозина у CpG острвцима промоторских региона води ка утишавању гена и недоступности хроматина за транскрипцију (Cedar и Bergman, 2008).

Модификација хистона доводи до краткотрајне инхибиције експресије гена. У процесу канцерогенезе битна је модификација хистона која је катализована са неколико ензима (хистон ацетилтрансферазом, хистон метилтрансферазом и хистон деметилазом).

## 2. Ангиогенеза - настанак и развој крвних судова

Ангиогенеза је физиолошки процес неоваскуларизације који се карактерише растом нових крвних судова из већ постојећих малих венула и артериола. Она је регулисана равнотежом између проангиогених и антиангиогених молекула, која настаје као природни одговор тела на исхемију у ткивима. Ангиогенеза је сложен биолошки процес који обухвата четири стадијума: 1) вазодилатацију и повећање пропустљивости зида крвног суда, 2) дестабилизацију крвног суда и разградњу матрикса, 3) пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија и 4) формирање и стабилизацију новог крвног суда.

**Вазодилатација и повећање пропустљивости зида крвног суда.** Вазодилатацији крвног суда доприноси азот-моноксид (NO) ослобођен из ендотелних ћелија. Азот моноксид стимулише гуанилат-циклазе што резултује појачаном синтезом цикличног гуанозин-монофосфата (сGMP), који изазива релаксацију глатке мускулатуре крвног суда (Asahara и сар., 1999). Поред тога, ендотелне ћелије повећавају пропустљивост зида крвног суда. Ове везикуле и вакуоле су фенестриране, чиме је омогућена њихова међусобна комуникација (Simons и сар., 2002). У току ангиогенезе фибриноген и плазминоген, као протеини плазме велике молекулске тежине, користе ове органеле за свој транспорт из циркулације у околно ткиво. У околном ткиву оне нешто касније служе као везивна потка како би се ендотелне ћелије одржале на окупу. У мањем обиму екстравазација протеина плазме врши се и кроз међуендотелне ћелијске спојеве (Sluimer и Daemen, 2009).

**Дестабилизација крвног суда и разградња матрикса.** У стадијуму ангиогенезе, која се карактерише дестабилизацијом крвног суда и разградњом матрикса, пре него што ендотелне ћелије започну свој раст, долази до одстрањивања потпорних ћелија из зида крвног суда, тзв. перицита. Овај процес прати разградња базалне мембране, на коју належу ендотелне ћелије, а затим и ремоделовање периваскуларне строме. Тако структурни протеини екстрацелуларног матрикса учествују у образовању пупољака на крвним судовима у ткиву, у великој мери кроз интеракције са интегринским рецепторима у ендотелним ћелијама (Bisht и Bist, 2010). Преостали протеини ванћелијског матрикса (нпр. тромбоспондин и тенасцин С) учествују у ангиогенези дестабилизацијом интеракција ћелија и екстрацелуларног матрикса, што олакшава континуирану ћелијску миграцију, или тако што разграђују екстрацелуларни матрикс и на тај начин омогућавају ремоделовање и урастање нових крвних судова (нпр. активатор плазминогена и матрикс металопроотеиназе (MMP) (Bisht и Bist, 2010).

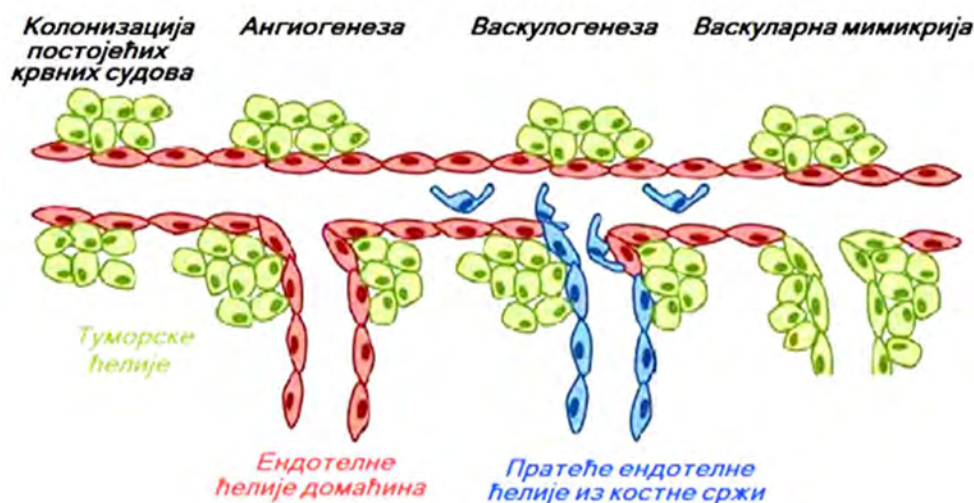
**Пролиферација и миграција ендотелних ћелија.** Ендотелне ћелије крвних судова се у нормалним физиолошким условима ретко деле. Због тога је, када се изузму крвни судови укључени у регенерацију ткива, женски репродуктивни циклус (менструација) и гравидитет, адултна васкулатура углавном „мирна“ (Radak и сар., 2004). Међутим, у условима хроничне инфламације, која је присутна у одређеним стањима као што је нпр. атеросклерозно измењен крвни суд, под утицајем бројних стимулатора ангиогенезе, долази до пролиферације ендотелних ћелија. Ове ћелије, након тога привучене хемоатрактантима, мигрирају кроз дезинтегрисану базалну мембрану крвног суда у ремоделовано и размекшано периваскуларно поље (Bisht и Bist, 2010).

**Формирање и стабилизација новог крвног суда.** После преласка у подручје смањене васкуларизације, ендотелне ћелије се међусобно повезују, групишу у један слој и стварају капиларне формације. Потом мезенхимске ћелије из околног ткива пролиферишу и мигрирају у правцу ових капиларних формација, где се диференцирају у периците, чиме се завршава процес стварања новог крвног суда (Bisht и Bist, 2010). На тај начин, неоваскуларизација повећава површину за дистрибуцију инфламацијских ћелија, пре свега леукоцита. Тако, нови крвни судови експримирају већи број васкуларних ћелијских адхезивних молекула-1 (енгл. *vascular cell adhesion molecule-1*) у поређењу са ендотелним ћелијама које покривају промене унутар зида крвног суда. Уз то, они омогућавају бољу исхрану ткива кисеоником и хранљивим материјама. Неоваскуларизацијом створени крвни судови имају и недостатке: они су фрагилни и њихова руптура може довести до крварења у ткиву, пролиферације васкуларних глатких мишићних ћелија и повећања матрикса (Michel и сар., 2011).



Слика 11. Неоангиогенеза иницирана туморским растом (модификовано са сајта: <https://www.biooncology.com/pathways/vegf/vegf-tumor-angiogenesis.html>).

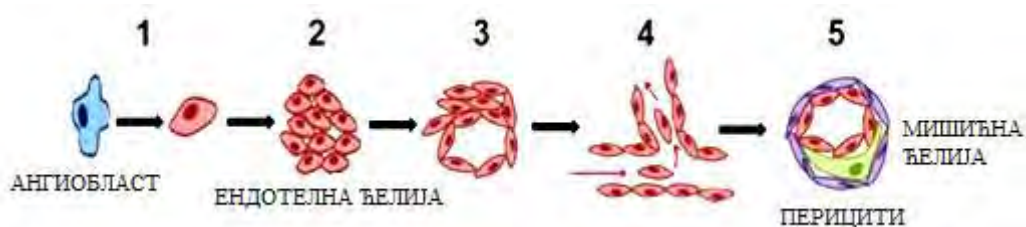
Иако, саставни део нормалних процеса у организму (развоју ембриона, морфогенези, репродукцији, заарастању рана, менструалном циклусу и трудноћи), ангиогенеза је честа у бројним патолошким стањима као што су туморски раст и метастазирање, инфламаторне и васкуларне болести, повреде и ране (Patan, 2004) (*Слика 11*). У већини ткива постоји механизам који одржава прокрвљеност ткива крвним судовима, на тачно оном нивоу који је потребан да се задовољи метаболичка потреба ткива. Прожетост крвним судовима већине ткива у организму је директно сразмерна локалном метаболизму. Када се ова равнотежа промени локални регулациони механизми током краће или дужег времена покушаће да аутоматски подесе ниво прожетости крвним судовима. Ангиогенеза обухвата неколико фаза које се активирају као одговор на ангиогенетске факторе раста. Фактори раста као последица инфламаторних процеса, активности мезенхимских или туморских ћелија, представљају лиганде за рецепторе на ендотелним ћелијама (Deshpande и сар., 2010).



**Слика 12.** Механизми туморске неангиогенезе (модификовано са сајта: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/sr/e/ee/Formiranje\\_krvnih\\_sudova.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/sr/e/ee/Formiranje_krvnih_sudova.jpg)).

Ангиогенезу треба разликовати од васкулогенезе у којој се из прекурсора хемангиобласта формирају нови крвни судови (*Слика 12*). Васкулогенеза означава спонтано формирање крвних судова током ембрионалног развоја, за разлику од термина ангиогенеза којим се означава процес формирања нових крвних судова код одраслих особа умножавањем (рачвањем) из већ постојећих (*Слика 13*). Зато се термин васкулогенеза користи за формирање крвних судова, док се термин неангиогенеза користи за настајање нових крвних судова одвајањем од постојећих када су у

питању раст и метастазирање малигнух тумора. Васкуларна мрежа настала неоангиогенезом је фрагилна, неправилног гранања, функционално инсуфицијентна, а све ове особине се потенцирају хемио и радиотерапијом (Guex и сар., 2015).



**Слика 13.** Физиолошки процес формирања нових крвних судова. 1) Диференцијација ангиобласта у ендотелне ћелије; 2) настанак васкуларних острваца; 3) настанак примитивних васкуларних цеви; 4) сазревање крвних судова и стварање нових шупљина процесима пролиферације и миграције ендотелних ћелија (модификовано са сајта: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=21883723>).

Ангиогенеза је нормални физиолошки процес раста и развоја организма и процеса зарастања рана и гранулације ткива. Grinblat и Shubik су 1968. године описали неоангиогенезу као узрочника експанзије тумора (Greenblatt и Shubik, 1968). Стога, неоангиогенеза представља патолошки процес који је изражен у фази интензивног раста тумора као један од битних фактора малигнитета (метастазирања). Бројна су истраживања и покушаји да се овај физиолошки процес искористи у лечењу тумора и других урођених и стечених васкуларних болести (Sheikh и сар., 2005). Постоје докази да инхибиција ангиогенезе може довести до заустављања развоја и одумирања тумора инхибицијом њиховог даљег раста. И поред тога што су научници још увек далеко од потпуног разумевања патофизиолошких механизма ангиогенезе у многим стањима, остаје нада да ће будућа истраживања неоангиогенезе моћи да расветле за сада скривена места потенцијалне терапије.

## 2.1 Биомаркери ангиогенезе - Матрикс металопртеиназа-9

Матрикс металопртеиназе (ММП) представљају фамилију од 23 структурно повезане  $Zn^{2+}/Ca^{2+}$  - зависне ендопептидазе које имају способност да деградирају екстраћелијски матрикс и разграђују базалну мембрану. Разграђујући екстраћелијски матрикс, посредују у многобројним физиолошким процесима као што су репродукција, инволуција материце, ембрионални развој, ангиогенеза, али и у патолошким процесима. Базална мембрана и интерстицијална строма изграђене су од различитих протеина као што су колаген, еластин, гликопротеин ламинин, фибронектин, ентактин, као и бројни протеоглици и гликозаминоглици. Синтеза и разградња



компоненти екстраћелијског матрикса је строго регулисана. На основу њихове структуре, супстратне специфичности и ћелијске локализације металопроотеиназе су подељене у пет подгрупа (Woessner, 1991):

- 1) колагеназе (ММР-1 и ММР-8) разграђују фибрилари колаген,
- 2) желатиназе (ММР-2 и ММР-9) делују на колаген типа IV као и на денатурирани колаген (желатин),
- 3) стромелизине (ММР-3, ММР-7, ММР-10) који имају шири спектар супстрата као што су протеоглигани, ламинин и фибронектин,
- 4) матрилизине (ММР-7) која има најшири спектар супстрата, екстраћелијски матрикс,
- 5) ММР везане за мембрану (МТ-ММР) који представљају протеине везане за ћелијску мембрану способне да активирају ММР-2 (Christiansen и Rajasekaran, 2006).

Металопроотеиназе се секретују као солубилни проензими који се активирају захваљујући јону  $Zn^{2+}$  који се налази у средишту молекула и спољном присуству јона  $Ca^{2+}$  (Freije и сар., 1994). Ензимска активност металопроотеиназа је строго контролисана на више нивоа и дисрегулација ове активности доводи до неконтролисане разградње екстраћелијског матрикса која је у основи процеса туморског метастазирања (Woessner, 1991; Freije и сар., 1994). Најчешће повезиване металопроотеиназе са процесом метастазирања су ММР-2 (желатиназа А) и ММР-9 (желатиназа Б), због њихове способности да разлажу колаген типа IV, главну компоненту базалне мембране крвних судова.

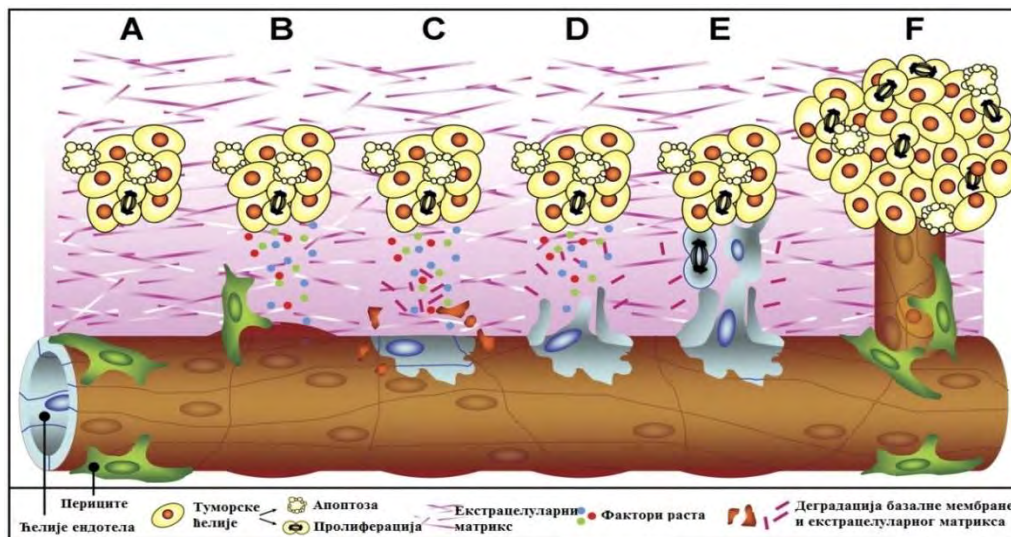
Ензимска активност металопроотеиназа је строго регулисана на нивоу генске експресије, стабилности иРНК, активације проензима и инхибиције ензимске активности њиховим ендогеним ткивним инхибиторима. Конститутивна експресија ММР је ниска, али у одређеним физиолошким и патолошким условима који подразумевају разградњу екстраћелијског матрикса, њихова експресија се повећава. Иако имају исте супstrate, регулација експресије ММР-2 и ММР-9 на транскрипционом нивоу је различита. Тако на пример, *ММР-9* поседује на свом промотору везујућа места за NFκB (енгл. *Nuclear factor kappa B-NF-kB*) и SP-1 (енгл. *Transcription factor Sp1*) протеин, захваљујући којим TNFα (енгл. *Tumor Necrosis Factor α*) индукује експресију *ММР-9* (Ries и Petrides, 1995). Важну улогу у контроли њихове експресије имају транскрипциони фактори који везују AP-1 (активатор протеин-1) и припадају фамилији *jun* и *fos* гена (Woessner, 1991).

Ћелије (моноцити, лимфоцити, туморске ћелије) секретују металопроотеиназе у латентној форми, као зимогене (proMMP). Активација зимогена захтева специфични активациони процес који се назива „цистеинско прекопчавање“ (везивање цистенског остатка продомена за јон  $Zn^{2+}$



који се налази у активном месту ензима) (Newby, 2005). Протеолитичка активација се одиграва у екстраћелијском простору преко плазмина и урокиназа плазминоген активатора (uPA) или преко других чланова MMP фамилије. Активност MMP је модулисана фамилијом сопствених природних ткивних инхибитора (енгл. *Tissue Inhibitor of MatrixmetaloProteinases*, TIMP), који су хомологи по својој структури (TIMP-1 до TIMP-4). TIMP-1, први члан ове фамилије, је гликопротеин молекулске масе 29 kDa, који везује активну форму MMP-1 и стромелизин-1 (MMP-3) (Hofmann и сар., 2005). Равнотежа између металопроотеиназа и њихових ткивних инхибитора је веома значајна, јер нарушавање те равнотеже води неконтролисаном разградњи екстраћелијског матрикса у различитим патолошким стањима. ћелије које пролиферишу и дормантне ћелије су клинички одговорне за рецидив карцинома (Gotzmann и сар., 2004).

Дормантност тумора је комплексан и слабо разјашњен феномен, истраживан и код људи и у животиња, и повезан је са недовољним капацитетом стварања крвних судова (Townson и Chambers, 2006). Термин „ангиогени прекидач“, одређен поремећајем равнотеже између про- и анти-ангиогенетских фактора, под утицајем два протеолитичка система, uPA и MMP, мења дормантно стање ћелија и покреће инвазивни раст тумора (*Слика 14*). MMP-9 је неопходна за тзв. “ангиогенезни прекидач” и њена повећана експресија може бити предиктивна за прелаз не-ангиогеног, микроскопског, дормантног тумора у ангиогени и инвазивни облик (Polyak и Hahn, 2006).



**Слика 14.** Деградација базалне мембране и екстрацелуларног матрикса (модификовано из: Thijssen и сар., 2007).

Малигни тумори за разлику од бенигну, имају способност инвазије и разарања околног ткива и стварања метастатских фокуса. Због тога инвазивност и метастазирање представљају важне биолошке карактеристике малигну тумора. Прву фазу метастатске каскаде представља

локална инвазија ткива домаћина (Devita и сар., 2004). Да би отпочеле инвазију, туморске ћелије морају да се раздвоје једна од друге. Нормалне ћелије су међусобно и са околномstromом повезане помоћу адхезивних молекула, процесима хомотипске ћелијске адхезије и контактне инхибиције. Ендотелни кадхерини (*E-cadherin*) представљају фамилију трансмембранских гликопротеина, помоћу којих ендотелне ћелије остају везане за околнуstromу (Bracke и сар., 1996). Губитак Е-кадхерина и Е-кадхерин-катенин комплекса доводи морфолошки до поремећаја структуре цитоскелета и омогућава амебоидне покрете ћелија, ремети ћелијски циклус и поспешује ћелијску пролиферацију. Смањење адхезивних веза убрзава одвајање туморских ћелија од примарне масе тумора (Birchmeier и Behrens, 1994).

Конститутивна експресија активних MMP у епителним ћелијама дојке доводи до протеолитичке разградње Е-кадхерина и прогресивних промена фенотипа *in vitro*, укључујући губитак катенина у међућелијским везама, смањење цитокератина и повећање експресије виментина и MMP-9. Ове промене условљавају промену стабилног епителног ћелијског фенотипа у нестабилни мезенхимски фенотип. У многим карциномима, прогресија у малигнитет је повезана са губитком епителне диференцијације и променом у мезенхимски фенотип. Овај процес, познат као епително-мезенхимска транзиција (EMT), повећава покретљивост и инвазивност различитих ћелијских типова и сматра се најзначајнијим догађајем у касној фази туморогенезе и почетку туморске инфилтрације и метастазирања. EMT представља механизам којим се епителне ћелије ослобађају међућелијских веза и стичу покретљивост (Lochter, 1997; Christiansen и Rajasekaran, 2006).

Транзиција из добро диферентованог фенотипа у инвазивни мезенхимски фенотип подразумева различите молекуларне механизме који независно поспешују покретљивост и инвазивност туморских ћелија. EMT карактерише протеолитичка промена Е-кадхерина у N-кадхерин. Мезанхимске ћелије које су изгубиле уске спојеве, тзв. *tight junctions*, губе и апикално-базални поларитет. Мезанхимске ћелије секретују MMP-2 и MMP-9, које деградирају базалну мембрану и помажу процес инвазије (Woessner, 1991).

У процесу разградње екстраћелијског матрикса туморске ћелије користе два протеолитичка система, плазминоген и MMP. Претпоставља се да каскада протеолитичких ензима рашчишћава пут туморским ћелијама на напредујућим ивицама тумора које тако крећу у инвазију. Инактивне проформе ензима (зимогена) су секретоване локално и активирањем њихових регулаторних ензима, које продукују туморске ћелије илиstroma, постају активне (Laufs и сар., 2006).

ММР-2 и ММР-9 су проензими који се активирају екстраћелијски, а плазминоген систем контролише њихову активацију. Обе желатиназе су везане за површину ћелије и активирају се везивањем uPA и плазминогена за ћелијску површину. Инхибиција активације плазминогена зауставља активацију желатиназа. Плазмин у солубилној форми разграђује ММР-9, али у зависности од дозе и концентрације плазминогена и uPA, може да активира желатиназе (Laufs и сар., 2006). Разградња екстраћелијског матрикса представља строго контролисан процес који зависи од концентрације секретованих проензима, њихових активатора и инхибитора. Туморске ћелије стичу способност кретања и ако је ниво литичких ензима који помажу инвазију, као што су ММР-2 и ММР-9 већи од нивоа њихових инхибитора, процес инвазије се наставља. Тако се инхибиторима литичких ензима може зауставити процес туморске инвазије (Braske и сар., 1996).

С обзиром на пораст инциденце карцинома дојке у свету, јавља се све већа потреба за тумор маркером који би поуздано могао да идентификује дуктални карцином дојке у раном стадијуму са могућом тенденцом рецидива (Chabottaux и сар., 2006). Могући кандидати су ММР-2 и ММР-9, као и њихови инхибитори. ММР-2 и ММР-9 су укључене у иницијацију, раст и метастазирање тумора и формирање нових крвних судова. Неоангиогенеза се одвија кроз неколико процеса од којих је кључна модулација естрацелуларног матрикса. Адаптација естрацелуларног матрикса је предуслов за формирање нових крвних судова. Базална мембрана обезбеђује структурну подршку крвним судовима и састоји се од колагена типа IV, ламинина и фибронектина (Romanic и сар., 1998). Протеазе имају велику улогу у формирању нових крвних судова. Прецизна ангиогена регулаторна улога ММР се огледа у разградњи колагена, фибронектина и ламинина, односно ММР обезбеђују главне градивне компоненте крвног суда (Bennett, 2001).

С обзиром на њихову улогу у прогресији тумора, ММР-2 и ММР-9 су испитиване као тумор маркери за многе карциноме као што су карцином колоне, карцином дојке, желуца, плућа, бубрега и у малигнитетима гинеколошке регије (Mignatti и Rifkin, 1993).

## 2.2 *Васкуларни ендотелијални фактор раста-VEGF*

Последњих неколико година из ткива која имају посебне метаболичке потребе, као што су ткиво карцинома и ткиво ретине ока, изоловане су супстанце које су назване фактори ангиогенезе или VEGF, васкуларни ендотелијални фактор раста (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF). Велика пажња је усмерена на истраживање фамилије VEGF-а и рецептора тирозин киназа, преко којих овај фактор раста остварује своје проангиогено деловање (Folkman

и Klagsbrun, 1987). Васкуларни ендотелијални фактор раста је сигнални протеин ћелија које стимулишу васкуло- и ангиогенезу. Првобитно је био познат као фактор васкуларне пермеабилности (Ferrara и сар., 2003). Представља основу система који регенерише ткива у условима смањене концентрације кисеоника. Серумске концентрације VEGF су високе у разним патолошким стањима. Нормална функција VEGF је да створи нове крвне судове у току ембрионалног развоја, после повреда или након вежбања. Када је прекомерно експримиран, VEGF може да допринесе развоју патолошких стања. Солидни тумори не могу да расту без адекватне количине крви, зато карциноми са високом експресијом VEGF расту брзо и метастазирају (Palmer и сар., 2014). VEGF лиганди и рецептори су кључни регулатори васкуло-, ангиогенезе, лимфангиогенезе и васкуларне пермеабилности крвних судова.

Фамилија VEGF представља скуп структурно сличних молекула која укључује: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и PlGF (енгл. *placental growth factor-PlGF*). Ген за овај фактор је локализован на р краку хромозома 6, регион 21.1. Изоформе VEGF настају алтернативним сплајсовањем информационе РНК, *VEGF* гена. То је процес којим се РНК егзони, производи транскрипције *VEGF* гена, поново спајају на више начина. Резултати су различити молекули иРНК, који могу транслацијом дати различите протеинске изоформе VEGF. Они могу бити класификовани у групу са проксималним сплајсованим доменима који ће дати изоформе протеина са проангиогеним функцијама, или дисталним сплајсованим доменима који су изражени у нормалном ткиву (Shin и сар., 2010).

Најважнији медијатор туморске ангиогенезе је VEGF-A, који делује преко рецептора VEGFR-2, чија се висока експресија среће на ендотелним ћелијама, као и на циркулишућим ендотелним прогениторним ћелијама из косне сржи. Изражен је у већини тумора и најчешће је повезан са лошом прогнозом. Индукција повећане експресије VEGF може бити узрокована бројним епигенетским факторима као што су хипоксија, ниска рН вредност, присуство инфламаторних цитокина, фибробластног фактора раста, хормона, хемокина (CXCL-12), активацијом протоонкогена, инактивацијом или губитком тумор супресорских гена. Хипоксија која је присутна у солидним туморима, преко активације HIF-1 $\alpha$ , активира транскрипцију гена који су укључени у круцијалне аспекте туморске биологије, укључујући ангиогенезу. Везивање VEGF-A за VEGFR-2 рецептор узрокује каскаду различитих сигналних процеса. То резултира поремећајем регулације гена укључених у пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија и васкуларну пермеабилност. Ови рецептори су локализовани на површини ендотелних ћелија, али могу се наћи и интрацелуларно. Везивање VEGF-C за VEGFR-3 подстиче развој

лимфангиогенезе. VEGF 165 се може везати за неуропилинске рецепторе и претстављати корецепторе са VEGFR-2 (Mecollari и сар., 2014).

Данас је познато да супстанце, или потенцијални лекови који спречавају стварање крвних судова индиректно заустављају туморски раст (Ferrara, 1999). Различита претклиничка истраживања су показала успешну блокаду у смислу редукције „пумпања“ туморских крвних судова, те нормализације аберантних туморских крвних судова (Duda и сар., 2007). Компактност тумора зависи, поред осталог, и од раста капилара (тумором индуковане ангиогенезе - неоангиогенезе), који тумор снабдевају кисеоником и хранљивим материјама. За раст солидног тумора од 1 до 2 mm<sup>3</sup> неопходно је формирање крвних судова (Слика 15).



Слика 15. VEGF у карциному дојке (модификовано са сајта: [http://www.whatayear.org/10\\_13.php](http://www.whatayear.org/10_13.php)).

Ограничавањем могућности да се у тумору формирају нови крвни судови односно да се туморском ткиву ограничи неопластична ангиогенеза, може се зауставити и ограничити његов раст. Зато су начињени бројни покушаји у примени антиангиогенетске терапије, која је имала за циљ да, смањујући доток крви, а тиме и циркулацију у туморском ткиву, блокира његов даљи развој. Прва антиангиогенетска терапија тумора са моноклонским антителима *Bevacizumab* - ом, који неутралише VEGF, примењена је 2004. на основу одобрења светске организације за храну и лекове (енгл. *Food and Drug Administration - FDA*) у САД, код метастатаза карцинома дебелог црева (Hurwitz, 2004). У међувремену, активни састојак (*Bevacizumab*) је примењиван у лечењу карцинома дојке (Klencke и сар., 2008), плућа (Sandlel, 2008) и карцинома бубрега (Escudier и

сар., 2007). Потребна су додатна истраживања. *Bevacizumab* је рекомбинантно хумано моноклонско антитело које блокира ангиогенезу инхибирањем VEGF-A (Losi сар., 2007). *Bevacizumab* је први клинички доступни инхибитор ангиогенезе у САД. Разним истраживањима утврђена су и његова бројна нежељена дејства по пацијенте са карциномом дојке. Током наредних неколико година, изазов ће бити да се дефинишу најбољи показатељи и предиктори одговора на нове терапије. Наставак истраживања је такође потребан да се развије ефикаснија VEGF терапија и одреди оптимални режим дозирања и побољша профил безбедности.

### 2.3 Хипоксија у малигним ћелијама и HIF

Кисеоник игра централну улогу у ћелијској биологији, јер ћелије захтевају константно присуство одговарајуће количине кисеоника. Кисеоник функционише као кључни акцептор електрона у процесу митохондријског дисања, при чему се у процесу оксидативне фосфорилације генерише аденозинтрифосфат (АТР), а овај енергетски молекул се даље троши у већини биохемијских реакција (Semenza, 2012). Хипоксија је термин који се користи за описивање смањених концентрација кисеоника и може се дефинисати као стање у којем је парцијални притисак кисеоника у окружењу мањи од 5 до 10 mmHg (Lu и Kang, 2010). У бројним експериментима култивације ткива, дошло се до сазнања да се у нормалним физиолошким, нормоксичним условима концентрација кисеоника креће око 21%. Велики број метаболички активних малигнућелија могу узроковати стварање хипоксичне средине, када долази и до конкуренције за кисеоник са нормалним оклним ткивом. Фактори који доприносе стварању хипоксије су ниски парцијални притисак кисеоника у крви, смањена способност крви да транспортује кисеоник, смањена перфузија ткива, повећање растојања дифузије, или неспособност ћелија да искористи присутан кисеоник (Hockel и Vaupel, 2001).

Једна од карактеристика малигнућелија је стварање структурно и функционално абнормалних крвних судова који нису у стању да обезбеде адекватну количину кисеоника и да задовоље повећане метаболичке захтеве ширења карциномских ћелија, што на крају доводи до хипоксије (Semenza, 2012). Vaupel и сарадници су били међу првим истраживачима који су изнели директне доказе о хипоксији у хуманим карциномима, као и о вези хипоксије са повећаним метастазама и лошом прогнозом код пацијената са сквамозним тумором главе и врата, карцинома грлића материце и карцинома дојке (Hockel и Vaupel, 2001). Ћелије тумора обично реагују на хипоксију на неколико начина (Vaupel и сар., 2007):

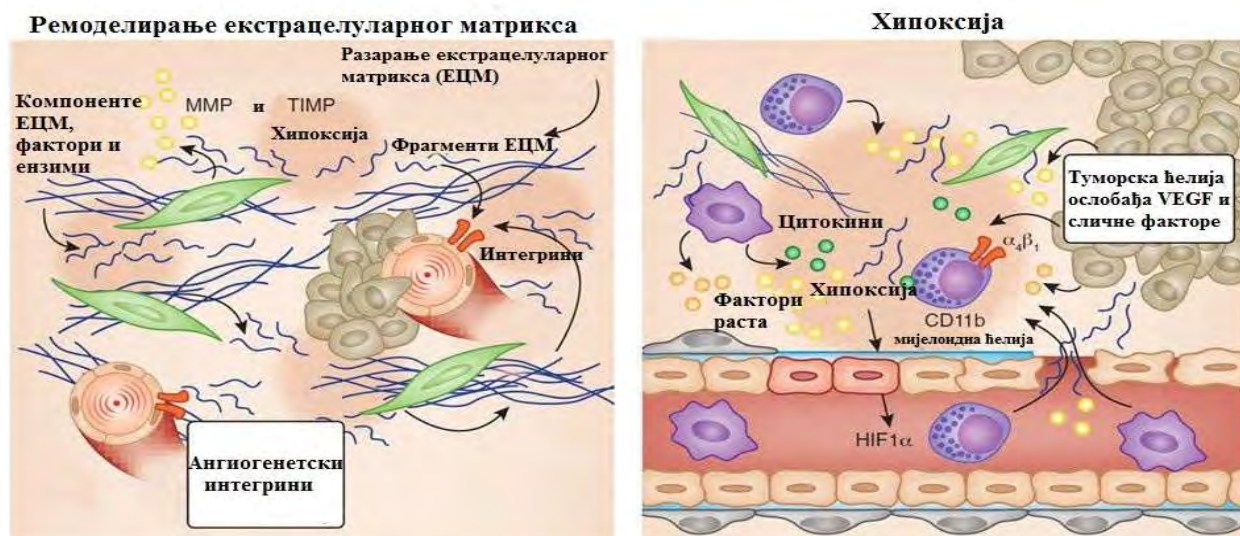
- пролиферација ћелија је ограничена и јавља се апоптоза и некроза;
- ћелије тумора се прилагођавају на стрес, односно хипоксичне услове средине фаворизујући алтернативне метаболичке путеве;
- покрећу неоангиогенезу у циљу стварања нове васкуларне мреже;
- постају агресивније, инвазивније, имају већи потенцијал метастазирања.

Ово прилагођавање ка агресивнијем фенотипу се постиже регулацијом експресије различитих гена који имају кључне улоге у ћелијским процесима, укључујући ћелијску пролиферацију, диференцијацију, туморску гликолизу, ангиогенезу, метастазирање и инвазију (Vaupel и сар., 2007; Lu и Kang, 2010; Semenza, 2012). Осим тога, ћелије тумора стичу више инвазивних и метастатских својстава као одговор на хипоксију, али постају и отпорне на стандардне третмане, као што је хемио- и зрачна терапија (Semenza, 2012). Резистентност на радиотерапију може наступити кад је парцијални притисак кисеоника у тумору мањи од 25-30 mmHg. Постоје докази да смањена концентрација кисеоника, утиче на повећање нивоа специфичних протеина у малигним ћелијама (*heat shock proteins*) као и на присуство ћелија са смањеним апоптотским потенцијалом (Hockel и Vaupel, 2001). Хипоксија индукује отпорност туморског ткива на хемиотерапију, вероватно преко смањења ефикасности појединих агенаса хемиотерапије у условима овакве средине (Hockel и Vaupel, 2001).

Фактор индукован хипоксијом (енгл. *Hypoxia-inducible factor, HIF*) је транскрипциони фактор завистан од кисеоника, који има важну улогу у неоангиогенези и расту тумора (Sun и сар., 2009). Сматра се кључним регулатором ћелијског одговора на хипоксију, који подлеже конформационим променама као одговор на различите концентрације кисеоника у ћелијском окружењу (*Слика 16*). У свом активном облику, HIF транскрипциони фактор, представља хетеродимер кога чине једна од три постојеће  $\alpha$  субјединице (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  или HIF-3 $\alpha$ ) и  $\beta$  субјединица. HIF-1 $\alpha$  је локализован на q краку хромозома 14, на региону 23.2, док је HIF-1 $\beta$  локализован на хромозому 1q21. Експресија *HIF-1 $\alpha$*  и *HIF-1 $\beta$*  иРНК је детектована у свим ткивима људског организма (Semenza, 2001). Иако, HIF-1 $\alpha$  и HIF-1 $\beta$  субјединице имају неке преклапајуће функције, HIF-1 је врло често повезан са метаболичким и васкуларним одговорима на хипоксију, док HIF-2 има утицај на еритропоезу (Semenza, 2011). Гликолитички ензими попут пируват дехидрогеназе налазе се под утицајем HIF-1 који инхибира улазак продуката гликолизе у Кребсов циклус у условима ограничене концентрације кисеоника (Parandgeou и сар., 2006). Протеинска стабилност и транскрипциони потенцијал HIF-1 $\alpha$  субјединице директно зависе од концентрације кисеоника (Putra и сар., 2011). HIF-1 $\beta$  или ARNT (енгл. *Aryl Hydrocarbon Receptor*



*Nuclear Translocator*), има константну експресију у ћелијском једру, показујући кисеонично-независну активност (Ren и сар., 2011).



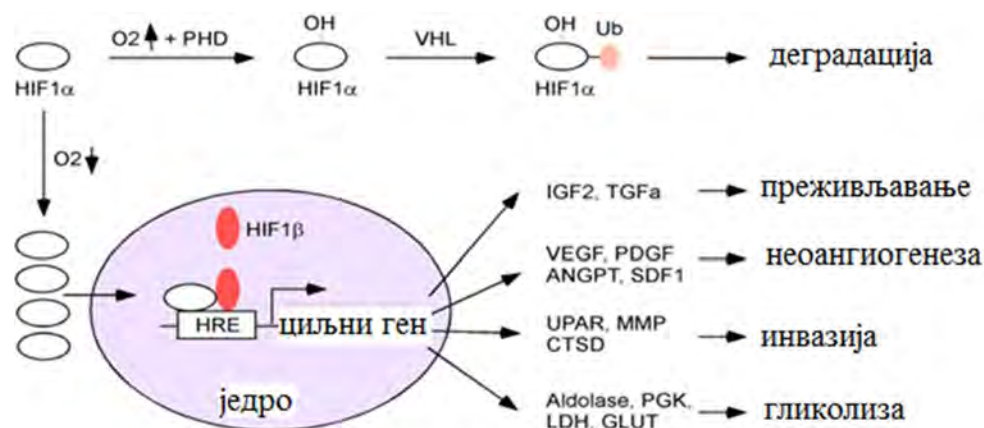
Слика 16. Ремоделирање екстрацелуларног матрикса (модификовано са сајта: <http://www.nature.com/nm/journal/v17/n11/full/nm.2537.html?message-global=remove>).

У условима нормалног парцијалног притиска кисеоника, HIF-1 $\alpha$  протеин подлеже брзој деградацији процесом убиквитинације и не долази до транскрипције циљних гена. Убиквитинација је део главног механизма којим ћелије регулишу деградацију оштећених протеина. За ове протеине се прво везује мали протеин, убиквитин, а у реакцији везивања као катализатор употребљава се ензим убиквитин лигаза. Убиквитин даље шаље сигнал другим лигазама да везују додатне молекуле убиквитина, на тај начин формирајући полиубиквитински ланац који је у вези са протеинама и омогућава разградњу непотребног протеина (Zhang и Yang, 2012).

*VHL* (енгл. *Von Hippel-Lindau tumor suppressor*) ген кодира протеин од 213 аминокиселина који се састоји од два домена и има функцију регулатора HIF-1 $\alpha$  (Zinnamosca и сар., 2013). Везивање HIF-1 $\alpha$  и VHL врши се пост-транслационом хидроксилацијом пролина у VHL-у помоћу ензима пролил хидроксилазе (енгл. *Prolyl Hydroxylase Domain, PHD*) (Snell и сар., 2014). PHD припада фамилији ензима диоксигеназа, који за своје каталитичко дејство захтевају присуство кисеоника, гвожђа и 2-оксо-глутарата. Функција овог ензима искључиво зависи од концентрације кисеоника, па се сматра кисеоничним сензором (Rabinowitz, 2013). Смањење концентрације кисеоника за 10% доводи до опадања хидроксилације резидуа пролина у VHL-у, што резултира његовој нуклеарној стабилизацији са HIF-1 $\alpha$ . Постоје 3 изоформе ензима PHD које имају изразиту



хомологост секвенци у С-терминалном домену, док у N-терминалном домену показују значајне разлике (Katschinski, 2009). Међу изоформама VHL постоје разлике у ткивно-специфичним нивоима експресије, субцелуларној локализацији, протеинима са којима ступају у интеракцију, кисеоничној зависности, као и активности са различитим HIF- $\alpha$  изоформама (Barth и сар., 2007; Rantanen и сар., 2008; Katschinski, 2009) (Слика 16).



**Слика 17.** Последице хипоксичних услова у ћелији (модификовано са сајта: <http://www.intechopen.com/books/evolution-of-the-molecular-biology-of-brain-tumors-and-the-therapeutic-implications/hypoxia-angiogenesis-and-mechanisms-for-invasion-of-malignant-gliomas>).

У хипоксичним условима блокирана је разградња HIF-1 $\alpha$ , што има за последицу акумулацију овог протеина и његово повезивање са  $\beta$  субјединицом, резултујући стварањем HIF-1 (Слика 17). Протеин p300 је важна компонента HIF-1 транскрипционог комплекса. У условима ниског парцијалног притиска кисеоника, С-TAD (енгл. *Transactivating Domains*-TADs) домен HIF-1 интерагује са CH1 (енгл. *Cysteine/Histidine-rich1*) доменом p300, што доводи до повећане транскрипционе активности HIF-1 (Geng и сар., 2001). Овај протеин врши ацетилацију лизина 709 унутар HIF-1 $\alpha$  и ову функцију може спровести и у нормалним и у хипоксичним условима (Lim и сар., 2010). Процес ацетилације захтева претходну интеракцију HIF-1 $\alpha$  и p300 која је значајно израженија у хипоксији услед дехидроксијације аспарагина 803. Присуство ове интеракције омогућава ацетилацију лизина 709, као и стабилизацију и трансактивациону активност HIF-1. У нормалним условима протеин p300 и HIF-1 $\alpha$  нису физички повезани услед брзе деградације HIF-1 $\alpha$  и хидроксијације аспарагина 803 ензимом FIH-1 (енгл. *Factor Inhibiting HIF-1*). Због тога се FIH-1 назива другим кисеоничним сензором.

Хидроксијација зависна од кисеоника има највећу улогу у регулацији активности HIF-1 $\alpha$ . У циљу преживљавања неповољних услова микроокружења које има ниску концентрацију

кисеоника, ћелије развијају способност измене експресије неких протеина помоћу *HIF-1α* као медијатора. Након стабилизације *HIF-1α* у хипоксичним условима, наступа интеракција са коактиваторима и везивање за секвенцу 5'-RCGTG-3' у проксималним промоторима гена регулисаним хипоксијом. Активацијом циљних гена, хипоксија утиче на неоваскуларизацију, ћелијски прелазак са оксидативног на гликолитички метаболизам, пролиферацију, преживљавање ћелија и ћелијску апоптозу (Janke и сар., 2013).

## 2.4 Сигнални пут *CXCL-12 / CXCR-4*

Хемокини представљају фамилију малих цитокина (величине 8-12 kDa), која садржи више од 50 чланова. Хемокини остварују своју функцију везивањем за трансмембранске рецепторе који су спрегнути са G протеинима (Pierce и сар., 2002). Везивањем хемокина за свој рецептор, активирају се различити сигнални путеви у ћелији, који доводе до различитих биолошких одговора као што су: флукс калцијума, хемотаксија, „респираторна експлозија“, дегранулација и фагоцитоза (Hoguk, 2001).

Хемокини имају улогу у ћелијској миграцији, а луче их бројне стромалне и епителне ћелије. Хемокински лиганд-12 (енгл. *Stromal Cell-Derived Factor-1- CXCL-12*) и хемокински рецептор-4 (енгл. *Chemokine Receptor-4- CXCR-4*) сигнални пут је пример који одлично илуструје начин како ћелијски фактори заједно са факторима из перитуморског окружења могу малигне ћелије одвести на удаљене локације што заправо и представља процес метастазирања. Када је у питању карцином дојке, *CXCL-12* као продукт саме туморске ћелије, али и као продукт ћелија из перитуморског окружења (фибробласти) доводе до настанка секундарних депозита на типичним удаљеним локацијама као што су кости, јетра или плућа. *CXCL-12* има два позната рецептора, *CXCR-4* и *CXCR-7 (Atypical chemokine receptor 3-ACKR-3)*. *CXCL-12* везан за *CXCR-4* иницира преживљавање, раст и индукује сигналне путеве везане за хемотаксу. Експресија *CXCR-4* рецептора је повећана, како у примарним, тако и у метастатским туморима, потврђујући високу агресивност тумора (Chang и сар., 2015).

*CXCL-12*, познат и као „*stromal cell-derived factor-1*“ (*SDF-1*), се везује за рецептор *CXCR-4* и формира хемокински сигнални пут који је прво откривен приликом испитивања HIV инфекције. *CXCR-4* је један од неколико рецептора из фамилије хемокина које HIV могу користити да инфицирају CD4<sup>+</sup> T-ћелије (Caruz и сар., 1998). Додатним истраживањима утврђено је да има улогу у метастазирању код најмање 23 врсте тумора. У зависности од броја и односа N-терминалних цистеинских остатака они су подељени у бројне категорије: CXC, CX<sub>3</sub>C, CC и XC.

На циљним ћелијама постоје рецептори (*G-protein-coupled*) за које се везују ови лиганди. Ген за CXCR-4 је смештен на q краку региона 21, односно на хромозому 17 q21.

CXCL-12 (локализован на хромозому 10q11.21) се везује за CXCR-4 (локализован на хромозому 2q22.1) и иницира бројне сигналне путеве који воде повећању интрацелуларног калцијума, утичу на генску транскрипцију, хемотаксу, ћелијско преживљавање и пролиферацију. Након везивања лиганда за рецептор хетеротримерни G протеин бива активиран променом GDP у GTP дисоцијацијом на GTP-везане  $\alpha$  и  $\beta\gamma$  субјединице. Дисоцирана  $\beta\gamma$  подјединица активира два главна сигнална трансдукциона ензима, фосфолипазу C- $\beta$  (енгл. *Phospholipase C - PLC- $\beta$* ) и фосфатидилинозитол-3-ОН киназу (PI3K). PLC- $\beta$  индикује настанак два секундарна гласника, инозитола (1,4,5-*trisphosphate* - IP3) и диацилглицерола (енгл. *Diacylglycerol* - DAG). Везивањем за специфичне рецепторе на ендоплазматском ретикулуму, IP3 индикује ослобађање  $\text{Ca}^{2+}$  из интрацелуларних депоа. Заједно са  $\text{Ca}^{2+}$ , DAG активира протеин киназу C (енгл. *Mitogen-Activated Protein Kinase* - MAPK) и на тај начин учествује у процесу ћелијске миграције и метастазирања (Mellado и сар., 2001; Bendall и сар., 2005).

Протеинске G $\beta\gamma$  и G $\alpha$  подјединице активирају PI3K што води фосфорилацији многих компоненти као што су адхезионе киназе, пролин киназе-2, Crk-повезани субстрати (p130Cas), цитоскелетни протеини паксилени, Crk, Nck, CrkL, итд. Сви набројани процеси учествују у реорганизацији актинског цитоскелета и у променама које су неопходне за ћелијску миграцију. Активирани PI3K брзо ствара фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфате и иницира активацију Akt сигналног пута (енгл. *Alpha Serine/Threonine-Protein Kinase* - Akt) који има улогу у туморском преживљавању путем инактивације bcl-2 антагониста. CXCR-4 сигнални пут помоћу Akt такође води инактивацији GSK3 $\beta$  и стабилизацији  $\beta$ -катенина, који путују до нуклеуса и активирају генску транскрипцију и стимулишу пролиферацију (Mo и сар., 2013).

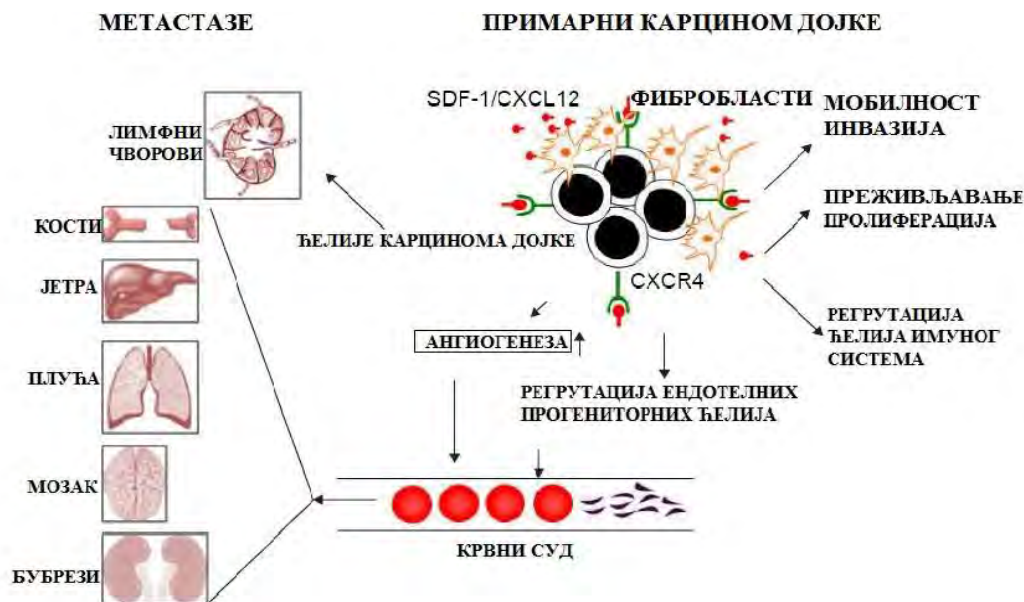
CXCR-4 је углавном експримиран у хематопоетским ћелијама као што су макрофаги, моноцити, Т и Б лимфоцити, неутрофили, стем ћелије коштане сржи, али и у дендритичним и Лангерхансовим ћелијама, васкуларним ендотелним ћелијама, астроцитима, ембрионалним матичним ћелијама, итд. (Kucia и сар., 2005).

CXCL-12/CXCR-4 сигнални пут је неопходан за ћелијску миграцију током ембрионалног развоја, органогенезе, васкулогенезе, органске хомеостазе, тако да је логично што се код CXCL-12 и CXCR-4 *knock-out* мишева налазе бројне малформације када је у питању хематопоеза, као и развој виталних органа као што су срце, крвни судови или мозак. Недостатак било CXCR-4, било CXCL-12 гена на ембрионалном нивоу је инкопатибилан са преживљавањем. CXCL-12/CXCR-4 сигнални пут такође има веома значајну улогу у процесима инфламације и имуног одговора, тако

да бројни штетни фактори као што су хипоксија, токсини или радијација воде повећању експресије CXCL-12, регрутовањем CXCR-4-позитивних стем ћелија које треба да одиграју своју улогу у ћелијској репарацији и регенерацији. Врло мало мутација је описано када је у питању CXCR-4. Једина соматска мутација на CXCR-4 је идентификована од стране Hunter-а и његових сарадника код 27% пацијената који болују од Waldenström макроглобулинемије (WM) (Hunter и сар., 2016). То је само један од бројних примера да CXCL-12/CXCR-4 сигнални пут има значајну улогу, не само када је у питању настанак и развој тумора, већ и у бројним инфламаторним стањима и аутоимунским болестима (Chatterjee и сар., 2014).

Сигнални путеви повезани са ангиогенезом и метастазом тумора могу подразумевати хемокине и њихове рецепторе. Под нормалним околностима, они имају важну улогу у имунолошким реакцијама ћелија и миграцији матичних ћелија. Међутим, у патолошким стањима као што је карцином, регулишу инвазију, ангиогенезу, миграцију и настанак метастаза (Muller и сар., 2001). CXCR-4 и CXCL-12 заједно промовишу метастазе, у неким туморима посредују пролиферацију, миграцију туморских ћелија и ангиогенезу (Rutkowski и сар., 2003; Bartolome и сар., 2006; Liang и сар., 2007). Бројна истраживања говоре у прилог високе експресије CXCR-4 у туморским ћелијама. Показано је да механизми који регулишу хипоксију у туморским ћелијама, индукују и повећану експресију овог хемокина (Sun и сар., 2010). Промотор за CXCR-4 ген је део хипоксичног одговора, тако фактор индукован хипоксијом (HIF-1 $\alpha$ ) може активирати транскрипцију CXCR-4. У нормоксији *Von Hippel Lindau* (VHL) протеин, негативни регулатор HIF, деградира CXCR-4. У хипоксији, због недостатка VHL протеина у различитим ћелијским линијама канцера, HIF-1 и HIF-2 стабилизују, а затим изазивају повећану CXCR-4 транскрипцију, а потом активирају сигнални пут CXCL-10/CXCR-4 и CXCL-12/CXCR-4. Такође, HIF преко нуклеарног фактора (NF- $\kappa$ B) промовише повећану експресију CXCR-4. Након стимулације неких лиганда као што је фактор раста хепатоцита (HGF), NF- $\kappa$ B транскрипционо активира CXCR-4 и на тај начин регулише туморску инвазију (Xu и сар., 2015).

Такође је показано да VEGF-A регулише експресију CXCR-4 у ендотелним ћелијама, али и у неким туморима (Bachelder и сар., 2002; Zagzag и сар., 2008). Повећана експресија VEGF индукује високу експресију CXCR-4. Коришћење анти-VEGF терапије може имати за последицу појачавање компензаторних механизма туморског ткива, које у оваквим околностима продукује стварање CXCR-4. Ово сугерише да би анти-VEGF монотерапију требало комбиновати са блокаторима за хемокине (Xu и сар., 2009).



Слика 18. Улога CXCR-4 код карцинома дојке (модификовано са сајта: <https://www.dovepress.com/cxcr4-in-breast-cancer-oncogenic-role-and-therapeutic-targeting-peer-reviewed-fulltext-article-DDDT#>).

У регулацији CXCR-4 у малигним ћелијама учествује и основни фактор раста фибробласта (енгл. *Basic Fibroblast Growth Factor - FGF*), транскрипциони фактори попут нуклеарног респираторног фактора-1 (енгл. *Nuclear respiratory factors - NRF*) и епидермални фактор раста (енгл. *Epidermal Growth Factor - EGF*) (Wegner и сар., 1998; Salcedo и сар., 1999; Phillips и сар., 2005).

CXCL-12 / CXCR-4 сигнални пут има кључну улогу у резистенцији на терапију карцинома: 1) директно промовишу преживљавање ћелија карцинома, инвазију - туморску иницијацију, 2) регрутују мијелоидне ћелије коштане сржи - индиректно олакшавају метастазе карцинома, и 3) промовишу ангиогенезу директно или на паракрини начин (Слика 18), (Teicher и Fricker, 2010; Duda и сар., 2007). Литературни подаци сугеришу да постоји повећана експресија CXCR-4 у фибробластима асоцираним са карциномским ћелијама (енгл. *Cancer-Associated Fibroblasts - CAF*) који играју кључну улогу у туморогенези, иницирају неопластичну прогресију, раст тумора, ангиогенезу и метастазе. Ови подаци сугеришу да фактори у солубилним карциномима дојке иницирају трансдиференцијацију нормалних фибробласта у дојци до тзв. тумор-промовишућих фибробласта преко индукције матрикс металопротеиназе-1 (Kwong и сар., 2009).

У протеклих 10 година, бројна истраживања су спроведена о улози CXCL-12/CXCR-4 сигналног пута код солидних тумора, укључујући карцином дојке. Антагонисти CXCR-4 могу бити обећавајућа средства за превенцију и лечење карцинома дојке. Међутим, мора се имати на

уму да CXCR-4 игра кључну улогу у регулацији нормалних функција ћелије. У ембриогенези утиче на развој централног нервног система, кардиоваскуларног система и регулише хомеостазу. Инхибиција CXCR-4 сигнализације атенуира имуне одговоре, стога умерена активација CXCR-4 пута доприноси инфламацији и корисна је за пацијенте са карциномом. Међутим, претерана активација CXCR-4 пута може пригушити имуни одговор домаћина и смањити антиканцерогену способност. Поред тога, преклиничка тестирања су показала да блокада CXCR-4 може повећати ресорпцију кости и стога промовише раст ћелија тумора у костима (Xu и сар., 2015).

## 2.5 Азот моноксид и реактивне врсте азота (RNS)

Поред реактивних врста кисеоника (енгл. *Reactive Oxygen Species*, ROS), у организму се продукују и реактивне врсте азота (енгл. *Reactive Nitrogen Species*, RNS). Азот моноксид (енгл. *nitric oxide*, NO<sup>•</sup>), као извор свих RNS, је неполаран, високо дифузибилан сигнални молекул, који има особине слободних радикала, јер садржи један неспарен електрон. Лако дифундује кроз ћелијске мембране и ствара комплексе са многим циљним молекулима у скоро свим системима органа (Ignarro, 1999). Механизми молекуларног дејства могу бити директни у којима директно интерагује са циљаним молекулима, као и индиректни где првобитно реагује са молекуларним кисеоником и супероксид анијон радикалом (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) са којима ствара RNS (Wink и Mitchell, 1998).

Азот моноксид настаје из L-аргинина активношћу ензима азот оксид синтетазе (енгл. *Nitric Oxide Synthase*, NOS), при чему током оксидо-редукционог процеса првобитно долази до стварања L-цитрулина. Постоји неколико изоформи овог ензима: ендотелна (eNOS), неурална (nNOS), индуцибилна (iNOS) и митохондријална (mtNOS) (Ignarro, 1999; Elfering и сар., 2002). Сва три типа цитоплазматске NOS садрже флавин аденин динуклеотид (FAD) и флавин мононуклеотид (FMN) и хем (протопорфирин IX), а као кофакторе захтевају (BH<sub>4</sub>) и никотинамид-аденин-динуклеотид фосфат (NADPH), док конститутивни тип NOS везује и Ca<sup>2+</sup>/калмодулин (Weissman и сар., 2002). Активношћу eNOS и nNOS, количине створеног NO су оптималне и неопходне за многобројне физиолошке процесе. У ситуацији када се NO ствара активношћу iNOS, количина NO достиже и до хиљаду пута веће концентрације што ствара услове за развој многих патолошких процеса и стања (Cha и сар., 2010).

Активност iNOS је индукована присуством цитокина и других агенаса (микроорганизама, липополисахарида, ендотоксина итд.), а њена експресија регулисана је на нивоу транскрипције и пост-транскрипционе обраде. У физиолошким условима у већини ћелија, iNOS није експримирана, а степен њене активности зависи од доступности супстрата и присутности

кофактора (Moncada и Higgs, 2006). Активација iNOS се доводи у везу са инфламаторним процесима као и појавом различитих обољења, док хронична инфламација има значајну улогу у патогенези (Fujimoto и сар., 2005). iNOS активирају различити стимулуси у скоро свим ћелијама (Moncada и Higgs, 2006; Sudar, 2011). У недостатку супстрата L-аргинина, нормална активност iNOS може бити нарушена, и у том случају iNOS ствара ROS, пре свега  $O_2^{\cdot-}$  (Heusch и сар., 2010). Веома реактивни NO лако ступа у реакције са ROS, као што је  $O_2^{\cdot-}$ , а последица те интеракције су много реактивнији интермедијерни производи, као што је пероксинитрит (Wink и Mitchell, 1998).

Физиолошка функција NO зависи првенствено од његове концентрације. При ниским концентрацијама, NO делује као сигнализирајући молекул који регулише релаксацију глатке мускулатуре, проток крви, учествује у неуротрансмисијама, у активности тромбоцита, хомеостазе гвожђа, у ћелијском преживљавању и пролиферацији, док у високим концентрацијама модулира анти-туморску активност (Vannini и сар., 2015). Такође, мора се узети у обзир и окружење у коме се налазе карциномске ћелије, које опет може бити извор NO. Ниже концентрације NO, мање од 100 nM спречавају одређене типове карциномских ћелија да уђу у апоптозу, и тиме се фаворизује туморогенеза, неоангиогенеза, односно прогресија тумора (Oronsky и сар., 2014). Високе концентрације NO, више од 500 nM, могу имати про-апоптотски ефекат, цитотоксично и антитуморско дејство на карциномске ћелије (Ridnour и сар., 2008). Сматра се да су високе концентрације NO пореклом из макрофага, неутрофила, ендотелних ћелија, хепатоцита, срчаних миоцита и хондроцита (Fukumura и сар., 2006).

Азот моноксид представља важан унутарћелијски сигнални молекул, учествује у регулацији бројних физиолошких процеса и има улогу медијатора у многим молекулским механизмима који доводе до патолошких стања (Dedon и Tannenbaum, 2004). Тип хемијске реакције у којој учествује и микросредина, одређују улогу NO као сигналног молекула или снажног цитотоксина (Jourdhueil и сар., 2001). Значајан је као вазодилататор, неуротрансмитер, антимикробни молекул и имуномодулатор (Geller и Billiar, 1998). Велики број лекова из групе нитропрепарата остварује своје физиолошке ефекте у организму управо ослобађањем азот моноксида (Marković и сар., 2014). Постоји неусаглашеност ставова о улози NO у физиолошким и патофизиолошким стањима јер биолошки ефекти зависе од производа насталих у метаболизму и реакцијама са другим једињењима. Унутарћелијски NO брзо формира нитрите и нитрате, S-нитрозо-тиоле, нитроксил ањоне ( $NO^{\cdot-}$ ) или пероксинитрите ( $ONOO^{\cdot-}$ ) (Wink и Mitchell, 1998; Marković и сар., 2006). Метаболити NO могу бити генотоксични, изазвати оштећења и модификације ДНК, најчешће формирањем пероксинитрита. Ове реакције могу бити повезане са

изазивањем апоптозе, инхибицијом ензима одговорних за поправку ДНК или липидном пероксидацијом (Ambs и сар., 1998; Marković и сар., 2006).

Редокс регулација има кључну улогу у преживљавању ћелија, регулацији сигналних путева, метаболичким процесима, активацији различитих транскрипционих фактора. Оксидациони стрес се дефинише као поремећај прооксидационо-антиоксидационе (редокс) равнотеже. Ради се о нарушеном балансу између продукције ROS и RNS са једне стране и антиоксидационе заштите са друге стране, при чему се фаворизују прооксиданси узрокујући потенцијална оштећења ћелија и многобројне патолошке појаве, укључујући и малигне болести (Droge, 2002; Halliwell и Gutteridge, 2006). Започињање процеса канцерогенезе је повезано са оксидационим оштећењима ДНК. Ћелије брзо реагују на дисбаланс редокс равнотеже на многобројне начине, и ови рани догађаји одређују да ли ће ћелија окончати живот некрозом, апоптозом, или ће преживети и пролиферисати. Проканцерогена активност ROS укључује стимулацију и промоцију ћелијске пролиферације, инвазивност, ангиогенезу, метастазу и инхибицију апоптозе, док антитуморски ефекти подразумевају њихов утицај на застој ћелијског циклуса, изазивање апоптозе и некрозе, инхибицију ангиогенезе (Stojnev и сар., 2013).

Ефекти NO на карцином могу бити стимулативни и супресорни што зависи од врсте карцинома и концентрације NO, настале (не)равнотежом између његове продукције и инактивације. За време почетног раста канцера, макрофаги убијају малигне ћелије NO зависним механизмом, али такође NO може подстаћи ангиогенезу, појачати раст канцера, инвазију и метастазу (Lala и Orucevic, 1998).

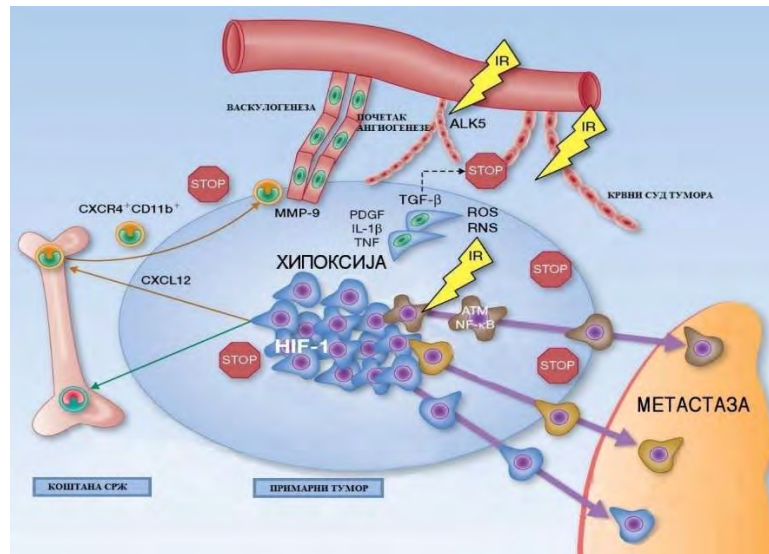
### ***2.5.1 Улога iNOS и NO у неоангиогенези и канцеру дојке***

Солодни тумори представљају скуп, пре свега, туморски измењених ћелија, али и нормалних ћелија, ћелија које учествују у изградњи крвних судова, ћелија које имају имунолошку улогу и мигрирају до самог тумора, итд. Многе од ових ћелија могу бити извор NO, који има бројне улоге у процесима као што су: туморска пролиферација и преживљавање туморских ћелија, миграција, инвазивност тумора, утицај на ћелије имуног система које инфилтришу тумор. Свакако, једна од битних улога NO је мобилизација и активација прогенитора ендотелних ћелија које имају улогу у индукцији неоангиогенезе. Познато је да NO утиче на раст тумора пре свега регулацијом протока крви кроз судове који васкуларизују туморско ткиво (Fukumura и сар., 2006). Поред повећања протока крви кроз туморско ткиво, NO може и на друге начине да утиче на појаву



раста и дисеминације тумора, повећањем пермеабилности крвних судова и стимулацијом активности матрикс металопротеиназа (Lala и Chakraborty, 2001; Fukumura и сар., 2006). Немутирани *p53* ген представља инхибитор неоангиогенезе својом способношћу да снижава активност VEGF и подстиче настанак ромбоспондина 1 који је такође инхибитор неоангиогенезе. Доказана је корелација између губитка активности *p53* и повећане активности iNOS и повећаног обима неоангиогенезе. *p53* „*knock-out*“ мишеви имају повећан морбидитет од крцинома упоредо са повећаном активношћу iNOS (Ambs и сар., 1998). NO стабилизује транскрипцију HIF-а, то даље утиче на продукцију бројних ангиогених фактора као што су VEGF, али и NO. Тако, NO преко низа медијатора утиче и на самопродукцију „позитивна повратна спрега“ (Jin-но и сар., 1998).

У туморима ниске диференцијације васкуларна мрежа не може да испрати бујање малигног ткива и раст тумора који је превише интензиван. Настаје хипоксија у туморском ткиву као последица различитих фактора. У хипоксичним условима блокирана је разградња HIF-1 $\alpha$ , што има за последицу акумулацију овог протеина и његово повезивање са  $\beta$  субјединицом, резултујући стварањем активног HIF-1 (Geng и сар., 2001). HIF-1 покреће производњу хемокина и рецептора хемокина који би могли да омогуће миграње карциномских ћелија на удаљене локације тј. обезбеђује метастазирање и инвазију карцинома (Murdoch и сар., 2004). У самом процесу метастазирања, инвазије и неоангиогенезе кључну улогу играју ендопептидазе, MMP-9 које деградирају екстраћелијски матрикс и разграђују базалну мембрану и тиме доприносе прогресији тумора. Повећање експресије HIF-1 $\alpha$  у туморским ћелијама регулише експресију VEGF и iNOS-а који омогућавају пермеабилност крвних судова и стимулишу активност матрикс металопротеиназа, што све резултује иницирањем стварања новог крвног суда (Palazon и сар., 2014) (*Слика 19*). Преко новоствореног крвног суда, тумор добија неопходне материје за раст и развој, као и дисеминацију туморских ћелија у друге органе, тј., долази до метастазирања.



Слика 19. Молекуларни механизми раста, инвазије, метастазе и неоангиогенезе код тумора (модификовано са сајта: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/18/19/5196>).

### 3. *Ћелијске линије као модел системи за изучавање карцинома дојке и тестирање нових терапијских модалитета*

Откривање и развој антитуморских лекова има дугу историју и обухвата многобројна преклиничка истраживања и тестирања једињења са потенцијалним цитостатским или цитотоксичним ефектима на хуманим ћелијским линијама. Према Америчком Националном Институту за канцер, потенцијално активне супстанце пролазе *прескрининг* на неколико ћелијских линија најчешћих типова тумора, а затим се једињења која покажу активност испитују много детаљније на широј листи ћелијских линија (најчешће 60 различитих ћелијских линија пореклом из различитих органа) и анималним моделима (Burger и Fiebig, 2004).

Ћелијске линије представљају изоловане, различите врсте ћелија, способне за гајење у лабораторијским условима. Могу бити адхерентне, односно залепљене за подлогу у којој се гаје или у суспензији, које за своје преживљавање не захтевају везу са подлогом или другим ћелијама. Могу бити генетички идентичне и називају се хомогене или показују одређене генетичке варијације и представљају хетерогене популације. Ћелије изоловане директно из ткива се зову примарне културе. Са изузетком неких малигних ћелија, примарне културе углавном имају кратак животни век. Добијају се различитим експерименталним поступцима, као што је изолација ћелија из крви, механичком изолацијом пресовањем ткива кроз различите филтере или ензимском деградацијом ензимима који разлажу међућелијски матрикс (колагеназе и трипсин). После неколико деоба популације ћелија престају да се деле и смањује се њихова вијабилност, па је неопходно да се експерименти са примарним културама врше одмах након изолације. Други тип ћелија се комерцијално поручује и то су имортализоване ћелијске линије, које имају неограничену способност пролиферације, што се постиже мутацијом или модификацијом одговарајућих гена. Постоје колекције ћелијских линија, тзв. „банке ћелија“, које нуде велики избор добро окарактерисаних ћелијских линија. Највеће и најпознатије колекције су ATCC (*The American Type Culture Collection*) и ECACC (*The European Collection of Animal Cell Cultures*) (Harrison и Rae, 1997).

Гајење ћелија у култури је нашло многобројне примене јер омогућава једноставна испитивања физиологије, биохемије и метаболизма ћелија. Веома су погодне за изучавање регулације пролиферације, диференцијације и смрти ћелија, проучавање интерцелуларних и интрацелуларних сигналних путева. Културе ћелија представљају основу за истраживање канцера, евалуацију дејства терапеутских агенаса, тестирање ефеката различитих хемијских једињења или лекова на здравим или малигним ћелијама и пружају могућност за лако истраживање ћелијских механизма којима они подлежу у ћелији (Allen и сар., 2005; Ћурчић и

сар., 2014, Ćurđić, 2014). Свака експериментална супстанца са потврђеним терапеутским потенцијалом мора проћи дуге циклусе преклиничког испитивања лека. Коришћење ћелијских линија је нашло примену у решавању проблема од велике важности, нарочито проблема повезаних са механизмима настанка одређене болести и развоју нових дијагностичких и терапеутских процедура. На ћелијама у култури могућа су истраживања у веома актуелној области познатој као инжењеринг ткива, комбиновањем различитих типова ћелија ради стварања вештачких ткива, на пример вештачке коже. Бројне ћелијске културе су основа за генске манипулације и производњу вирусних вакцина и других биотехнолошких продуката. Биолошки продукти добијени рекомбинантном ДНК технологијом у ћелијским културама укључују ензиме, специфичне протеине, синтетисане хормоне, моноклонска антитела, интерлеукине и др. Једна од примена је гајење, криопрезервација и складиштење матичних ћелија. Због свега наведеног култура ћелија је постала основ молекуларне генетике, имунологије, фармакологије и производње лекова и готово неопходна за развој биотехнологије (Harrison и Rae, 1997).

Процес гајења ћелија у култури подразумева одржавање одређеног типа ћелија у контролисаним условима. За свој раст и размножавање ћелије захтевају специфичне услове средине, одговарајућу температуру, осмотски притисак, рН,  $O_2$  и  $CO_2$  (најчешће је  $37\text{ }^\circ\text{C}$  и  $5\% CO_2$ ). Комерцијално набављене ћелијске линије карцинома дојке представљају добар модел систем за истраживање ефеката потенцијалних лекова из разлога што су генетичке абнормалности одговорне за испољавање одговарајућег фенотипа познате. *The American Type Culture Collection* нуди листу великог броја ћелијских линија карцинома дојке и информације о карактеристикама, условима гајења и манипулације њима, као и информације о мутираним генима у свакој од њих. MDA-MB-231 је имортализована адхерентна ћелијска линија која је изолована из хуманог тумора дојке. По морфологији ове ћелије су сличне фибробластима коже, вретенасте су и врло инвазивне. Одликује их брз и прогресиван раст. Троструко су негативне, што значи да не експримирају рецепторе за естроген, прогестерон и немају повећану експресију *HER-2* гена. Стога, ова ћелијска линија као представник веома агресивног типа карцинома дојке, резистентна на различите модалитете терапије, јесте добар модел систем за истраживање. Хумани фибробласти MRC-5 су ћелијске линије изоловане из плеуре и по својој морфологији врло су сличне ћелијским линијама карцинома дојке (MDA-MB-231 и MCF-7). С обзиром да су фибробласти ћелије строге карцинома, представљају добар контролни модел систем за поређење ефеката потенцијалних лекова. Такође, добар модел систем за упоређивање су HUVEC примарне ендотелне ћелијске линије, изолована из ендотела хумане умбиликалне вене. Користе се као лабораторијски модел за проучавање функције и патологије ендотелних ћелија (нпр ангиогенеза).

hAoSm су примарне глатко-мишићне ћелијске линије изоловане из мускулатуре хумане аорте, које представљају добар модел систем за проучавање проучавање кардиоваскуларних функција, ангиогенезе итд.

### ***3.1 Електропорација и електрохемиотерапија***

Упркос напретку у лечењу, карцином дојке је и даље један од водећих узрока смрти и очигледно су потребни нови приступи у лечењу. Један од модерних модалитета лечења ове болести представља електропорација. Када се биолошко ткиво изложи врло кратким напонским импулсима високе амплитуде, настаје електрично поље. Уколико се интензитет насталог електричног поља повећа изнад одговарајуће критичне вредности, ћелијска мембрана постаје пропустљива за јоне и молекуле, који иначе не могу да прођу у ћелију. Оваква модулација пропустљивости ћелијске мембране под утицајем електричног поља назива се електропорација или електропермеабилитација и омогућава појачан транспорт молекула и јона у ћелију (Yarmush и сар., 2014).

Електропорација може бити реверзибилан или иреверзибилан процес зависно од могућности ћелије да опорави интегритет и функцију мембране. Иреверзибилна или неповратна електропорација је нова аблативна техника за лечење неоперабилних, меких карцинома. Користи ултра кратке импулсе, којима се нарушава хомеостаза у циљаном ткиву преко пермеабилитације плазмамембране карциномских ћелија. Услед оваквих промена на мембрани као и аблативних ефеката наступа ћелијска смрт. За разлику од термалних техника, иреверзибилна електропорација оставља околно ткиво нетакнуто, тако што доводи до мање споредних ефеката, мање морбидитета, што за крајњи резултат има бржи опоравак пацијента (van den Bos и сар., 2016; Vogel и сар., 2016).

Због минималних споредних ефекта, за разлику од агресивнијих облика терапије као што су хемотерапије и радиотерапија, примена иреверзибилне електропорације представља нове модалитете у лечењу карцинома. Друге локалне аблативне технике као што су криоаблација, радиофреквентна аблација (РФА), микроталасна аблација и фокусирани ултразвук високог интензитета јесу термо технике и могу оштетити виталне структуре у близини тумора (Wagstaff и сар., 2016). Имуноцитолошка евалуација ћелија третираних иреверзибилном електропорацијом показује карактеристике некрозе и апоптозе (Cvetković и сар., 2017). Програмирана ћелијска смрт - апоптоза је повезана са регенерацијом ткива и не изазива системски имуни одговор, стога је и најпожељнији ефект. Ипак, мора се поменути да у зависности од различитих параметара (јачине

електричног поља, броја пулсева, временског интервала итд.) може изазвати и појаву коагулационе некрозе (Cvetković и сар., 2017).

Комбинација реверзибилне електропорације са хемиотерапијом је еволуирала у нову методу која се користи као третман солидних тумора познат под називом електрохемиотерапија (Miklavcic и сар., 2015). Електрохемиотерапија користи електрично поље да омогући повећану апсорпцију хемиотерапеутских лекова селективно у ћелије тумора. Ово је локални третман електричног поља високог напона на ћелијама, а као резултат је повећана пермебилност плазма мембране. На овај начин, антинеопластични агенси, лакше улазе у ћелију и имају повећану цитотоксичност. Сходно томе, укупна доза ових агенаса може бити значајно смањена и бројне нуспојаве могу се на овај начин избећи.

Хемиотерапија претставља коришћење цитостатика који обично делују на цело тело, како би се уништиле ћелије карцинома. На овај начин, цитостатици утичу и на здраве, нормалне ћелије посебно ћелије које се брзо деле (ћелије косне сржи, ћелије корена длаке, гастроинтестиналног тракта и др.). Захваљујући електропермеабилности ткива, хемиотерапија може постати локална метода за селективно одстрањивање тумора. У комбинацији са електропорацијом, цитостатик делује само на део ткива који је изложен електричном пољу тј. на ткиво између електрода (Garcia и сар., 2014).

### ***3.2 Преклиничка испитивања биоактивних супстанци***

Фитотерапија је метода лечења, ублажавања и спречавања болести и тегоба употребом целих биљака или њихових делова (цветова, листова, корена, итд.) у виду етеричних уља и других изолата или као готових приправака: чајева, тинктура, масти, капсула. Француски лекар Henri Leclerc (1870-1955) је увео у медицину термин фитотерапија уместо назива “биљна медицина”. Фитотерапија је први облик медицине који је човек познавао и преносио усменим путем. Употреба лековитог биља као терапијског и профилактоичког средства има у нашем народу богату и дугу традицију. О томе најбоље сведоче многобројни стари списи: Ходошки кодекс, који се сматра најстаријим кодексом српске световне медицине (XIV век), Хиландарски медицински кодекс број 517 (XV или XVI век), најдрагоценији споменик српске медицинске културе. Захарије Стефановић Орфелин је у Великом Српском Травнику (1783.) описао десетине лековитих биљака, а Вук Стефановић Караџић у Српском ријечнику (1818.) писао о употреби лековитих биљака у народу. Оснивач наше ботанике др Јосиф Панчић и његов ученик и сарадник др Сава Петровић (Gostuški, 1979), поставили су темеље фитотерапије код нас (Из Википедије, слободне

енциклопедије). У свету се користи преко 10.000 биљних врста са лековитим својствима. Први писани подаци о употреби лековитих биљака потичу из Кине из периода од 3.000 година пре наше ере. У 19. веку немачки апотекар Wilhem Selingerје из опијума изоловао морфин, што се сматра почетком развоја посебне науке о лековитим деловањима биљака, животињских органа и неких минерала – фармакогнозије (Википедија, слободне енциклопедије).

Светска Здравствена Организација процењује да се 80% становника ослања на традиционалну медицину за своју примарну здравствену заштиту (Sakarkar и Deshmukh, 2011). Висока цена, штетни ефекти и резистенција на тренутно коришћене лекове води ка повећаној пажњи и коришћењу биљака као извора медикамената (Joy и сар., 2001). Повољни фактори су цена и њихова доступност, а циљ коришћења биљака као извора терапеутских агенаса је да се изолују биоактивне компоненте за директну употребу (нпр. морфин, таксол, винбластин, винкрестин), као и да се произведу биоактивна једињења нових или познатих структура са бољом активношћу и мањом токсичношћу на здраве ћелије (Fabricant и Farnsworth, 2002). Сарадња између традиционалне медицине и модерне биотехнологије усмерена је ка развоју нових лекова и суплемената.

### 3.2.1 Биљке са антитуморским својствима

Биљке, као извор биоактивних једињења, су одувек коришћене у превенцији и лечењу карцинома. Велики број антитуморских лекова, чак 60%, потиче из природних извора (Cragg и Newman, 2005).

Интензивна истраживања антитуморских супстанци почињу изолацијом винка алкалоида (винбластина и винкрестина) из биљке *Catharanthus roseus* G. Don. То су били први агенси у клиничкој употреби у третману канцера, примарно коришћени у комбинацији са другим хемиотерапеутицима (Gueritte и Fahy, 2005). Откриће паклитаксела (Taxol) из тисове коре *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) и других врста рода *Taxus* је друга потврда успеха природних супстанци у лечењу канцера. Паклитаксел је показао значајну активност на малигне ћелије пореклом из различитих органа (Kingston, 2005). Камптотетин, изолован из кинеског украсног дрвета *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae) и иринотекан, синтетисан дериват камптотетина коришћени су за третмане карцинома оваријума, плућа и колоректалног карцинома (Rahier и сар., 2005). Епиподофилотоксин је изомер подофилотоксина који су изоловани из коренова биљака из рода *Podophyllum*. Етопсид и тенипосид су два широко синтетисана деривата епиподофилотоксина, коришћена у третману лимфома и карцинома простате (Lee и Xiao, 2005). Хомохаринготонин изолован из кинеског дрвета *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea* Sieb и

Zuss., такође је агенс природног порекла у клиничкој употреби (Cragg и Newman, 2005; Shoeb, 2006; Prakash и сар., 2013).

Осим наведених, изолован је и идентификован велики број биоактивних једињења из биљака. Неки од њих су у клиничкој употреби или у фази преклиничког тестирања (Ćurčić и сар., 2014). Истраживање нових антитуморских агенаса из природних извора се базира на испитивањима цитотоксичности на различитим ћелијским линијама и *in vivo* моделима (Dholwani и сар., 2008; Prakash и сар., 2013; Žižić и сар., 2013). Неки од могућих механизма дејстава биљака на канцер су инхибиција пролиферације малигнућ ћелија директно стимулацијом макрофагнућ фагоцита повећањем активности "природних убица", повећавање броја леукоцита стимулацијом хематопоезне функције (Haddad и сар., 2005) и изазивање апоптозе малигнућ ћелија (Daniel и сар., 2006). Многе биљке показују активност тако што интерагују са тубулином и потпомажу деполимеризацију тубулина или инхибирају топоизомеразу I (Cragg и Newman, 2005). Са проналаском великог броја молекулских механизма који учествују у појави и развоју канцера повећао се број испитиваних једињења и њихових ефеката на различите компоненте сигналућ путева.

Антитуморски ефекти биљних екстракта су углавном резултат кумулативне активности и синергистичких интеракција различитих компоненти присутних у биљци (Zhang и сар., 2003). За многе биљне врсте није потврђен молекуларни механизам њиховог антитуморског деловања и потенцијална антитуморска својства многих биљака нису испитана. Такође, нису испитане њихове међусобне интеракције и интеракције са хемиотерапеутицима приликом њихових евентуалних комбинација.

Истраживања показују да исхрана намирницама које садрже фитохемикалије може имати повољан утицај на здравље људи (Woo и сар., 2009). Биолошки активне компоненте заступљене у биљкама су на првом месту фенолна једињења, фитостерогени, фитостероли, лектини, олигосахариди и полинезасићене масне киселине (Gee и сар., 2001).

Поред примарног метаболизма у коме настају основни биомолекули као што су протеини, угљени хидрати и липиди (Kruger и сар., 1999; Smith и Guerinot, 2003), у биљкама се синтетишу одређена једињења која немају нутритивну вредност, али показују одређена биолошки активна својства (Blumenthal и сар., 2000). Ова једињења се називају секундарни метаболити или фитохемикалије и углавном су резултат адаптације биљке на услове животне средине. Секундарни метаболити имају значајну улогу као одбрамбени механизми на биотичке и абиотичке утицаје, значајни су у еколошким интеракцијама биљака, као пигменти и имају многе друге улоге. Међусобно се разликују у погледу хемијске грађе и функције, заступљености код



различитих биљака или таксона. Квантитативно-квалитативни састав се мења током вегетационог периода, годишњег доба, а зависи и од самог стања биљке, присуства или одсуства стреса и др. (Khan и сар., 2011).

Епидемиолошке студије показују да исхрана богата воћем и поврћем значајно смањује ризик од настанка канцера, сугеришући да би одређени антиоксиданси могли бити ефективни агенси за превенцију ове болести (Fresco и сар., 2006). Последњих година, проналазак једињења добијених из биљака и њихово тестирање на антитуморску активност представља главну област експерименталног истраживања. Многобројне *in vivo* и *in vitro* студије наводе антитуморски потенцијал ових једињења. Велики број изолованих фенолних једињења укључујући антоцијанине, кафеинску киселину, кампферол, кверцетин, естре кумаринске киселине, инхибирају раст ћелија различитих врста канцера (Volate и сар., 2005; Dai и Mumper, 2010; Rajendra Prasad и сар., 2011; Li и сар., 2014a, 2014b).

Проучавање инвазивних биљака заокупља инетересовање великог броја истраживача широм света, будући да је управо ова категорија биљака један од важнијих фактора угрожавања аутохтоне флоре одређеног подручја. У флори Србије, присуство инвазивних биљака нарушава, првенствено њену вегетацијску композицију и биполарни карактер животних форми. Свако подручје одликује се одређеним диверзитетом флоре кога чине аутохтони елементи карактеристични за дату област, али и велики број адвентивних врста, које су намерно или случајно унете у неки предео деловањем човека (Rušek и Richardson, 2010). Инвазивне биљке су, натурализовани, унешени биљни таксони који се развијају у великом броју на локалитетима знатно удаљеним од родитељске биљке, имају изузетну репродуктивну снагу и моћ да освајају велике просторе вршећи знатан еколошки притисак на аутохтону флору. При томе треба направити разлику између експанзивности која карактерише ширење аутохтоних елемента флоре и инвазивности која је увек повезана са деловањем човека и која по правилу изазива бројне проблеме животне средине (Genovesi, 2005). Најзначајни представници инвазивних врста у Србији су *Robinia pseudoacacia* (Line) и *Amorpha fruticosa* (Line). *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* припадају истој фамилији Fabaceae. Дејство *Robinia pseudoacacia* је антиспазмолитичко, диуретичко, користи се као холагог, доказано је и антиканцерогено дејство када је из цвета ове врсте изолован бензалдехид (Duke и Whain, 1981). *Amorpha fruticosa* делује антиканцерогено, антимикробно, оксидативно и фитотоксично (Jakovljević и сар., 2015).

#### 4. *Data-mining*

Развојем дијагностичких и терапијских процедура као и компјутерске технологије огромне медицинске базе података су постале доступне истраживачима, тако да је потреба за софтверским решењима која су у стању да брзо и ефикасно обрађују тако велике количине података веома изражена (Clark и сар., 1994; Chen и сар., 2015). Лекари постепено постају фамилијарни са оваквим софтверима који им могу помоћи у доношењу закључака. У том смислу посебно су популарни тзв. прогностички калкулатори који се користе за процену вероватноће појаве карцинома, али и настанка рецидива и метастаза. Иако нема сумње да је одлука експерта и даље најважнија приликом доношења одлуке о модалитетима лечења, различити системи вештачке интелигенције могу бити веома корисни (Joseph, 2007). Данас је употреба вештачке интелигенције веома заступљена у различитим медицинским апликацијама. Предности употребе оваквих софтвера су бројне: релативно су јефтине, кориснички оријентисани, прилично тачни и свакако утичу на смањење субјективности приликом доношења врло важних одлука. *Data mining* софтверски пакети на тај начин могу лекарима указати на везе између појединих параметара који утичу на настанак или развој болести које су раније једноставно измицале истраживачима у мору података.

Када су у питању пацијенти са карциномом дојке, пређашње студије су посебно указивале на значај и применљивост методе неуронских мрежа (Motaleb, 2014). Предвиђање исхода лечења пацијената са карциномом дојке је један од најзначајнијих задатака када је примена *data mining*-а у медицини. Да би што боље „нахранили“ *data mining* софтвер, истраживачи сакупљају што већу количину података о параметрима који доказано имају утицаја на настанак и развој карцинома, а затим податке пропуштају кроз аутоматизована „оруђа“ за обраду. Брз развој *data mining*-а је довео до појаве читавог сета супортативних медицинских дијагностичких средстава, који се користе у многим областима медицине, пре свега у онкологији, али и у гастроентерологији, кардиологији, итд. Супортативна онкологија има за циљ да подржи болесника и породицу и да им помогне да се суоче са дијагнозом, симптомима малигне болести, нежељеним дејствима њеног лечења и психолошким, социјалним и духовним тегобама које прате малигну болест. ***У тренутку када се постави дијагноза најважније је помоћи болеснику да разуме своју болест, сагледа тежину и могућности лечења.***

Када се узме у обзир морбидитет и морталитет од карцинома дојке не чуди да је баш у овој области *data mining* технологија можда и најзаступљенија, тако да су многи класични и модификовани *data mining* системи коришћени за обраду података у овој области. „*Decision trees*“ је један од система који је лако разумљив, лако се тумаче резултати, тј. има „*user friendly*“

интерфејс, тако да је протеклих година прилично експлоатисан. Методологија се може представити као низ “ако-онда” правила. C5.0 је један од најзначајнијих софтвера у *decision tree* групи. Rafe је са сарадницима користио C5.0 алгоритам за развој модела за *Clementine* софтвер. То је база података која је коришћена у “*Wisconsin Breast Cancer database*”, која садржи 10 атрибута и 699 инстанци (Rafe, 2014). Khan је са својим сарадницима представио хибридную прогностичку шему на основу обраде *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER) базе података (1973 to 2003) Националног Института за Карцином, која садржи 162,500 записа са 17 варијабли (Khan, 2008).

Данас смо сведоци растућег тренда примене *Machine Learning* (ML) техника са циљем да се развије персонализовани предиктивни модел. Персонализација или индивидуализација терапије је иначе циљ коме тежи модерна медицина, пре свега у области онкологије где се највише ради на том плану, али свакако и у осталим областима медицине. Одавно је примећено да пацијенти са истим типом карцинома, у истом стадијуму болести веома различито реагују на исте терапијске режиме. Тако се долази до закључка да поједине везе између параметара који утичу на ток и развој болести упорно измичу истраживачима. *Data mining* системи би управо могли да помогну истраживачима по том питању (Kourou и сар., 2014).

Лекарима је на располагању веома широк дијапазон лечења када је у питању карцином дојке, од поштедне хирургије без адјувантне (додатне) хемио- и радиотерапије, до веома мутилатних оперативних метода праћених агресивним хемиотерапијским и зрачним протоколима. Мада је логично претпоставити да би агресивни режими лечења требало да имају већег учинака када је у питању смањење вероватноће настанка рецидива и удаљених метастаза, бројне студије су показале да би око 70% пацијената који су били подвргнути оваквим агресивним протоколима лечења преживели и без њих (Sun и сар., 2007). За сваку превенирану смрт од карцинома дојке, процењује се да 3 пацијенткиње непотребно бивају подвргнуте овако агресивним третманима, који су све само не безопасни (Lee и сар., 2015). Могућност да предвиде исход лечења са великом вероватноћом омогућила би лекарима да донесу најбољу одлуку по питању екстензивности оперативне процедуре и хемио- и радиотерапије у адјувантном или неoadјувантном протоколу (Park и сар., 2013).

## II ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

### *Хипотезе*

- ❖ Данашњи онколошки протоколи су превише крути и апроксимативни и донекле занемарују особности пацијента и биологију тумора сваког пацијента. Сходно томе, циљ коме тежи модерна онкологија је индивидуализација терапије, што је и основна премиса ове дисертације.
- ❖ Перитуморско ткиво представља активан чинилац у процесу туморогенезе и метастазирања.
- ❖ Неоангиогенеза је веома битан механизам у процесу развоја карциномске болести и молекуларни маркери који су у вези са овим механизмом могу се регистровати у туморском, али и у перитуморском ткиву.
- ❖ Електротерапија, електрохемиотерапија, као и фитотерапија могу бити корисни видови антинеопластичног третмана, самостално или у комбинацији са осталим стандардним видовима онколошке терапије.
- ❖ *Data mining* методологија је корисна за предикцију исхода болести код пацијената са карциномом дојке.

### *Општи циљеви*

- Анализа молекуларних параметара неоангиогенезе у туморском и перитуморском ткиву пацијената са карциномом дојке, као једног од механизма који је круцијалан у процесу појаве и развоја тумора.
- Анализа утицаја електропорације и електрохемиотерапије на здравим и карциномским ћелијским линијама.
- Анализа утицаја биоактивних супстанци на здравим и карциномским ћелијским линијама.
- Обрада резултата помоћу модерних информационих технологија и софтвера за предвиђање исхода болести, што би резултирало протоколом лечења који је специфичан за сваког појединачног пацијента.

**Специфични циљеви**

- Показати да ниво протеинске експресије MMP-9, као и генске експресије *VEGF-A*, *HIF-1*, *CXCL-12* и *iNOS* у туморском и перитуморском ткиву код пацијета са карциномом дојке зависе од одређених патохистолошких карактеристика (врсте тумора, година пацијената, рецепторског статуса за хормоне и хумани епидермални фактор раста).
- Показати да су нивои протеинске експресије MMP-9, као и генске експресије *VEGF-A*, *HIF-1*, *CXCL-12* и *iNOS* у туморском и перитуморском ткиву код пацијета са карциномом дојке у вези са степеном агресивности болести (TNM класификацијом и хистолошким градусом).
- Показати да однос испитиваних маркера у туморском и перитуморском ткиву има улогу у исходу лечења и прогнози болести код пацијета са карциномом дојке.
- Показати да је протеинска експресија CXCR-4 и VEGF<sub>165b</sub> рецептора присутна и у туморском и перитуморском ткиву.
- Испитати утицај електропорације на здравим MRC-5, hAoSm и HUVEC и карциномским MDA-MB-231, SW-480, HCT-116 ћелијским линијама.
- Испитати утицај електрохемиотерапије помоћу паклитаксела на ћелијским линијама карцинома дојке MDA-MB-231 и MCF-7.
- Испитати антиинвазивно дејство *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* на здравој (MRC-5) и карциномској (MDA-MB-231) ћелијској линији.
- Обрадити две базе података пацијената са карциномом дојке коришћењем *data mining* софтвера.

### III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Експериментални део истраживања реализован је у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Истраживање представља део пројекта Министарства на науку и образовање Републике Србије број III41010. Узорци (туморско и перитуморско ткиво) су сакупљани у сарадњи са Клиником за општу и грудну хирургију и Службом за патолошку анатомску дијагностику Клиничког Центра у Крагујевцу. Истраживања у овој дисертацији су обављена у складу са Хелсиншком декларацијом.

#### 1. Хемикалије и реагенси

Коришћене хемикалије и реагенси набављени су од различитих произвођача. Медијум за гајење ћелија (*Dulbecco's modified Eagle - DMEM*) и физиолошки раствор са фосфатним пуфером (*Phosphate-Buffered Saline - PBS*), добијени су од Gіrco, USA. Фетални говеђи серум (*Fetal Bovine serum - FBS*) и трипсин-ЕДТА добијени су од компаније PAA (*The Cell Culture Company, Austrija*), Pasching, Austria. DMSO (dimethyl sulfoxide), етидијум бромид (*Ethidium bromide - EB*), говеђи албумин из серума (*Bovine Serum Albumine - BSA*), хлороформ, етанол и изопропанол PCR чистоте добијени су од компаније Serva, Немачка. Кит за одређивање концентрације MMP-9 (*Human MMP-9 ELISA kit DUOSET*) као и моноклонско антитело *Anti-human Antibody VEGF165b* од RD System, Minesota, USA. Китови за превођење РНК у комплементарну ДНК (*QuantiTect Reverse Transcription Kit*) и PCR Кит (*Sensiscript Reverse Transcriptase Kit - RT*) од Qiagen, Немачка. Вода PCR чистоте и *TRIzol* од Ambion, USA. Кит за експресију гена *KapaSYBR Green PCR Master Mix* од произвођача KAPA Biosystems, Boston, USA. Прајмери од произвођача Eurofins Genomics, Ebersberg. Поликлонско антитело CXCR4/CD184 Antibody добијени од компаније Thermo Fisher, USA. *Endothelial Cell Growth Medium (EGM™ Plus Growth Media Lonza, North America)*, *SMGM™ -2 Smooth Muscle Growth Medium-2 (SMGM™, Lonza, North America)*. *Acridine orange (AO)* од Acros organics, New Jersey, USA. *Paclitaxel* купљен од фирме Sigma-Aldrich, USA. Електропорациони пуфер коришћен за електропермеабилитацију се састоји од 250 mM сахарозе, 10 mM фосфатни пуфер и 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4.

## 2. Критеријуми за укључивање пацијената у студију

За потребе истраживања у оквиру докторске дисертације анализирано је туморско и околно перитуморско ткиво. У студију су укључене пацијенткиње са дијагносикованим карциномом дојке. Све пацијенткиње су прегледане од стране Онколошког конзилијума КЦ у Крагујевцу, након чега су подвргнуте одговарајућој хируршкој интервенцији. Након прегледа онколошког конзилијума, уз добровољни пристанак пацијената са канцером дојке и одобрење Етичког Комитета Клиничког Центра у Крагујевцу (КЦ Крагујевац бр. 01-4990) узимани су узорци ткива. Сви пацијенти су били и писмено информисани о свим детаљима студије. Током операције која се рутински изводи на Клиници за општу и грудну хирургију у КЦ Крагујевац узимани су узорци карцинома дојке (n=50) и перитуморског ткива (n=50). Узорци карциномског ткива су различите величине у зависности од величине самог тумора, а узорци перитуморског, макроскопски неизмењеног ткива су узимани на око 3 cm од макроскопске маргине тумора. Сви узорци су прошли патохистолошку верификацију Службе за патолошку и анатомску дијагностику, КЦ Крагујевац. Узорци су чувани на температури од -196 °C до извођења анализа. Сваки узорак је прошао хистопатолошку евалуацију: хистолошки тип, туморски градус (*Nottingham Histological Scores*), старост пацијената, статус лимфних нодуса, естрогенски, прогестеронски и HER2/neu статус евалуиран је према протоколу *American Joint Committee on Cancer* - AJCC, 7th ed., 2010 (Elston и Ellis, 2002; Edge и Compton, 2010).

У студију нису укључене пацијенткиње код којих је преоперативно спроведена неoadјувантна терапија. Неoadјувантна терапија је употреба цитостатика пре хируршке или зрачне терапије да би се смањио тумор или покушало заустављање напредовања већ проширеног тумора у телу. Овај вид терапије може служити за стварање предуслова за операцију. Такође, из студије су искључене пацијенткиње са претходном историјом карцинома дојке. Искључене су пацијенткиње са присутним метастатским депозитима пореклом из других органа. Испитивање ни у ком случају није ометало лечење какво се иначе рутински спроводи у КЦ Крагујевац према важећим принципима добре клиничке праксе.

## 3. Припрема узорака ткива

Узорак ткива је измерен и хомогенизован на леду. Хомогенизација је вршена додатком 500 µl хладног пуфера за лизирање на 0,01 g узорка. Апарати хомогенизатор (*IKA Homogeniser IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Germany*) и ултрасонични хомогенизатор (*Ultrasonic homogenizers Sonopuls, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Germany*) су коришћени за аутоматску

хомогенизацију узорака. Пуфер за лизирање је садржавао следеће компоненте 31.25 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% глицерола и допуњен је до 100 ml dH<sub>2</sub>O. Након филтрирања, пуфер за лизирање је чуван на собној температури. Након центрифугирања на 10,000 rpm на 4 °C, 10 минута, издвојен је супернатант, који представља укупан ћелијски лизат. На овај начин су издвојени укупни протеини из туморског и перитуморског ткива. Укупна концентрација протеина у супернатанту је одређивана Lowry-евом методом. Супернатанти су еликутирани и чувани на -80 °C до извођења анализа.

### 3.1 Одређивање концентрације протеина методом по Lowry-у

У 0,1 ml супернатанта (узорака туморског и перитуморског ткива) додато је 0,1 ml 0,2 M NaOH и 0,3 ml Реагенса II (бакар карбонатни реагенс). Реагенс II се добија мешањем 1 ml раствора 1% CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O и 2% K, Na-тартарата. Смеша је допуњена до 0,1 ml са 0,2 M NaOH (Реагенс I). Након инкубације од 15 минута на собној температури додато је 0,6 ml Folin-Ciocalteu-реагенс (енгл. *Folin-Ciocalteu reagent - FCR*). После инкубације од 30 минута на собној температури, мерена је апсорбанца на 490 nm. Концентрација протеина је одређивана на основу измерене апсорбанце из стандардне криве конструисане на основу познате концентрације протеина говеђег серума албумина (Lowry и сар., 1951).

### 3.2 Одређивање концентрације металопротеиназе 9 (ММП-9)

Укупна концентрација металопротеиназе-9 је детекована ензимском, имунолошком методом ELISA (енгл. *Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay*) према приложеном протоколу (*Human MMP-9, DuoSet, Ca.No. DY911, active and proforme MMP-9 R&D Systems*). Квантификација се врши колориметријски, а интензитет боје је директно пропорционалан концентрацији ММП-9. Метода се заснива на мерењу укупне количине ММП-9, ензима који учествује у разградњи екстрацелуларног матрикса, а који може бити у активној или проформи (Коерке и сар., 2015). Апсорбанца је мерена на 450 nm на ELISA читачу. Концентрација је прерачуната на основу познатих концентрација ММП-9 из стандардне криве.

На микротитар плочу са 96 бунарића наливено је примарно антитело за ММП-9. Плоча је инкубирана 24 сата на 37 °C. Након истека периода инкубације, примарно антитело је испирано 3 пута пуфером за испирање (*Wash Buffer*). Након испирања антитела у сваки бунарић је додато 300 µl 1% говеђег албумина из серума (*Reagent Diluent*). Плоча је инкубирана 60 минута на 37 °C.



По завршеној инкубацији сви бунарићи су аспирирани и додато је по 100  $\mu\text{l}$  узорка (супернатанти туморског и перитуморског ткива, као и супернатанти ћелија). Концентрација протеина у лизату карцинома и перитуморског ткива је била у свим узорцима униформна и износила је 20  $\mu\text{g/ml}$ . Узорци су ресуспендовани у 1% BSA (*Reagent Diluent*). За конструисање стандардне криве, у бунариће је додато по 100  $\mu\text{l}$  раствора познате концентрације MMP-9 (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 и 2000  $\text{pg/ml}$ ). Плоча је инкубирана 2 сата на собној температури. Након истека инкубације сви бунарићи су аспирирани и у сваки је додато по 100  $\mu\text{l}$  секундарног антитела за MMP-9 (*Detection Antibody*). Плоча је поново инкубирана 2 сата на собној температури. Након истека инкубације вршена је аспирација секундарног антитела, а након тога је додато по 100  $\mu\text{l}$  *Streptavidin HRP-a*. Овај протеин је створио комплекс стрептавидин-биотин који је отпоран на третирање органским растварачима. После истека инкубације од 20 минута на собној температури, у сваки бунарић је додато 100  $\mu\text{l}$  *Substrat Solution-a* ( $\text{H}_2\text{O}_2$  : Tetrametilbenzidin = 1 : 1), а плоча је поново инкубирана 20 минута у мраку. Након истека инкубације додато је по 50  $\mu\text{l}$  2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (*Stop Solution*) у сваки бунарић. Овај раствор је зауставио реакцију и фиксирао детектовану MMP-9. Аспорбанца је мерена на ELISA читачу на 450 nm, према упутствима *R&D Systems (Human MMP-9 Duo Set ELISA)*.

### **3.3 Одређивање протеинске експресије VEGF и CXCR-4 рецептора на мембрани**

Имунофлуоресценца је техника која се користи за маркирање појединих ћелијских делова флуоресцентним бојама. Техника се заснива на специфичном везивању антитела за антиген. Специфичност реакције антиген-антитело омогућава да се овом методом тачно и прецизно прати како присуство и локализација, тако и дистрибуција одређеног протеина у ћелији или ткиву. Антитело као индикаторни молекул је обележено флуоресцентном бојом са различитим таласним дужинама екситације и емисије, а детекција се врши флуоресцентним микроскопом (Higuchi и сар., 2001).

#### **3.3.1 Припрема препарата за бојење**

Узорци који су коришћени у овој студији за доказивање протеинске експресије су обрађени стандардном процедуром на Клиници за Патолошку анатомску дијагностику у Клиничком Центру Крагујевца. Након операције, узорци су током 24 часа фиксирани у 4%-тном неутралном, пуферизованом формалдехиду и калупљени у парафин. Резови дебљине 4  $\mu\text{m}$  су

монтирани на посебне високо адхерентне плочице SuperFrost® и сушени на температури од 56 °C у току 1 сата. Овако добијени исечци узорака су најпре подвргнути депарафинизацији, провлачењем кроз серију алкохола опадајућих концентрација. Предметне плочице са узорцима су најпре биле потопљене 2 x 5 минута у ксилолу; затим 2 x 5 минута у апсолутном алкохолу, затим 5 минута у 96% алкохолу, затим 5 минута у 70% алкохолу, затим 5 минута у 50% алкохолу, и на самом крају плочице су испирани у дестилованој води 5 минута. Затим је уследило „кување“ у микроталасној пећи на 560 W у цитратном пуферу. „Кување“ је обављено у два интервала у трајању од 5 минута и у једном интервалу у трајању од 8 минута након чега су плочице са ткивним узорцима испирани текућом водом у трајању од 5 минута. Затим је уследило екстензивно испирање препарата у дестилованој води и PBS-у. Испрани препарати су потопљени у ацетон 5 минута.

### 3.3.2 Имунофлуоресценца

На обрисане препарате је наливено 100 µl *Goat* серума и остављено да се инкубира 20 минута на собној температури. Након одливања вишка серума, нането је по 100 µl примарног антитела VEGF<sub>165b</sub> (концентрације 20 µg/ml у PBS-у, *R&D Systems*) или примарног антитела CXCR-4 (10 µg/ml, *Thermo Scientific*). Уследила је инкубација од 60 минута у влажној комори. Вишак антитела испрано је три пута PBS-ом. На испрана и обрисана предметна стакла наливено је секундарно антитело и инкубирано 45 минута у влажној комори у мраку. За доказивање протеинске експресије VEGF<sub>165b</sub> наливено је секундарно антитело Dnk pAb у Ms IgG PE (ab7003), разблажења 1:400 у PBS са 1% BSA. За доказивање протеинске експресије CXCR-4 коришћено је секундарно антитело *Goat Anti-Rabbit IgG FITC (ABCAM abb717)* разблажења 1:2000 у PBS са 1% BSA. Вишак секундарног антитела је испрано 3 пута по 5 минута у PBS-у. Затим су предметна стакла обрисана тако да су само исечци остали влажни. За визуализацију плаво обојених једара коришћена је DAPI боја (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) у разблажењу 1:1000. Предметна стакла су прекривена покровним љуспицама (крајеви покровне љуспице су залепљени). Препарати су остављани преко ноћи да се осуше и након тога посматрани на флуоресцентном микроскопу (Ti-Eclipse), на филтерима одређених таласних дужина и увеличању 600x.

#### 4. Испитивање експресије информационе РНК за $\beta$ -actin, VEGF-A, HIF-1, CXCL-12 и iNOS гене

Квантитативна ланчана реакција полимеразе у реалном времену (*Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction - qRT-PCR*) омогућава да се циљна ДНК секвенца симултано амплификује и квантификује. Нивои генске експресије су високо регулисани процеси у свим ћелијама. Број транскрипта неког гена, који се касније транслатира у специфичан протеин, директно зависи од стопе експресије или деградације информационе или „messenger“ РНК (*iRNA* или *mRNA*) у ћелији или ткиву. Да бисмо могли квантификовати генску експресију потребно је умножити генски транскрипт тј. специфичне информационе РНК. PCR је техника којом се умножавају ДНК молекули, док је за умножавање информационе РНК, потребно да се она прво преведе у комплементарну ДНК помоћу ензима реверзне транскриптазе. Процедура за qRT-PCR даље прати општи принцип PCR, главна разлика је то што се копије ДНК квантификују у реалном времену тј. након сваког појединачног циклуса. За квантификацију се често користи *Sybr Green*, флуоресцентна боја која интеркалира тј. везује се за дволанчану ДНК и како се број копија ДНК повећава, јачи је и сигнал, односно флуоресценца која се емитује. Апарат за qRT-PCR мери количину флуоресценце ове флуорофоре у реалном времену и на основу тих резултата, посебно дизајниран софтвер омогућава анализу, односно на овај начин прерачунавамо релативну генску експресију у различитим узорцима преко броја копија информационе РНК. qRT-PCR метода због начина сакупљања узорка и анализирања је једна од најефикаснијих и најпрецизнијих метода.

##### 4.1 Изолација рибонуклеинске киселине из ткива и ћелија

Принцип за изолацију РНК се заснива на фенол/хлороформ реакцији коју су први описали Chomczynski и Sacchi (1987). Сав рад се врши на леду, сем корака где је наглашено другачије. Узорак (ткиво карцинома и перитуморско ткиво) је пребачен на лед и ресуспендован у 1 ml TRIzol-a (1 ml TRIzol-a на 0.01 g ткива) у коме је хомогенизован пипетом и остављен у TRIzol -у на собној температури 5 минута.

За изолацију РНК из MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијских линија након третмана екстрактима биљака коришћена је следећа процедура: ћелије су прво засејане у флашкове T-25 cm<sup>2</sup> (10x10<sup>5</sup> ћелија по фласку) и инкубиране у инкубатору док нису достигле конфлуентност преко 90%. Када су достигле одговарајућу конфлуентност, ћелије су третиране са 5 ml метанолног екстракта биљака *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* у концентрацији од 10 и 100 µg/ml. Контролним ћелијама је замењен медијум. Ћелије су трипсинизирани и центрифугиране на 1200 rpm током 10 минута. Затим су избројане и ресуспендоване у TRIzol

реагенсу у концентрацији од  $10^6$  ћелија/1 ml TRIzol-а. Након овог корака процедура за изолацију РНК из ткива и ћелија је иста.

У све узорке је додато 200  $\mu$ l хлороформа, након енергичног мешања 15 секунди, узорци су остављени на собној температури 2-3 минута и центрифугирани 15 минута на 12000 rpm, на 4 °C. Центрифугирањем су се издвојиле три видљиве фазе унутар микротубе. Водена фаза која налази се на врху (фаза РНК) је пренета у нову микротубу, пазећи да се не помеша са осталим фазама. У издвојену водену фазу додато је 500  $\mu$ l изопропанола и инкубирано на собној температури 10 минута. Након тога, узорци су центрифугирани 10 минута на 12000 rpm на 4 °C. Супернатант је уклоњен, талог РНК је испран са 1 ml 80% етанола и микротуба је центрифугирана 5 минута на 7500 rpm на 4 °C. Супернатант је уклоњен, преостали етанол осушен за 2-3 минута и РНК талог ресуспендован у 20  $\mu$ l PCR воде и инкубиран на 55 °C у термоблоку 2-3 минута. Концентрација сваког узорка је измерена на биофотометру (*Eppendorf BioPhotometer Plus*). Однос апсорбанци 260 и 280 nm који је био између 1.8-2.0 узиман је као показатељ чисте РНК без присуства других компоненти (*pure RNA*). На основу добијене концентрације, РНК узорци су аликвотирани и чувани на -80 °C до извођења анализа.

### **1.2 Реверзна транскрипција (RT-PCR)**

Једноланчана РНК се преписује у комплементарну ДНК (енгл. *Complementar DNA* - cDNA) по принципу комплементарности помоћу ензима реверзне транскриптазе (енгл. *Reverse Transcriptase*, RT) (Bustin, 2000). Коришћен је *Qiagen Seniscript RT Mix* (Master Mix) који садржи 2  $\mu$ l 10x Buffer RT, 2  $\mu$ l dNTP (дезоксирибонуклеотид трифосфати, појединачне концентрације 5 mM), 2  $\mu$ l олиго-dT прајмера, 10  $\mu$ l воде (PCR чистоће), 1  $\mu$ l ензима реверзне транскриптазе (*Sensiscript Reverse Transcriptase*) и 2  $\mu$ l изоловане РНК, концентрације 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Узорци су постављени у апарат *MultiGene OptiMax Thermal* (*Labnet International Inc. North America*) који је програмиран у складу са упуствима произвођача. Добијени узорци комплементарне ДНК су чувани на -80 °C до извођења анализа.

### **1.3 Квантитативна ланчана реакција полимеразе (qRT-PCR)**

За анализу експересије гена коришћена је комплементарна ДНК као полазни молекул (Zhai и сар. 2005). *Master mix (Universal Kapa Sybr fast qPCR Master Mix 2x)* је комерцијално припремљен кит који је у себи садржи све потребне компоненте за реакцију, изузев пара прајмера, узорка комплементарна ДНК и боје (*Rox Low*) које се додају одвојено. Након

одмрзавања qPCR *Master mix*-а, компоненте су вортексоване и направљена је реакциона смеша која садржи све компоненте потребне за qPCR, осим комплементарне ДНК. Реакциона смеша је садржала следеће компоненте 10 µl qPCR Master Mix-а; 0,4 µl прајмера (*Forward primer*) концентрације 10 µM и 0,4 µl прајмера (*Reverse primer*) концентрације 10 µM и 0,4 µl *ROX Low*. Коришћени су прајмери за гене *β-actin*, *MMP-9*, *VEGF-A*, *HIF-1α*, *CXCL-12* и *iNOS*:

Прајмер	Секвенца прајмера ( <i>Forward</i> )	Секвенца прајмера ( <i>Reverse</i> )
<b><i>β-actin</i></b>	5'-AAGCAGGAGTATGACGAGTCCG-3'	5'-GCCTTCATACATCTCAAGTTGG-3'
<b><i>MMP-9</i></b>	5'-TGCCCGGACCAAGGATACAG-3'	5'-TCAGGGCGAGGACCATAGAG-3'
<b><i>VEGF-A</i></b>	5'-ACGGTCCCTCTTGGAAATTGG-3'	5'-CTAATCTTCCGGGCTCGGTG-3'
<b><i>HIF-1α</i></b>	5'-CCACCTCTGGACTTGCCTT-3'	5'-TTTTTCTTGTCTCGTTCGCGCC-3'
<b><i>CXCL-12</i></b>	5'-CCGGCTGAAGAACAACAACA-3'	5'-CCACGTCTTTGCCCTTTCAT-3'
<b><i>iNOS</i></b>	5'-GTTCTCAAGGCACAGGTCTC-3'	5'-GCAGGTCACCTATGTCACTTATC-3'

Реакциона смеша је прављена за сваки ген појединачно. У PCR плочу са *PCR Master Mix*-ом додато је 2 µl узорака комплементарне ДНК и на крају је додато онолико микролитара воде PCR чистоће (*Ambion® Nuclease-Free Water*), да укупна запремина у бунарићу PCR плоче буде 20 µl. Плоче су постављене у апарат *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systems*. Коришћен је софтвер *Applied Biosystems (7500/7500 Fast Real-Time PCR softver v 2.0)*. У складу са упутствима произвођача програм је био покренут. Сваки qPCR циклус почиње топлотним активационим кораком на 95 °C у трајању од 3 минута, након тога следи циклус који се понављао 40 пута и састоји се од три корака. Први корак представља денатурацију ДНК која се одвија 15 секунди на температури од 95 °C. Затим је следи хибридизација, односно везивање прајмера на ДНК калуп (енгл. *annealing*), и на крају полимеризација у трајању од 60 секунди на 60 °C (енгл. *extension*). Након завршеног циклуса амплификације, добијени резултати су анализирани софтвером *Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR*. Релативна квантификација експресије испитиваних гена је добијена у односу на експресију *β-actin*-а („*housekeeping gene*“) у истом узорку као контрола (Schmittgen и Livak, 2008).

За израчунавање релативне генске експресије из ткива коришћена је следећа формула:

$$2^{-\Delta C_T} = \Delta C_{T_1} - \Delta C_{T_2}$$

$\Delta C_{T_1}$  =  $C_T$  вредност испитиваног гена у узорку,

$\Delta C_{T_2}$  =  $C_T$  вредност *β-actin*-а („*housekeeping gene*“) у узорку.

За израчунавање релативне генске експресије у ћелијама коришћена је следећа формула:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \Delta C_{T1} - \Delta C_{T2}$$

$\Delta C_{T1}$  = разлика  $C_T$  вредности испитиваног гена у узорку и  $C_T$  вредности  $\beta$ -actin-a у узорку;

$\Delta C_{T2}$  = разлика  $C_T$  вредности испитиваног гена у контролним ћелијама и  $C_T$  вредности  $\beta$ -actin-a у контролним ћелијама

## 2 Ћелијске линије као модел системи – потенцијални видови терапије

Процес гајења ћелија у контролисаним условима назива се култивација ћелија и подразумева одржавање одређеног типа ћелија у *in vitro* условима. Гајење ћелија врши се у посебним стерилним посудама које садрже хранљиви медијум са неопходним факторима раста и са другим хемијским и физичким факторима који се оптимизирају у односу на врсту ћелија која се гаји. За раст и размножавање, ћелије захтевају одговарајућу температуру (37 °C), осмотски притисак, pH (7.4), O<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub> (5%). Пошто се ћелије гаје у *in vitro* условима неопходно је да се опонашају услови *in vivo* што најчешће варира у зависности од тога који се тип ћелије гаји.

### 5.1 Ћелијске линије као модел систем

За истраживање су коришћене ћелијске линије добијене из *American Type Culture Collection* – ATCC:

1. MRC-5 је имортализована адхерентна ћелијска линија изолована из здравих феталних фибробласта плућа. По морфологији ова ћелијска линија је вретенастог облика, одликује је веома брз раст.
2. HUVEC је примарна ендотелна ћелијска линија изолована из ендотела хумане умбиликалне вене. Користи се као лабораторијски модел за проучавање функције и патологије ендотелних ћелија (нпр ангиогенеза).
3. hAoSm је примарна глатко-мишићна ћелијска линија изолована из мускулатуре хумане аорте. Представља добар модел систем за проучавање кардиоваскуларних функција, посебно оне везане за механизме хиперплазије и хипертрофије интима глатких мишићних ћелија.
4. MDA-MB-231 је имортализована адхерентна ћелијска линија која је изолована из хуманог тумора дојке. По морфологији ове ћелије су сличне фибробластима коже, вретенасте су и врло инвазивне. Одликује их брз и прогресиван раст. Троструко су негативне, што значи

да не експримирају рецепторе за естроген, прогестерон, нити рецепторе за HER-2. Ове ћелијске линије представљају метастатске ћелије карцинома дојке, изоловане из плеуре.

5. MCF-7 је имортализована адхерентна ћелијска линија која је изолована из хуманог тумора дојке (инвазивни дуктални карцином). Ова ћелија представља метастатски депозит који је изолован из плеуре плућа. Карактерише је присуство рецептора за естроген, прогестерон и рецептор за хумани епидермални фактор раста, HER-2.
6. SW-480 је имортализована, адхерентна ћелијска линија, колоректалног аденокарцинома. Има експрипирани ген за епидермални фактор раста и мутацију у кодону 12 за *ras* протоонкоген;
7. HCT-116 је имортализована, адхерентна ћелијска линија, колоректалног карцинома. Ове ћелије имају епителну морфологију, експримиране гене за трансформишући фактор раста  $\beta 1$  и  $\beta 2$  и мутацију у кодону 13 за *ras* протоонкоген;

(1) **Одлеђивање ћелија:** Криотубе за залеђеним ћелијама се чувају у контејнеру са течним азотом на  $-196^{\circ}\text{C}$ . За потребе експеримената одлеђена је суспензија ћелија из криотубе и ресуспендована у 5 ml медијума. Суспензија ћелија је центрифугирана 10 минута на 1200 rpm. После центрифугирања медијум је аспириран, талог ћелија је ресуспендован у 5 ml медијума и ћелије су засејане у флак Т-25  $\text{cm}^2$ . Наредног дана је замењен медијум. (2) **Трипсинизација:** Процес трипсинизације подразумева: одстрањивање медијума из флакса, испирање ћелија са 1 ml 0.25% трипсина, додавање 1 ml 0.25% трипсина на флак Т-25  $\text{cm}^2$  или 3 ml 0.25% на флак Т-75  $\text{cm}^2$ . Потребно је сачекати неколико минута да се ћелије одлепе и диспергују. Процес трипсинизације се прекида додатком медијума за гајење чиме се ћелије разређују а трипсин се неутралише. (3) **Пасажирање ћелија:** Након засејавања ћелије се лепе за површину суда у коме се гаје, почињу да расту и деле се. Својим растом испуњавају слободну површину и црпе хранљиве материје из медијума. Када испуне површину суда у коме расту контакт између ћелија успорава њихов раст и долази до умирања и накупљања мртвих ћелија. Пасажирање представља процес пребацивања мањег броја ћелија у други флак са новим хранљивим медијумом. Након трипсинизације ћелије се ресуспендују у 5 ml медијума и пребаце у нови флак Т-25  $\text{cm}^2$  са додатком новог хранљивог медијума до 12 ml у флак Т-75  $\text{cm}^2$ . Овако третиране ћелије се могу дуже времена гајити у лабораторијским условима. (4) **Одређивање броја вијабилних ћелија:** За потребе експеримента користе се само вијабилне ћелије. Број ћелија се одређује тестом са трипан плавим. Трипан плаво је боја која улази у цитоплазму ћелија са оштећеном мембраном и отуда се мртве ћелије виде под микроскопом као плаво обојене, а живе ћелије остају необојене. Ћелијска суспензија је мешана са бојом 1:1 (по 10  $\mu\text{l}$ ) и налива се у коморицу за бројање ћелија (хемцитометар). Ћелије су

бројане у 2 велика дијагонална квадрата, површине  $0.0003 \text{ mm}^2$  на хемоцитометру под светлостним инвертним микроскопом. Средње вредности броја из два квадрата коришћене су у прерачуну за одређивање броја ћелија у милилитру суспензије, узимајући у обзир разблажење и димензије коморе. Број ћелија по милилитру = средња вредност ћелија из оба квадрата  $\times$  разблажење  $\times 10^4$  (корекциони фактор – дубина коморе и запремина у 1 ml).

## 2.2 Електропорација и електрохемиотерапија

За електропорацију и електрохемиотерапију ћелија коришћен је апарат *Electroporation System, BTX-Harvard Apparatus, Generator ECM 399*. Апарат се састоји од ECM 399 Генератор (45-0050), РЕР (45-0212) и кивета са 1, 2 и 4 mm (растојање између електрода). У раду су коришћене кивете које су имале растојање између електрода 4 mm.

За електропермеабилитацију адхерентних ћелија је коришћен електропермеабилитациони есеј: ћелије су подигнуте трипсин-EDTA, ресуспендоване у DMEM, *SmGM™-2* или *EGM™-Plus Growth* медијумима у зависности од врсте ћелија. Ћелије су затим центрифугиране 5 min на 1000 rpm. Супернатант је одливен и ћелије концентрације  $1 \times 10^6$  ћелија/ml су ресуспендоване електропермеабилитационом пуферу, пребачене у кивету за електропермеабилитацију и стављене на апарат за електропорацију.

Електропермеабилитациони пуфер је садржавао 250 mM сахарозе, 10 mM фосфатни пуфер и 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4 (Rols и Teissie, 1989). Електропермеабилитација је изазивана следећим волтажама 50, 100, 150 175, 200, 220 и 270 V или изражене као јачина електричног поља 125, 250, 375, 437.5, 500, 550, 675  $\text{Vcm}^{-1}$ . За електрохемиотерапију коришћен је исти поступак, са том разликом што је у електропорациони пуфер додата одговарајућа концентрација *Paclitaxel-a* (0.01, 0.1, 1, 5, 10, 25 и 50  $\mu\text{M}$ ). Коришћени напон за електрохемиотерапију је износио 150 V (или 375  $\text{Vcm}^{-1}$ ).

### 2.2.1 Праћење ћелијске вијабилности *xCELLigence* технологијом (*Real Time Cell Analysis-RTCA*)

За праћење цитотоксичних ефеката електропорације на ћелијским линијама коришћен је *xCELLigence* систем (*ACEA Biosciences*). Коришћење овакве технологије омогућава праћење ефеката неког тремана на адхерентним ћелијским линијама у сваком тренутку, *real time*. *xCELLigence* систем континуирано мери електричну импедансу која је комплементарна



променама на ћелијама након примене различитих напона. Импеданса се мери помоћу микроелектроде која је интегрисана у дну сваког бунарића Е-плоче 16. Импедансе се приказују као ћелијски индекс (*Cell Index* - CI) и обезбеђују квантитативне информације о биолошком статусу ћелија, укључујући број ћелија, вијабилност и морфологију. Ћелијски индекс, CI се користи за мерење релативних промена електричне импедансе и презентује статус ћелија у датом тренутку. CI је релативна и бездимензиона вредност, јер представља промену импедансе у односу на контролне вредности (медијум без ћелија). CI показује промене у броју вијабилних ћелија. Када постоје ћелије присутне у медијуму, тј. нису залепљене за дно бунарића, нема сигнала на електродама, тада су вредности CI око нула, односно смањен је број вијабилних ћелија. Ако има више ћелија залепљених за дно бунарића, вредности CI су веће, односно број вијабилних ћелија је већи. Када се појаве промене у ћелијској адheziji, морфологији и вијабилности, CI се мења.

Израчунавање CI вредности се врши према једначини:

$$CI = (Z_i - Z_0)/15$$

где  $Z_i$  представља импедансу у датом тренутку током експеримента, а  $Z_0$  је импеданса на почетку експеримента (медијум без ћелија).

Праћење вијабилности ћелија у реалном времену је у корелацији са МТТ есејом, где се читавањем апсорбанци прерачунава број живих ћелија. Праћење промена ћелијске вијабилности у реалном времену обезбеђује неопходну временску информацију када се једињење од интереса „лек“ користи за индукцију цитотоксичних ефекта. Конкретно, *xCELLigence* систем је идеалан за указивање временски оптималне тачке када цитотоксична једињења остварују свој максимални ефекат (<http://www.aceabio.com/wp-content/uploads/Compound-Mediated-Cytotoxicity-Using-xCELLigence-to-Optimize-Endpoint-Viability-and-Cytotoxicity-Assays.pdf>).

Након третмана електропорацијом и електрохемиотерапијом MRC-5, hAoSm, HUVEC, MDA-MB-231, MCF-7, SW-480 и HCT-116 ћелије су засејаване у Е-плоче са 16 бунарића (концентрација ћелија је била  $10^4$  ћелија по бунарићу). Уследило је континуирано праћење промена на ћелијама у одређеном временском интервалу (*real-time*) на *xCELLigence* апарату. Нетретиране ћелије су представљале контролну групу ( $10^4$ ). Посебно су истакнути цитотоксични ефекти електропорације ћелија након 6, 24 и 72 сата од третмана, јер су то типични временски оквири за овакву врсту истраживања. Резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  стандардна грешка за најмање четири независна експеримента.

За израчунавање вијабилности ћелија користили смо формулу:

$$\text{број вијабилних ћелија} = \frac{\text{ћелијски индекс третираних ћелија}}{\text{ћелијски индекс нетретираних ћелија}}$$

Број вијабилних ћелија представља ћелијски индекс ћелија третираних одређеним волтажама у односу на нетретиране ћелије (концентрација ћелија је  $10^4$ ).  $IC_{50}$  вредности (волтажа која убија 50% ћелија) прерачунате су из дозно зависних крива добијених у компјутерском програму *CalcuSyn*.

### **2.2.2 Акридин оранж/етидијум бромид микроскопска метода**

За одређивање типа ћелијске смрти коришћена је акридин оранж/етидијум бромид (АО/ЕВ) микроскопска метода (Baskić и сар., 2006). Акридин оранж је боја која улази у живе и мртве ћелије емитујући зелену флуоресценцу када се веже за двоструке ланце нуклеинских киселина (ДНК) или црвену флуоресценцу ако се веже за једноланчану нуклеинску киселину (ДНК или РНК). Етидијум бромид улази само у мртве ћелије и емитује црвену флуоресценцу везивањем за ДНК. Разликују се четири типа ћелија у зависности од флуоресцентне боје и морфолошког аспекта (кондензације хроматина у обојеним нуклеусима). (1) Живе ћелије су једнолично зелено обојене. (2) Ћелије у раној апоптози (још увек имају неразграђену нуклеусну мембрану, али је започето цепање ДНК) имају зелене нуклеусе, али долази до кондензације и фрагментације хроматина, па се на микроскопу уочавају зелени фрагменти. (3) Ћелије у касној апоптози имају наранџасто или црвено једро са кондензованим или фрагментисаним хроматином. (4) Некротске ћелије су кондензоване и униформно црвене боје.

Након третмана ћелије су засејаване у плоче са 96 бунарића. Након истека периода инкубације ћелија са третманима, у бунариће са третираним и контролним ћелијама додавана је мешавина раствора (10  $\mu$ l АО и 10  $\mu$ l ЕВ у дестилованој води). АО и ЕВ су растварани у дестилованој води, 100  $\mu$ g у 1 ml дестиловане воде. Одмах након додавања АО/ЕВ ћелије су посматране и бројане под флуоресцентним микроскопом (*Ti-Eclipse, Nikon*), на увећању 400x. Бројано је најмање 300 ћелија по бунарићу. Као резултат се добија проценат живих ћелија, ћелија у раној и касној апоптози, као и проценат некротских ћелија.

### **2.3 Генска експресија параметара инвазивности након третмана биоактивним супстанцама**

Биљне врсте које су испитиване приликом овог истраживања су *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa*. Узорковање је вршено по сувом и топлом времену. Од одговарајућих примерака узорковани су листови а сакупљен биљни материјал је транспортован до Лабораторије за физиологију биљака. Растварач коришћен за екстракцију је метанол. Препарација биљног екстракта је добијена према стандардној процедури, која се користи у Лабораторији за

физиологију биљака, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу (Grbović и сар., 2013). Добијени екстракти су чувани на +4 °C на тамном месту, у фрижидеру до употребе.

Метанолни екстракти биљака *R. pseudoacacia* и *A. fruticosa*, коришћени су за третирање ћелијских линија у различитим концентрацијама. Најпре је направљен почетни раствор концентрације 1000 µg/ml, од ког су касније прављене остале концентрације коришћене у третману (10 и 100 µg/ml), а време трајања третмана је 24 сата. Испитивана је експресија иРНК за *β-actin*, *MMP-9*, *VEGF-A*, *HIF-1α*, *CXCL-12* и *iNOS* гене, методом qRT-PCR, као што је описано у поглављу 4.3.

### 3 Статистичка обрада резултата

Сви експерименти за доказивање генске експресије рађени су у дупликату, а добијени резултати представљају средњу вредност два независна експеримента ± стандардна грешка. Сви остали експерименти рађени су у трипликату, а добијени резултати представљају средњу вредност три независна експеримента ± стандардна грешка. Коришћени су *Student's T* тест и *Independent* тест и ANOVA, при чему је  $p < 0.05$  сматрана статистички значајном разликом. За расподелу која није била нормална коришћени су  $\chi^2$ - тест, Mann–Whitney U тест, Kruskal–Wallis H тест. Резултати су обрађени у SPSS (Chicago, IL) програму за статистичку обраду резултата (*SPSS for Windows*, ver. 17, 2008). IC<sub>50</sub> вредности прерачунате су из дозно зависних крива добијених у компјутерском програму *CalcuSyn*.

#### 4 *Data mining*

Наша студија је представљала интердисциплинарни приступ у којој су сарађивали експерти различитих специјалности (лекари, молекуларни биолози, машински инжењери). Предикциони модел је конструисан на основу базе података пацијенткиња са карциномом дојке. База је сачињена на основу података имунохистохемијских анализа оперативних препарата, тако да студија представља комбинацију клиничког и лабораторијског истраживања. На бази литературних података изабрали смо параметре за које се сматра да имају највећи значај у дијагностици и лечењу ових пацијенткиња и креиран је *data mining* модел. База података је садржавала бројне параметре: анамнестичке, клиничке, *imaging* - визуализационе, хистопатолошке, генетске, биолошке, молекуларне. Креирали смо верну предикцију тока болести у смислу појаве рецидива и метастаза. Разматрали смо две врсте проблема, рецидив болести и петогодишње преживљавање и појава метастаза. На тај начин смо добили две групе пацијената које имају веома велики значај са клиничког аспекта: група пацијената код којих је болест потцењена и који не добијају оптималан третман, те су у великом ризику од настанка рецидива и метастаза, и другу групу пацијената, која на основу стандардних протокола лечења добија претерано агресиван, а непотребан третман са свим својим нежељеним дејствима.

У овој студији коришћене су две базе података. Прва се састојала од 146 пацијенткиња са карциномом дојке, праћене у периоду 2005-2009. године и која је садржала податке који се прикупљају рутинским дијагностичким процедурама приликом лечења оваквих пацијената. Друга се састојала од 50 пацијенткиња са карциномом дојке (период праћења 2011-2015) код којих су улазни (*input*) параметри, поред стандардних, напред наведених, чинили и биомаркери неоангиогенезе, инвазије и метастазирања који нису део стандардне дијагностичке палете. Излазне (*output*) информације у првом истраживању су били 5-огодишњи период преживљавања и метастазе односно рецидив болести, док смо у другој разматрали могућност предикције појаве метастаза, јер 5-огодишњи период након операције још увек није истекао за већину лечених пацијенткиња.

За другу базу података осим стандардних процедура које се спроводе рутински приликом лечења оваквих пацијената спровели смо и додатне анализе на узорцима туморског и перитуморског ткива и то: протеинску експресију MMP-9 и генску експресију *VEGF-A*, *HIF-1 $\alpha$* , *CXCL-12* и *iNOS*. Ове процедуре нису део рутинског испитивања, и ни на који начин нису утицале на ток и исход лечења. Стање пацијената је праћено током рутинских контролних прегледа током периода праћења и све промене у здравственом стању пацијената смо бележили.

Преоперативни и постоперативни подаци сваког пацијента су снимани, анонимизирани и складиштени у базу података која је развијена специјално за ову намену. Никакви лични подаци пацијената нису представљани, нити је испитивање утицало на избор одговарајуће терапије у складу са добром клиничком праксом. База података се састојала од информација као што су: анамнеза, клинички налази, патохистолошки и биолошки параметри (патохистолошки налаз, старост пацијента, менструални статус, хистолошки тип тумора, хистолошки градус, нуклеарни градус, митотски индекс, васкуларна инвазија, перинеурална инвазија, лимфатична инвазија, HER-2 статус, естрогенски рецептори, прогестеронски рецептори, стадијум болести, захваћени квадрант дојке, инфилтрација лимфних чворова, итд.) Разматрани су бројни фактори ризика, генетски, хормонски, начин исхране, навике.

### 7.1 Проблем: предвиђање појаве метастазе

Циљ ове студије је примена *data mining* анализе на бази података која садржи клиничке, анализе на узорцима туморског и перитуморског ткива (протеинске и генске експресије) и хистолошке профиле пацијента са информацијама о карциному дојке у циљу предвиђања појаве метастазе. Резултати укључују трениране моделе за одлучивање и селектоване атрибуте који доприносе дефинисању објективног модела за стратификацију пацијената. За потребе нашег експеримента коришћени су следећи софтвери:

(а) *Artificial neural networks* (ANNs) је добро познат алгоритам, биолошки инспирисан, високо софистициран и може да моделира изузетно комплексне нелинеарне функције. То је техника која је доказала своју ефикасност у класификацији и издвајању одређених скривених веза у врло сложеним мрежним структурама (Motaleb и сар., 2014).

(б) *Bayesian networks* (BNs) је алгоритам карактеристичан по пробабилистичком приступу у решавању задатака и наглашава несигурност појаве одређених догађаја. Основ BNs чини рачун вероватноће (Wang и сар., 2015).

*Data mining* методологија се састојала од следећих корака:

1. Дефинисање *data mining* проблема - дефинисање циљева анализе;
2. Припрема података за анализу као фаза претпроцесирања подразумева решавање; проблема недостајућих вредности, различитих типова атрибута (нумерички, описни);
3. Селекција атрибута или селекција инстанци;
4. Тренирање предикционих модела на основу селектованих података;

5. Валидирање модела - у овој студији смо користи *крос-валидацију* (унакрсну валидацију) методом изостављања једног примера (*leave one out cross-validation*) и резултате поредили са другим моделима.

Као подршку модела користили смо тачност модела, сензитивност, специфичност за површину области испод ROC криве (*Receiver Operating Characteristic Curve*) познатија као *Area Under the Curve* (AUC). Тачност модела представља меру тачно класификованих инстанци, сензитивност изражава пропорцију позитивних исхода, специфичност је мера пропорције негативних исхода, а AUC параметар је еквивалентан вероватноћи да ће класификатор произвољно изабрану позитивну инстанцу рангирати више него произвољно изабрану негативну инстанцу. Графички представља зависност сензитивности (на ординати) од специфичности одузете од 1 на апсиси. Идеалан класификатор за овај параметар има вредност 1, а оцена класификатора према овом параметру се може представити следећом табелом (**Табела 2**):

**Табела 2. Оцена класификатора**

---

<0.5	Класификатор није користан
0.5-0.6	Лош
0.6-0.7	Слаб
0.7-0.8	Фер
0.8-0.9	Добар
0.9-1	Одличан

---

За обучавање модела коришћени су репрезентативни алгоритми за надгледано учење:

- Наивни Вајесов класификатор (NB)
- Логистичка регресија (*Logistic Regression* - LR)
- К- најближих суседа (*K-nearest neighbours* - K-NN)
- Дрво одлучивања (*Decision Tree* – DT)
- Случајна сума (*Random forest* - RF)
- Метод потпорних вектора (*Support Vector Machine* - SVM)
- Вештачка неуронска мрежа (*Artificial Neural Network* – ANN)

Коришћење алгоритама за филтрирање је описано у **Прилогу 2**.

## IV РЕЗУЛТАТИ

### 1. Молекуларни параметри неоангиогенезе код пацијената са карциномом дојке

Циљ коме тежи модерна онкологија је индивидуализација терапије, што је основна премиса ове дисертације. У том циљу праћени су молекуларни параметри неоангиогенезе код пацијената са карциномом дојке, као један од механизма који је круцијалан у процесу појаве и развоја тумора. У студију су укључене пацијенткиње чије су клиничко-патолошке карактеристике описане у Табели 3.

Табела 3. Клиничко-патолошке карактеристике пацијенткиња са карциномом дојке

Карактеристике	Број пацијената-п, (%)
<b>Укупан број узорака</b>	100
• Перитуморско ткиво (ПТ)	50 (50%)
• Карциномско ткиво (КТ)	50 (50%)
<b>Ресекције маргина</b>	
• R0 Нема резидуалног тумора	48 (96%)
• R1 Микроскопски резидуалних тумор	2 (4%)
• R2 Макроскопски резидуалних тумор	0
<b>Хистолошки тип тумора</b>	
• <i>Invasive Ductal Carcinoma</i>	43 (86%)
• <i>Invasive Lobular Carcinoma</i>	7 (14%)
<b>Хистолошки градус</b>	
• G1 Добра диференцијација ( <i>low grade</i> )	6 (12%)
• G2 Умерена диференцијација ( <i>intermediate grade</i> )	28 (56%)
• G3 Слаба диференцијација ( <i>high grade</i> )	16 (32%)
• G4 Неиздиференциране ( <i>high grade</i> )	0
<b>Величина тумора</b>	
• T1 (тумор ≤ 2 cm)	21 (42%)
• T2 (тумор величине између 2 и 5 cm)	27 (54%)
• T3 (тумор > 5 cm)	2 (4%)
• T4 (тумор било које величине са инфилтрацијом зида грудног коша)	0
<b>Захваћеност лимфних нодуса (N)</b>	
• N0 нема регионалних лимфоидалних метастаза	3 (6%)

• N1 метастазе присутне у ипсилатералним аксиларним лимфним нодусима	24 (48%)
• N2 метастазе присутне у ипсилатералним аксиларним нодусима фиксирани један за други или друге стурктуре	23 (46%)
<b>Присуство метастаза (M)</b>	
• M0 Нема удаљених метастаза	18 (36%)
• M1 Присутне удаљене метастазе	26 (52%)
• Mx Присуство метастаза непознатно	6 (12%)
<b>Статус рецептора</b>	
• ER+ (Присутни)	30 (60%)
• ER- (Нису присутни)	20 (40%)
• PR+ (Присутни)	23 (46%)
• PR- (Нису присутни)	27 (54%)
• HER+ (Присутни)	24 (48%)
• HER- (Нису присутни)	26 (52%)
<b>Године</b>	
• < 40	2 (4%)
• > 40	48 (96%)

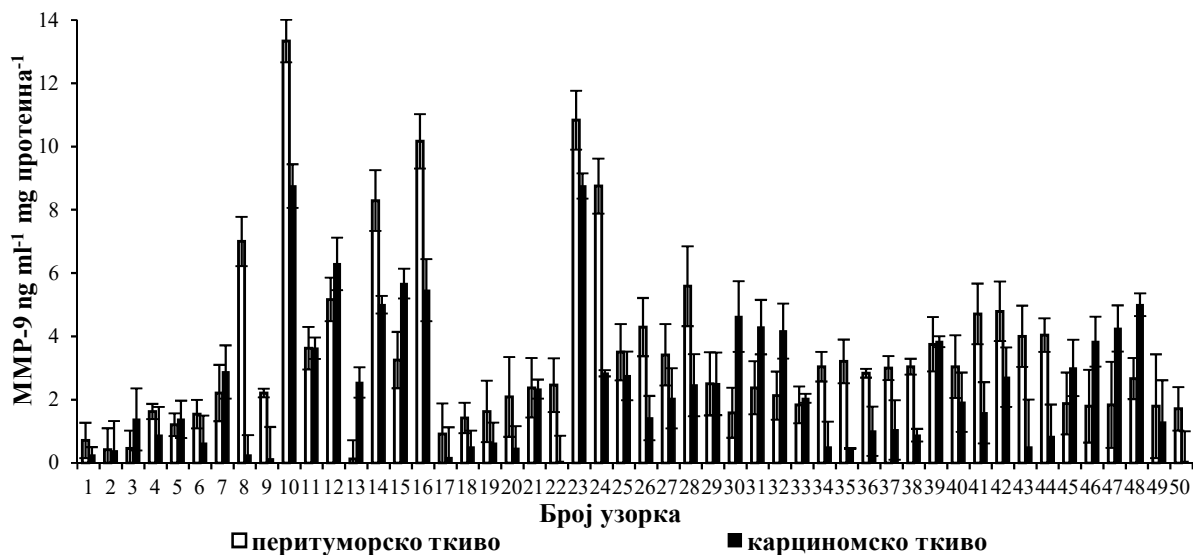
### **1.1 Концентрација MMP-9 у перитуморском и карциномском ткиву пацијената са карциномом дојке**

Ензими као што су металопротеиназе, а нарочито металопротеиназа-9 играју кључну улогу како у бројним физиолошким, тако и у патолошким процесима као што су неоангиогенеза, раст тумора и метастазирање. У овом делу су приказане концентрације укупне металопротеиназе-9 у перитуморском (ПТ) и карциномском ткиву (КТ) код пацијената са карциномом дојке.

На *Графикону 1* су представљене вредности концентрације укупне MMP-9 у ПТ и КТ индивидуално за сваког пацијента. Код највећег броја узорака (72%) микроокружење око туморског ткива продукује веће концентрације MMP-9 у односу на туморско ткиво.



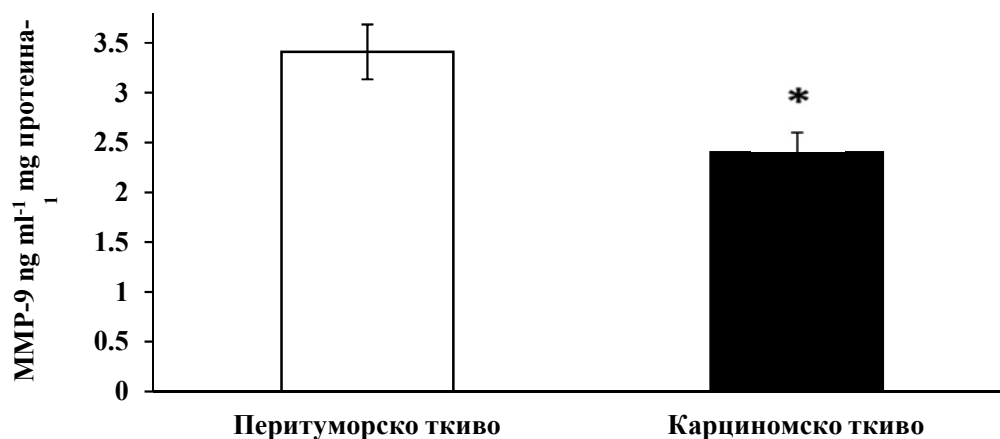
**Графикон 1.** Концентрација укупне матрикс металопротеиназе-9 у перитуморском и туморском ткиву за све испитиване пацијенте са карциномом дојке.



Подаци су изражени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка (SE) за четири независна мерења за сваки узорак;

На следећем графикону (*Графикон 2*) је представљена концентрација укупне матрикс металопротеиназе-9 у ПТ и КТ за све пацијенткиње ( $n=50$ ). Резултати су показали да је концентрација MMP-9 статистички значајно виша у ПТ код пацијенткиња са карциномом дојке.

**Графикон 2.** Средња вредност концентрације матрикс металопротеиназе-9 у перитуморском и туморском ткиву код испитиваних пацијентата са карциномом дојке.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за укупан број узорака ( $n=50$ );  $*p < 0.05$  статистички значајна разлика између ПТ и КТ;

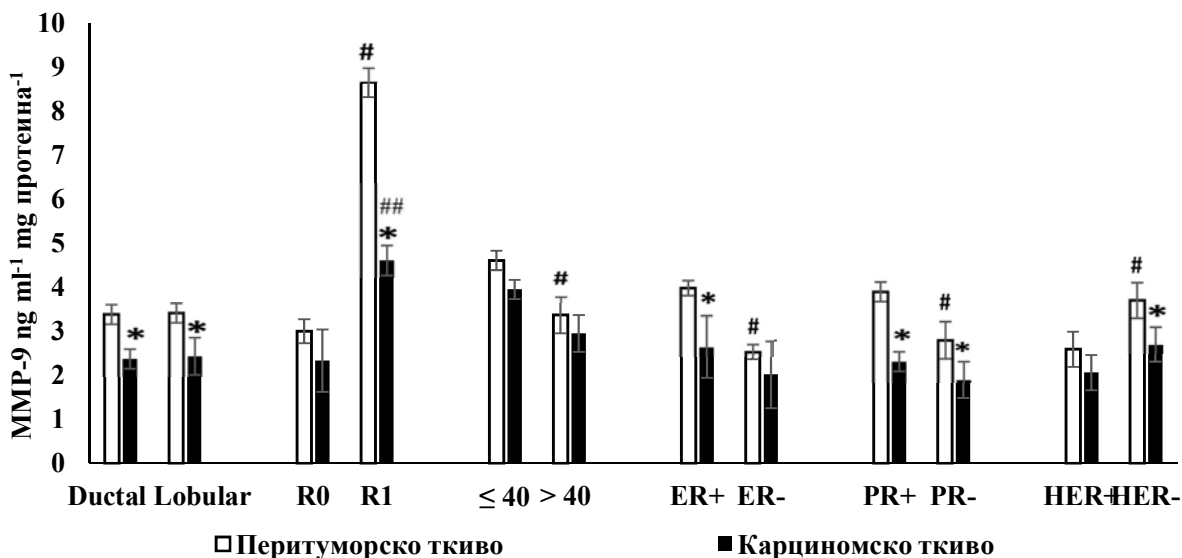
На *Графикону 3* је приказана концентрација MMP-9 у односу на клиничко-патолошке карактеристике пацијената (тип карцинома, чистоћа маргина, старост пацијенткиња и статус рецептора). Пацијенткиње које су укључене у истраживање имале су дијагнозу *Invasive Ductal Carcinoma* и *Invasive Lobular Carcinoma*. Перитуморско ткиво код оба типа карцинома продукује статистички значајно више концентрације MMP-9 у односу на туморско ткиво, док разлика у продукцији MMP-9 између ова два типа карцинома није утврђена.

Испитивани узорци су у највећем проценту имали чисте маргине на макроскопском и микроскопском прегледу, тј. R0 маргине, без резидуалних карциномских ћелија (96%). У току хируршког захвата код два пацијента је урађен R1 тип ресекције, што подразумева микроскопски верификовано присуство туморских ћелија. Након молекуларних анализа, квантификоване су више концентрације укупне MMP-9 у ПТ у односу на КТ код обе испитиване групе (R0 и R1). Перитуморско и туморско ткиво R1 групе продукује статистички значајно више концентрације укупне MMP-9 у поређењу са узорцима који су имали R0 маргине.

Анализирана је концентрација MMP-9 у односу на старост пацијената са дијагнозом карцинома дојке. Приказани резултати сугеришу већу продукцију MMP-9 у ПТ у односу на КТ код обе групе пацијената. Треба поменути да микроокружење око тумора млађих пацијената продукује статистички значајно више концентрације MMP-9, у односу на исто ткиво старијих пацијената. Млађи пацијенти су доминантни у продукцији MMP-9 и у КТ, али разлике нису статистички значајне.

С обзиром да естроген, прогестерон, као и хумани епидермални фактор раста играју важну улогу у терапији карцинома дојке, анализирана је концентрација укупне MMP-9 у односу на експресију ових рецептора у испитиваним ткивима. Показано је да су нивои укупне MMP-9 виши у ПТ у односу на КТ без обзира на присуство или одсуство поменутих рецептора. Перитуморско ткиво код пацијената са експримираним стероидним рецепторима (ER+, PR+) као и група пацијената са неекспримираним рецепторима за хумани епидермални фактор, HER- продукује статистички значајно већу количину MMP-9 у односу на групе ER-, PR- и HER+.

**Графикон 3.** Концентрација укупне матрикс металопротеиназе-9 у перитуморском и карциномском ткиву код карцинома дојке у односу на тип карцинома, чистоћу маргина, старост пацијента и статус хормонских рецептора.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за број узорака испитиваног параметра (n); \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика између ПТ и КТ; # $p < 0.05$  статистички значајна разлика између перитуморских ткива; ## $p < 0.05$  статистички значајна разлика између туморских ткива; (дијагноза-*Invasive Ductal Carcinoma*, *Invasive Lobular Carcinoma*; тип ресекције (R0 и R1); старост пацијента ( $\leq 40$  и  $\geq 40$ ); естрогенски рецептори (ER+ и ER-); прогестеронски рецептори (PR+ и PR-) рецептори за хумани епидермални фактор (HER+ и HER).

За одређивање стадијума болести постоји више система, али један од најчешће коришћених је TNM класификација. На овај начин се тачно може описати величина тумора (T), статус лимфних нодуса (N) као и метастатски потенцијал тумора (M).

На **Графикону 4** је приказана дистрибуција MMP-9 у односу на TNM класификацију и хистолошки градус. Анализа концентрације MMP-9 у односу на величину тумора је показала више концентрације овог параметра у ПТ у односу на КТ. ПТ и КТ карцинома највећих димензија (T3) продукује најнижу концентрацију MMP-9 у поређењу са истим ткивима тумора мањих димензија (T1 и T2). Постоји велика разлика у продукцији MMP-9 између перитуморског и туморског ткива, што је карцином већи и агресивнији, та разлика је већа. Може се уочити да је код пацијената са карциномом већих од 5 cm (T3) однос у продукцији MMP-9 између туморског и перитуморског ткива 1: 9.41.

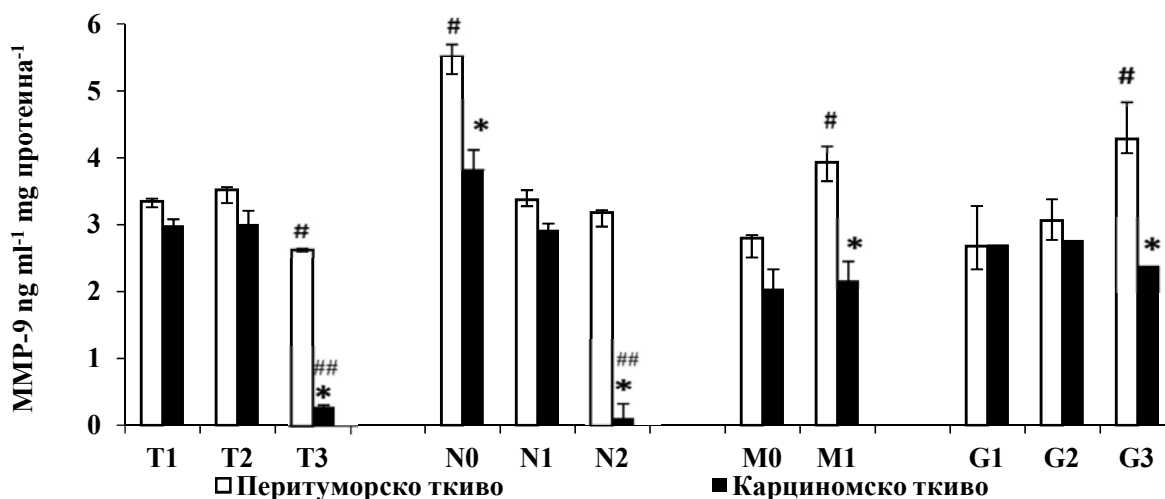
Налаз у лимфним нодусима пазушне јаме је изузетно важан прогностички параметар. Са повећањем броја лимфних нодуса захваћених метастазама, петогодишње време преживљавања

без обзира на величину тумора се знатно смањује. У односу на статус лимфних нодуса, резултати су показали да је концентрација ММР-9 значајно виша у ПТ у односу на КТ. ПТ око тумора са “чистим” лимфним нодусима (N0) продукује више концентрације ММР-9 у поређењу са N1 и N2 групама (Графикон 4). Тенденција опадања концентрације ММР-9 од групе са чистим лимфним нодусима N0, до N2 групе се може приметити и у туморском ткиву. Тако је у групи N2 концентрација овог параметра најнижа. Може се приметити да је значајно велика разлика у концентрацији ММР-9 присутна код N2 групе пацијената, код које перитуморско ткиво 26.5 пута више продукује ММР-9 од туморског ткива.

Удаљене метастазе настају миграцијом туморских ћелија и њиховим заустављањем у различитим органима и ткивима: плућа, јетра, кости, мозак итд. Метастазе се могу појавити и пре него што примарни тумор достигне одговарајућу величину да би се клинички могао открити. Управо због значаја раног дијагностиковања, разматрана је продукција ММР-9 у односу на метастатски потенцијал тумора. Резултати су показали да се овај ензим више продукује у ПТ у односу на КТ у M0 и M1 групи (*Графикон 4*). ПТ око карцинома са удаљеним метастазама (M1) продукује статистички значајно више концентрације ММР-9 у поређењу са M0 групом. Без обзира на присуство или одсуство метастатских ћелија, туморско ткиво обе групе продукује ММР-9 и не постоји статистички значајна разлика између њих. Постоји разлика у продукцији ММР-9 између туморског и перитуморског ткива M1 групе. Тако перитуморско ткиво продукује 1.8 пута више ММР-9 од КТ.

Хистолошки градус је важан прогностички индикатор који није укомпонован у TNM класификацију, али се користи заједно са њом за предвиђање тока болести. Представља микроскопски опис туморских ћелија. Индикатор је брзине раста и ширења тумора. Ако број иза ознаке G расте, то значи да карцином постаје агресивнији. Стога се градусом G1 означавају најмање агресивни тумори, док су са градусом 3 (G3) најагресивнији. Дистрибуција ММР-9 у односу на хистолошки градус је приказана на *Графикону 4*. Резултати су показали да у групи G1 нема разлике у концентрацији ММР-9 између ПТ и КТ. Количина ММР-9 пропорционално расте у ПТ ткиву са повећањем хистолошког градуса у односу на КТ. ПТ око карцинома са високим градусом (G3) продукује статистички значајно више концентрације ММР-9 у поређењу са G1 и G2 групама. ПТ око карцинома са високим градусом (G3) продукује 1.78 пута више ММР-9 од туморског ткива исте групе. Показано је да карциномско ткиво продукује приближно исте концентрације овог ензима код све три групе хистолошког градуса.

**Графикон 4.** Концентрација укупне матрикс металопротеиназе-9 у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на TNM класификацију.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за број узорака испитиваног параметра (n); \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика између ПТ и КТ; # $p < 0.05$  статистички значајна разлика између перитуморских ткива; ## $p < 0.05$  статистички значајна разлика између туморских ткива; (Т-величина тумора, N-инфилтрираност лимфних нодуса, М-метастазе) и хистолошки градус (G1-добро диференциран; G2- умерено диференциран; G3- слабо диференциран).

## 1.2 Испитивање релативне експресије информационе РНК гена укључених у неоангиогенетске процесе

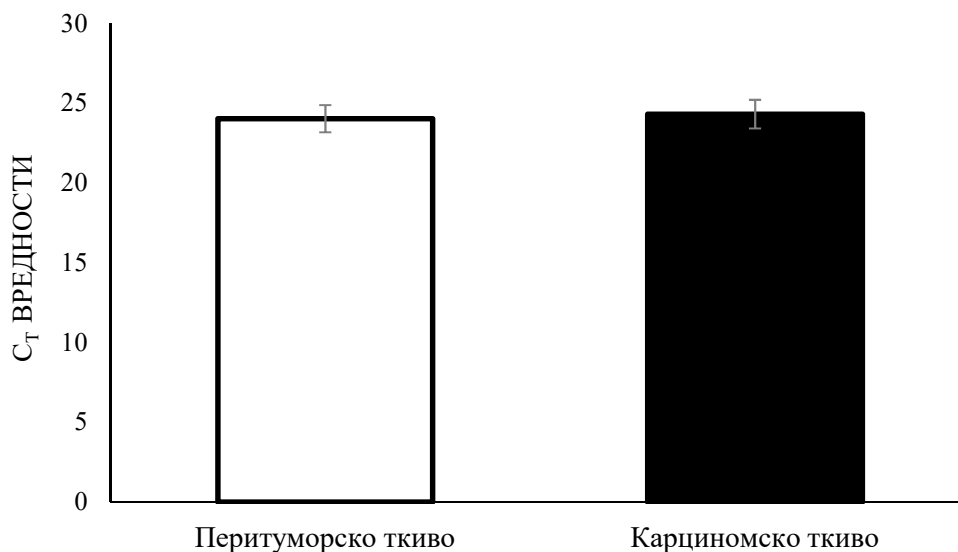
Неоангиогенеза је сложен биолошки процес који обухвата неколико стадијума: вазодилатацију и повећање пропустљивости зида крвног суда, дестабилизацију крвног суда и разградњу матрикса, пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија, као и формирање и стабилизацију новог крвног суда. У испитиваним узорцима квантификована је експресија информационе РНК за гене, чији протеински производи играју кључну улогу у сигналним путевима неоангиогенезе код карцинома дојке.

### 1.2.1 Експресија иРНК за $\beta$ -actin и релативне експресије испитиваних гена неоангиогенезе

*Housekeeping* гени су конститутивни гени који су потребни за нормално функционисање ћелија. Експримирани су у свим ћелијама организма у нормалним, али и у патофизиолошким условима. У експерименталне сврхе, експресија једног или више *housekeeping* гена користи се

као референтна тачка за анализу нивоа експресије других гена. У овом истраживању, експресија иРНК  $\beta$ -actin гена је коришћена као позитивна контрола односно, *housekeeping* ген. Резултати показују да је експресија иРНК  $\beta$ -actin гена стабилно експримирана у свим перитуморским и туморским ткивима испитиваних узорка (*Графикон 5*).

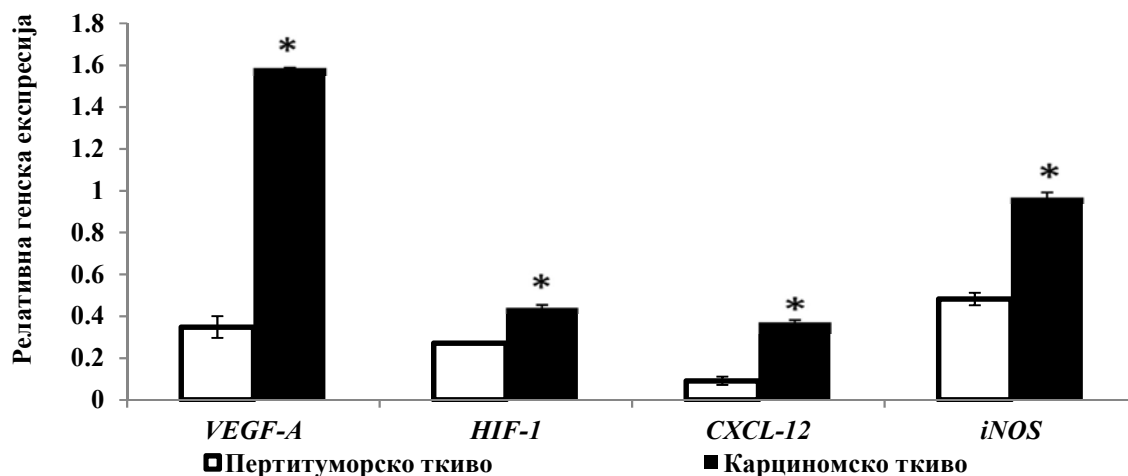
**Графикон 5.** Експресија иРНК  $\beta$ -actin гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за укупан број узорака (n=50).

Релативна експресија иРНК *VEGF-A*, *HIF-1*, *CXCL-12* и *iNOS*-а гена је прерачуната у односу на експресију иРНК  $\beta$ -actin-а испитиваног узорка и резултати су приказани на *Графикону 6*. За разлику од претходно проучаваног параметра MMP-9, генска експресија ових параметара је статистички значајно виша у ткиву карцинома, када се упореди са микрокружењем. На основу резултата може се приметити да је у туморском ткиву највише експримирана иРНК *VEGF-A* гена, па затим иРНК *iNOS* гена, док перитуморско ткиво највише експримира иРНК *iNOS* гена. Постоји велика разлика у експресији гена између ПТ и КТ. Тако је експресија иРНК *VEGF-A* гена 4.57 пута виша у КТ у односу на ПТ. Слично је и са *CXCL-12*, где туморско ткиво има 4.13 пута већу експресију овог гена од перитуморског ткива (*Табела 4*).

**Графикон 6.** Релативна експресија иРНК *VEGF-A*, *HIF-1 $\alpha$* , *CXCL-12* и *iNOS* гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за укупан број узорака ( $n=50$ ); \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика између ПТ и КТ.  *$\beta$ -actin* је референтни ген за нормализацију генске експресије.

**Табела 4.** Разлике у релативној експресији иРНК *VEGF-A*, *HIF-1 $\alpha$* , *CXCL-12* и *iNOS* гена између перитуморског и туморског ткива код пацијената са карциномом дојке.

иРНК	<i>VEGF-A</i>	<i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	<i>CXCL-12</i>	<i>iNOS</i>
ПТ: КТ	1: 4.571	1: 1.638	1: 4.131	1: 2.016

### 1.2.2 Релативна експресија иРНК *VEGF-A* гена

Најважнији медијатор туморске ангиогенезе је VEGF. Карциноми са високом експресијом *VEGF-A* гена расту брже и метастазирају. Индукција повећане експресије *VEGF-A* може бити узрокована бројним факторима и такви карциноми имају лошију прогнозу.

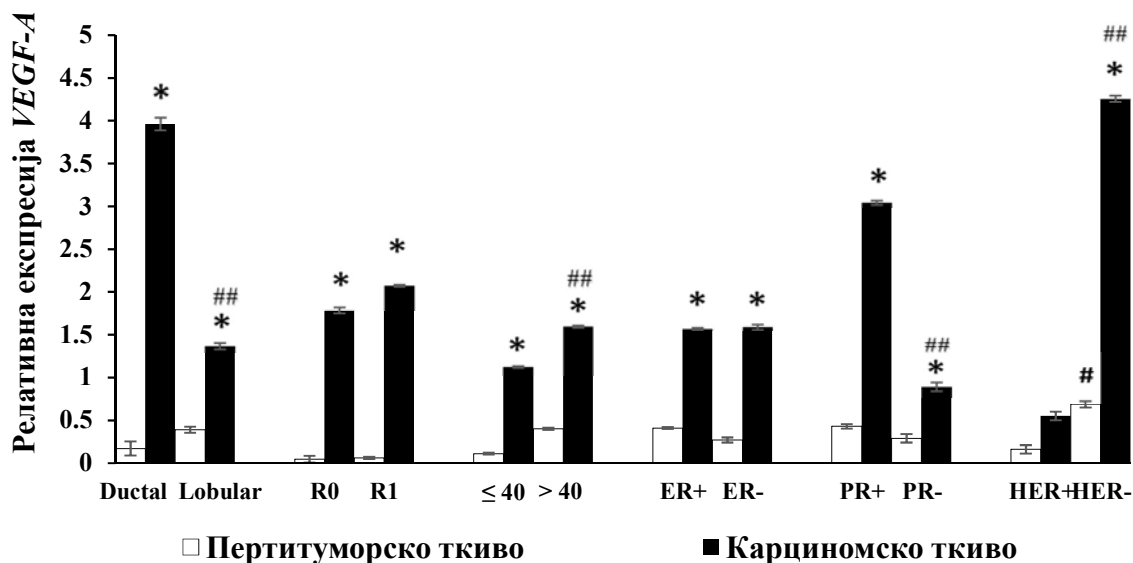
На **Графикону 7** је приказана релативна експресија иРНК *VEGF-A* гена у односу на клиничко-патолошке карактеристике пацијената (тип карцинома, чистоћа маргина, старост пацијенткиња и статус рецептора). Ткиво карцинома код свих испитиваних пацијената у оквиру набројаних класификација има већу експресију иРНК *VEGF-A* гена у односу на ПТ.

Карциномско ткиво дукталног карцинома има 23.35 пута већу експресију иРНК *VEGF-A* гена у односу на ПТ које га окружује. У поређењу са пацијентима код којих је дијагностикован *Invasive Lobular Carcinoma*, КТ дукталног карцинома има статистички значајно већу експресију овог гена. Разлике у експресији *VEGF-A* гена, постоје и у поређењу ПТ код ових типова

карцинома, али промене нису статистички значајне. Анализе релативне експресије иРНК *VEGF-A* гена у КТ су показале да нема статистички значајне разлике између узорака са R0 и R1 ресекцијом. Може се приметити јако ниска експресија иРНК *VEGF-A* гена у ПТ ткиву код оба типа ресекција. Експресија иРНК *VEGF-A* гена је већа код старијих пацијената у ПТ и КТ у односу на оне које су у тренутку хируршког захвата имале мање од 40 година, а разлика је у поређењу туморских ткива статистички значајна.

Поређењем експресије иРНК *VEGF-A* гена у КТ и ПТ између пацијената са експримираним или неекспримираним рецепторима за естроген, није утврђена значајна разлика. Међутим, када су у питању рецептори за прогестерон, статистички значајно већа експресија иРНК *VEGF-A* гена је присутна код групе пацијената са израженим рецепторима за прогестерон (PR+). Ткиво карцинома код пацијената без експримираног рецептора за хумани епидермални фактор раста (HER-) има 7,74 пута већу експресију *VEGF-A* гена у односу на пацијенте са израженим рецептором (HER+). Може се приметити и статистички значајна разлика у експресији иРНК *VEGF-A* гена у ПТ, која је већа код HER- пацијената.

**Графикон 7.** Релативна експресија иРНК *VEGF-A* гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на клиничко-патолошке карактеристике.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за број узорака испитиваног параметра (n); \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика између ПТ и КТ; # $p < 0.05$  статистички значајна разлика између перитуморских ткива; ## $p < 0.05$  статистички значајна разлика између туморских ткива.  $\beta$ -actin је референтни ген за нормализацију генске експресије.

На следећем **Графикону 8** је приказана експресија иРНК *VEGF-A* гена у односу на TNM класификацију и хистолошки градус за испитиване узорке. Анализе експресије иРНК *VEGF-A*



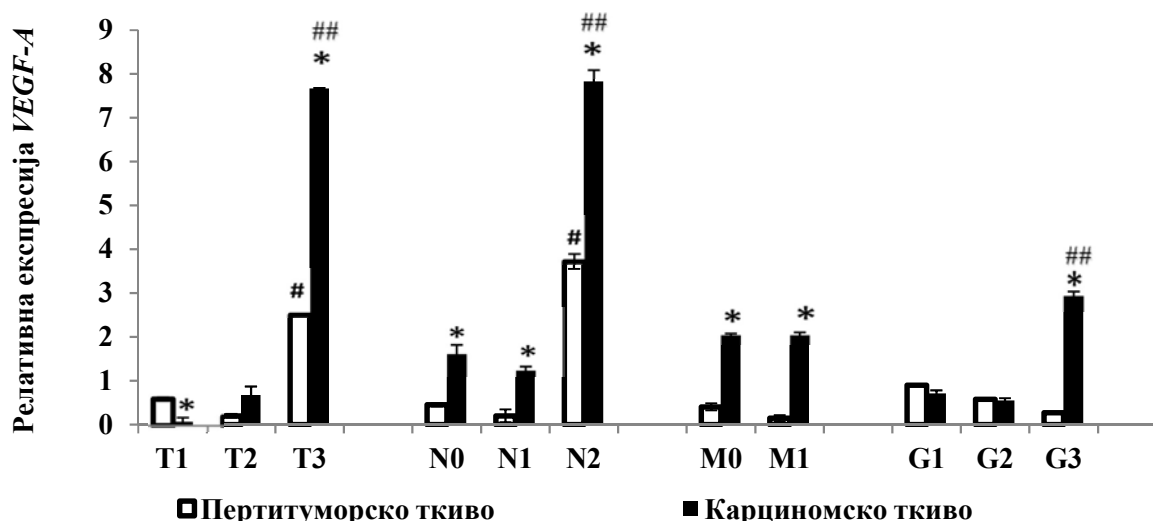
гена у односу на величину тумора су показале да ПТ око тумора мањих од 2 cm (T1) продукује већу експресију иРНК *VEGF-A* гена у односу на КТ. Како тумор повећава димензије, тако се повећава експресија иРНК *VEGF-A* гена, али доминантну улогу у продукцији преузима ткиво карцинома. Највећа експресија иРНК *VEGF-A* гена уочава се код тумора већих од 5 cm (T3) у ПТ и КТ. Резултати су показали да туморско ткиво веће од 5 cm (T3) експримира 85.22 пута више иРНК *VEGF-A* гена од тумора величине до 2 cm (T1). Такође, разлика у експресији *VEGF-A* гена је присутна и у ПТ ткиву између ове две групе. Перитуморско ткиво (T3) има 12.55 пута већу експресију иРНК *VEGF-A* гена од ПТ тумора мањих од 2 cm (T1).

Када је у питању захваћеност лимфних нодуса, резултати експресије иРНК *VEGF-A* гена су показали да КТ експримира сигнификантно више овог гена у односу на ПТ. Показана позитивна корелација између експресије *VEGF-A* и инвазије туморских ћелија у лимфне нодусе. Што је већа инвазија туморских ћелија у лимфне нодусе и експресија *VEGF-A* у ПТ и КТ се повећава. У ПТ и КТ N2 групе статистички значајно је повећана експресија *VEGF-A* у поређењу са групама N0 и N1. Тако се може приметити да је експресија *VEGF-A* у ПТ код тумора који су се значајно проширили на лимфне нодусе (N2 група) 18.65 пута већа од перитуморског ткива N1 групе.

Следећа класификација представља експресију иРНК *VEGF-A* гена у односу на присуство или одсуство метастатских ћелија у удаљеним органима. КТ продукује већу експресију *VEGF-A* у односу на ПТ код обе групе (M0 и M1). Када упоредимо експресију иРНК *VEGF-A* гена у перитуморским, али и карциномским ткивима између M0 и M1 групе, није утврђена статистички значајна разлика.

Анализирана је експресија иРНК *VEGF-A* гена у односу на хистолошки градус. Може се приметити да водећу улогу у експресији овог гена код групе G1, коју чине добро диференциране туморске ћелије („*low grade*“) има перитуморско ткиво у односу на ткиво карцинома. Сразмерно напредовању болести, односно са повећањем хистолошког градуса повећава се и експресија *VEGF-A* у ткиву карцинома. Тако, КТ код хистолошког градуса G3, кога чине лоше диференциране туморске ћелије („*high grade*“) има статистички значајно већу експресију у односу на исто ткиво код група G1 и G2.

**Графикон 8.** Релативна експресија иРНК *VEGF-A* гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на TNM класификацију и хистолошки градус



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за број узорака испитиваног параметра (n); \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика између ПТ и КТ; # $p < 0.05$  статистички значајна разлика између перитуморских ткива; ## $p < 0.05$  статистички значајна разлика између туморских ткива.  $\beta$ -actin је референтни ген за нормализацију генске експресије.

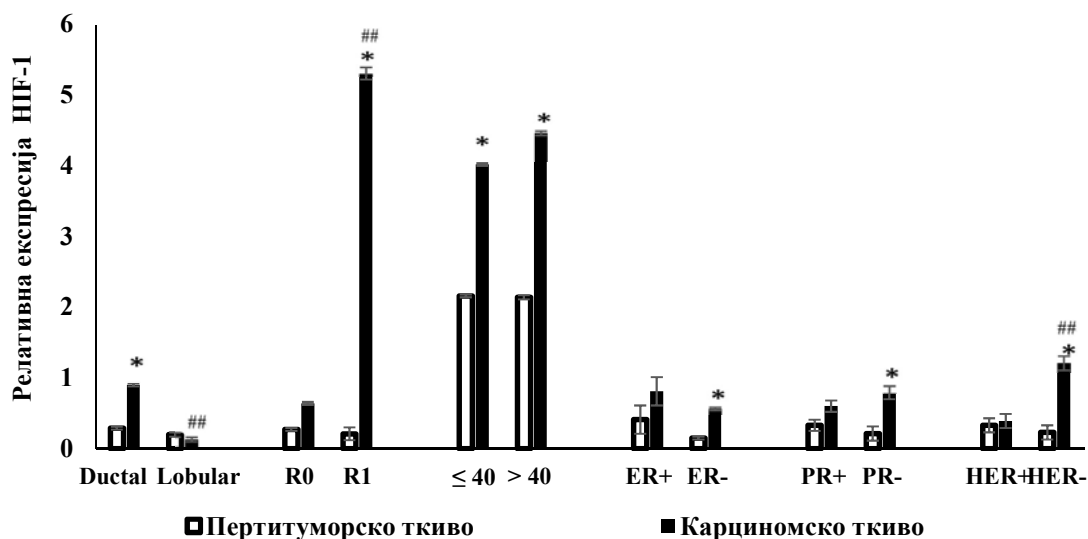
### 1.2.3 Релативна експресија иРНК *HIF-1 $\alpha$* гена

Фактор индукован хипоксијом, *HIF-1 $\alpha$*  има важну улогу у ангиогенези, инвазији и метастазирању тумора. Анализирање генске експресије овог фактора има велики значај у процени агресивности тумора. На **Графикону 9** је представљена релативна експресија иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена у односу на клиничко-патолошке карактеристике тумора. Може се приметити да код свих испитиваних група туморско ткиво има већу експресију *HIF-1 $\alpha$*  гена у односу на микроокружење тумора, осим у лобуларном карциному. Такође, нема статистички значајне разлике у експресији иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена између перитуморских ткива.

Када је у питању тип карцинома, чак 9.13 пута већу експресију *HIF-1 $\alpha$*  гена има КТ дукталног карцинома у односу на лобуларни тип. КТ код групе узорака на чијим маргинама су макроскопски видљиве туморске ћелије (R1), има изузетно високу експресију иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена и од КТ R0 групе је већа 8.23 пута. Анализе експресије *HIF-1 $\alpha$*  гена у КТ и ПТ су показале јако високе нивое иРНК за овај ген и код млађих, али и код старијих пацијената ( $\leq 40$  и  $> 40$ ). Међутим, није установљена статистички значајна разлика у експресији овог гена у поређењу ПТ и КТ код ових пацијената.

Анализом експресије иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена у ткиву тумора у односу на присуство рецептора за стероидне хормоне, показано је да тумори који немају рецепторе за прогестерон (PR-) и хумани епидермални фактор раста (HER-) имају већу експресију овог гена у односу на групе са експримираним рецепторима.

**Графикон 9.** Релативна експресија иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на клиничко-патолошке карактеристике.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за број узорака испитиваног параметра (n); \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика између ПТ и КТ; # $p < 0.05$  статистички значајна разлика између перитуморских ткива; ## $p < 0.05$  статистички значајна разлика између туморских ткива.  $\beta$ -actin је референтни ген за нормализацију генске експресије.

На следећем **Графикону 10** је представљена релативна експресија иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена у односу на TNM класификацију и хистолошки градус тумора. При анализирању експресије иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена у односу на величину тумора, потребно је истаћи да је највећа експресија иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена у ткиву тумора најмањих димензија (T1) у односу на КТ карцинома већих димензија (T2 и T3). У T2 групи, готово да нема разлике у експресији *HIF-1 $\alpha$*  између ПТ и КТ. Са повећањем величине тумора, мења се улога у експресији иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена. Тако, перитуморско ткиво које окружује туморе веће од 5 cm (T3) има статистички значајно већу експресију *HIF-1 $\alpha$* , која је чак 4.98 пута већа од ткива тумора.

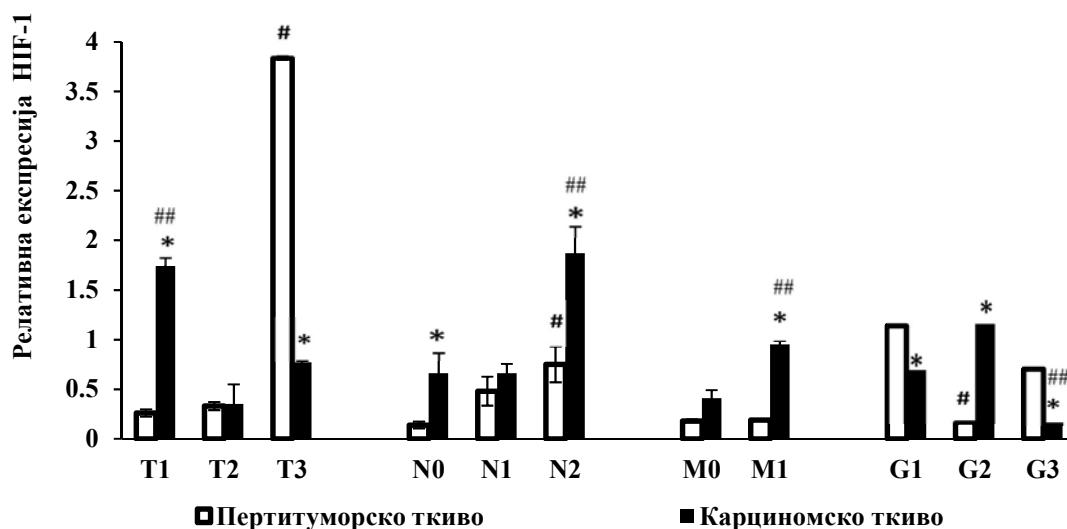
Следећа класификација се односи на експресију иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена у односу на статус лимфних нодуса. Резултати су показали да је експресија *HIF-1 $\alpha$*  већа у КТ у односу на ПТ. Примећује се повећање експресије *HIF-1 $\alpha$*  и у ПТ и у КТ, како туморске ћелије све више захватају

лимфне нодусе. Тако, туморско ткиво N2 групе има статистички значајно већу експресију овог гена у поређењу са N0 и N1. Такође, ПТ N2 групе има статистички значајно већу експресију *HIF-1 $\alpha$*  у поређењу са N0.

Анализе експресије иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена у односу на присуство метастатских депозита су показале да КТ код обе групе пацијената (M0 и M1) има већу експресију овог гена у односу на ПТ. Приказани резултати показују статистички значајно већу експресију *HIF-1 $\alpha$*  у КТ M1 групе у односу на M0.

Када је у питању хистолошки градус, доминантну улогу у продукцији иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена преузима ПТ код G1 и G3 групе у односу на КТ, док се супротан тренд примећује у G2 групи, где КТ има 6.82 пута већу експресију *HIF-1 $\alpha$*  од ПТ. Такође, ПТ G2 групе има најмању продукцију иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена и у поређењу са ПТ група G1 и G3.

**Графикон 10.** Релативна експресија иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на TNM класификацију и хистолошки градус тумора.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за број узорак испитиваног параметра (n); \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика између ПТ и КТ; # $p < 0.05$  статистички значајна разлика између перитуморских ткива; ## $p < 0.05$  статистички значајна разлика између туморских ткива.  *$\beta$ -actin* је референтни ген за нормализацију генске експресије;

### 1.2.4 Релативна експресија иРНК *CXCL-12* гена

*CXCL-12* познат и као „*stromal cell-derived factor-1*“ (SDF-1) као продукт саме туморске ћелије, али и као продукт ћелија из перитуморског окружења доводи до настанка секундарних депозита, иницира миграцију и представља проангиогени фактор. Одређивани су нивои иРНК *CXCL-12* гена у односу на клиничко-патолошке карактеристике тумора (**Графикон 11**).

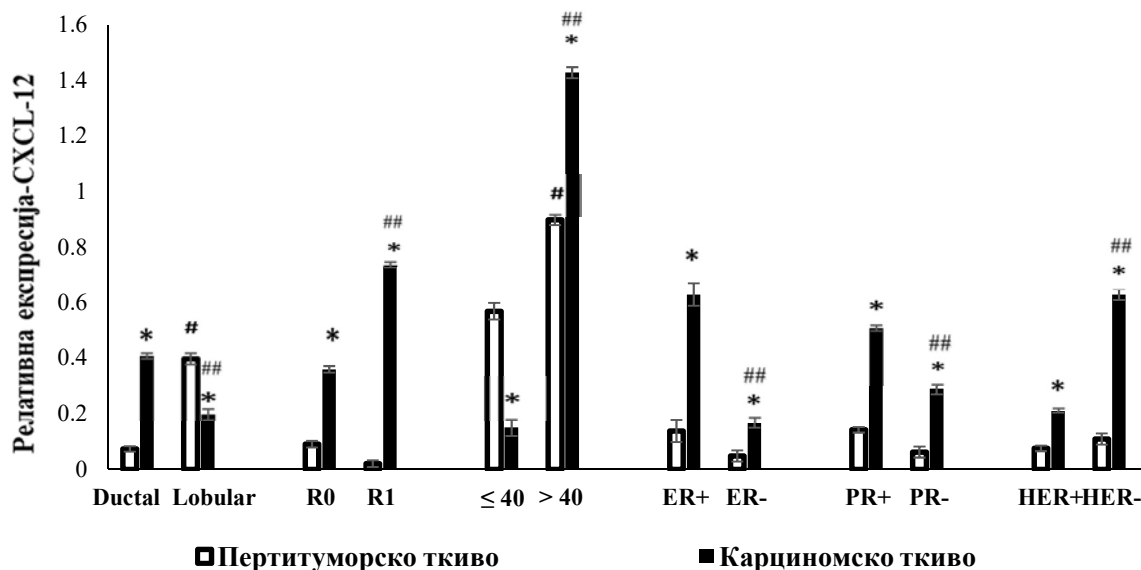
У односу на тип карцинома, анализе су показале да КТ дукталног карцинома експримира веће нивое иРНК *CXCL-12* гена у односу на ПТ. За разлику од претходног, микроокружење око лобуларног типа карцинома има већу продукцију *CXCL-12* од КТ. Треба нагласити да ПТ око лобуларног карцинома има већу експресију овог гена од дукталног типа.

Следећа класификација показује релативну експресију иРНК *CXCL-12* гена у односу на чистоћу маргина. Показано је да је експресија овог гена већа у туморском ткиву код обе врсте ресекција (R0 и R1) у односу на ПТ. Значајно виша експресија *CXCL-12* у КТ је присутна код пацијената са R1 типом ресекције у поређењу са групом R0.

Анализа експресије иРНК *CXCL-12* гена у односу на старост пацијената је показала да код млађих пацијената ПТ има већу експресију иРНК *CXCL-12* гена у односу на КТ, док КТ код пацијената који су у време операције имали више од 40 година има већу експресију *CXCL-12* у односу на ПТ. Потребно је поменути да ПТ и КТ старијих пацијената имају већу експресију испитиваног гена од млађих пацијената.

Следећа класификација представља експресију иРНК *CXCL-12* гена у односу на статус рецептора за ER, PR и HER, где се запажа статистички значајно већа експресија *CXCL-12* у туморском ткиву. Група пацијента код којих су туморска ткива имала експримирани рецептори за естроген и прогестерон (ER+, PR+), као и група пацијената без рецептора за хумани епидермални фактор (HER-) имају статистички значајно већу експресију иРНК *CXCL-12* гена у КТ.

**Графикон 11.** Релативна експресија иРНК *CXCL-12* гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на клиничко-патолошке карактеристике



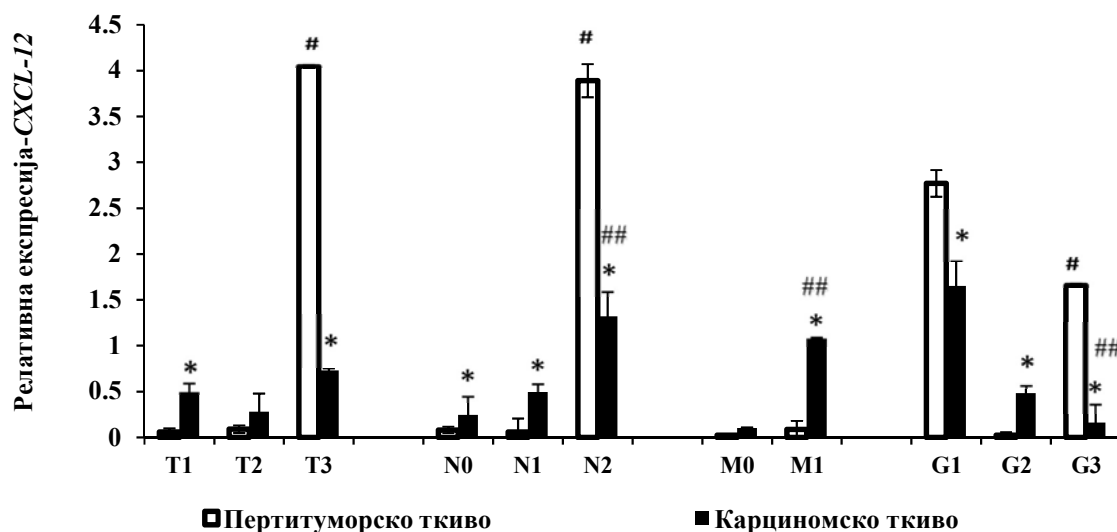
Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за број узорак испитиваног параметра (n); \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика између ПТ и КТ; # $p < 0.05$  статистички значајна разлика између перитуморских ткива; ## $p < 0.05$  статистички значајна разлика између туморских ткива.

На **Графикону 12** је представљена релативна експресија *CXCL-12* гена у односу на TNM класификацију и хистолошки градус тумора. Анализе експресије иРНК *CXCL-12* гена у односу на величину тумора су показале већу експресију овог гена у КТ код тумора T1 ( $p < 0.05$ ) и T2 ( $p > 0.05$ ). Међутим, ПТ око тумора већих од 5 cm (T3) има већу експресију *CXCL-12* у односу на КТ и тај однос је 1: 5.54 у корист ПТ. Није показана значајна разлика у експресији овог гена између туморских ткива код испитиваних група, док је у ПТ T3 групе виша експресија *CXCL-12* у односу на ПТ T1 и T2. Тако је експресија *CXCL-12* у ПТ T3 групе већа 45 пута од T2, а чак 67.5 пута већа од T1.

У односу на статус лимфних нодуса, експресија иРНК *CXCL-12* гена је значајно већа у КТ у односу на ПТ у N0 и N1 групи. Овај однос се мења са напредовањем болести, па доминантну улогу у експримирању овог гена преузима ПТ (скоро 3 пута већу од КТ) у групи пацијената са метастазама присутним у ипсилатералним, аксиларним нодусима, који су фиксирани један за други (N2 група). Показано је, да је експресија *CXCL-12* гена у ПТ N2 групе, већа 64.83 пута од ПТ N1 и 48.5 пута већа од ПТ N0 групе. Може се приметити како се градијски повећава експресија *CXCL-12* и у КТ и у ПТ ткиву, како карциномске ћелије захватају све већи број лимфних нодуса.

Када су у питању метастатске промене, показано је да је експресија иРНК *CXCL-12* гена већа у КТ у односу на ПТ. Ткиво карцинома код пацијента са присутним метастатским променама (M1), има статистички значајно вишу (10.83 пута) експресију *CXCL-12* у односу на M0 групу. КТ код карцинома са метастазама (M1) експримира 13,55 пута више овог гена у односу на ПТ. Перитуморско ткиво код пацијената са хистолошким градусом тумора G1 и G3 има већу експресију иРНК *CXCL-12* гена у односу на туморско ткиво, док је у групи G2 обрнута ситуација. Уочава се велика разлика у експресији *CXCL-12* између туморског и перитуморског ткива у групи са слабо диференцираним туморским ћелијама G3 групе, где је овај однос 1: 16.7 (КТ: ПТ).

**Графикон 12.** Релативна експресија иРНК *CXCL-12* гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на TNM класификацију и хистолошки градус тумора.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за број узорака испитиваног параметра (n); \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика између перитуморског и туморског ткива; # $p < 0.05$  статистички значајна разлика између перитуморских ткива; ## $p < 0.05$  статистички значајна разлика између туморских ткива.

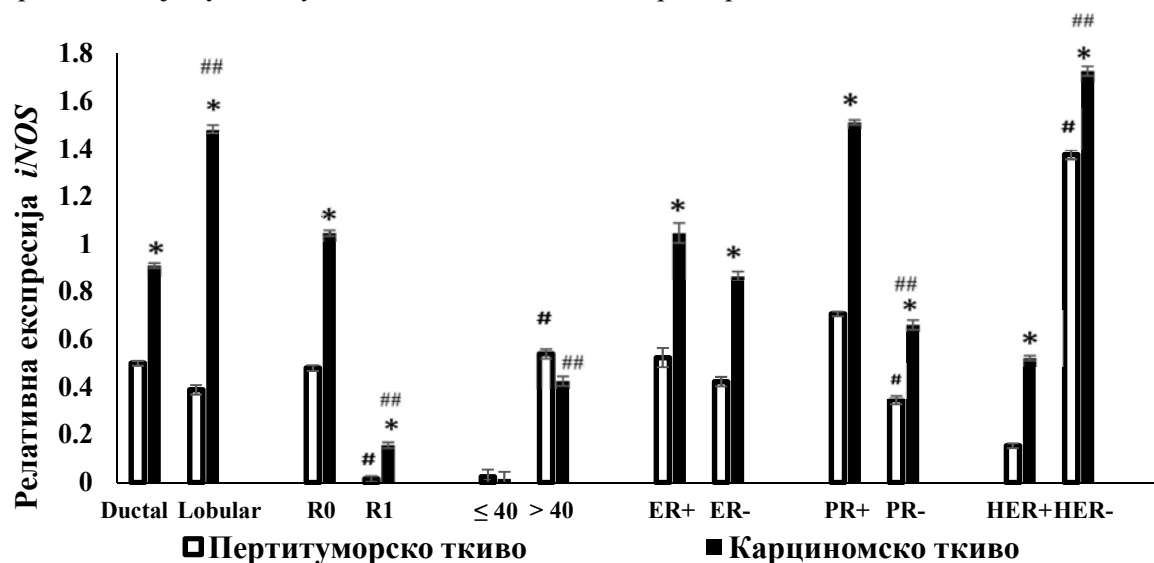
### 1.2.5 Релативна експресија иРНК *iNOS* гена

С обзиром на бројне улоге NO, као што су мобилизација и активација прогенитора ендотелних ћелија које имају улогу у индукцији неоангиогенезе, у овој студији смо анализирали експресију иРНК *iNOS* гена у ПТ и КТ ткиву пацијената са карциномом дојке. На **Графикону 13** је представљена релативна експресија овог гена у односу на клиничко-патолошке карактеристике пацијената. Резултати су показали да је у оквиру испитиваних класификација експресија *iNOS* гена већа у КТ у односу на ПТ, осим у односу на старост пацијената када је експресија овог гена виша у ПТ.

Туморско ткиво лобуларног карцинома има већу експресију иРНК *iNOS* гена у поређењу са истим ткивом дукталног типа карцинома. Разлика у експресији *iNOS* у поређењу перитуморских ткива, није значајна. У односу на тип ресекције, ПТ и КТ узорака са чистим маргинама (R0) имају већу експресију иРНК *iNOS* гена у поређењу са R1 групом. Резултати су показали да је експресија *iNOS* статистички значајно виша у ПТ и КТ код пацијената старијих од 40 година у поређењу са истим ткивима млађих пацијената.

Следећи класификације показују експресију иРНК *iNOS* гена у односу на статус рецептора за естроген, прогестерон и HER. Туморско ткиво код ових група пацијената има већу експресију *iNOS* у поређењу са перитуморским ткивом. Група пацијената чији тумори имају експримиране рецепторе за естроген и прогестерон (ER+, PR+) имају већу експресију *iNOS* у односу на пацијенте са негативном експресијом за ове рецепторе (статистички значајне промене у оквиру класификације за PR рецепторе). Група пацијената са негативном експресијом рецептора за хумани епидермални фактор раста (HER-) има високу продукцију иРНК *iNOS* гена и у КТ и ПТ ткиву у односу на групу са експримираним рецепторима за овај фактор. Тако КТ ове групе има 3.30 пута већу експресију, док ПТ чак 8.87 пута већу експресију *iNOS* од групе која експримира рецепторе за HER.

**Графикон 13.** Релативна експресија иРНК *iNOS* гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на клиничко-патолошке карактеристике.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за број узорака испитиваног параметра (n); \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика између перитуморског и туморског ткива; # $p < 0.05$  статистички значајна разлика између ПТ; ## $p < 0.05$  статистички значајна разлика између КТ.

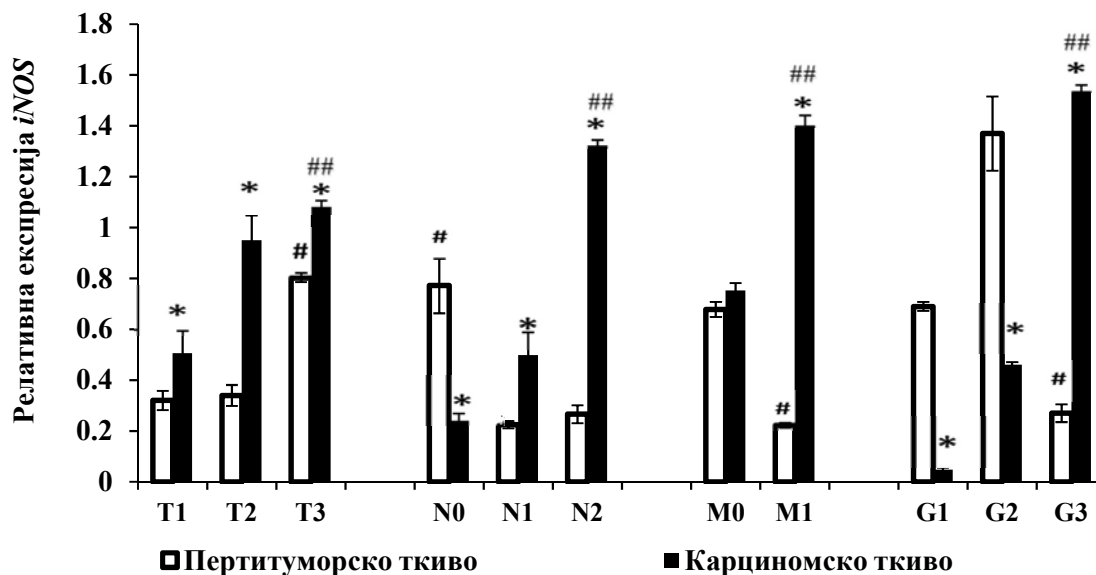


На *Графикону 14* је представљена релативна експресија иРНК *iNOS* гена у односу на TNM класификацију и хистолошки градус тумора. Може се уочити да је експресија иРНК *iNOS* гена у већини случајева већа у КТ ткиву у односу на ПТ. Анализе експресије *iNOS* у односу на величину тумора су показале да је већа експресија овог гена у КТ у односу на ПТ, као и да се експресија повећава како се повећава и величина тумора. Тако, тумори већи од 5 cm имају највећу експресију иРНК *iNOS* гена и у ПТ и у КТ у поређењу са истим ткивима тумора мањих димензија.

Када је у питању статус лимфних нодуса уочено је да микроокружење око тумора који се није проширио на лимфне нодусе (N0) има изразито високу релативну експресију иРНК *iNOS* гена у односу на КТ, као и у односу на ПТ у групама N1 и N2. Код група пацијената са захваћеним лимфним нодусима N1 и N2, експресија *iNOS* је доминантна у КТ односу на ПТ. Како карциномске ћелије захватају све већи број нодуса и експресија овог гена се повећава. Тако, туморско ткиво N2 групе 5.5 пута више експримира иРНК *iNOS* гена од КТ групе N1.

Следећа класификација представља експресију иРНК *iNOS* гена у односу на метастазе, где је овај ген више експримиран у КТ у односу на ПТ. При поређењу експресије *iNOS* у КТ, показана је већа експресија код пацијената код којих се болест шири тј. у M1 групи, док ПТ показује обрнуту тенденцију (статистички значајно већа експресија овог гена у ПТ групе M0 у односу на M1). Када је у питању градус, примећена је већа експресија иРНК *iNOS* гена у ПТ ткиву код G1 и G2 групе у односу на КТ, док је ситуација обрнута у групи G3. Треба напоменути, да је експресија *iNOS* у ПТ G2 групе највећа, чак 5.07 пута већа од ПТ G3. Експресија *iNOS* у КТ се градацијски повећава, како болест напредује. Примећује се да КТ код узнапредовале болести (G3) експримира 38.5 пута више *iNOS* од G1 групе, у којој се налазе ћелије карцинома са још увек добром диференцијацијом.

**Графикон 14.** Релативна експресија иРНК *iNOS* гена у перитуморском и туморском ткиву карцинома дојке у односу на TNM класификацију и хистолошки градус тумора.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за број узорака испитиваног параметра (n); \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика између ПТ и КТ; # $p < 0.05$  статистички значајна разлика између перитуморских ткива; ## $p < 0.05$  статистички значајна разлика између туморских ткива.

### 1.3 Протеинска експресија CXCR-4 и VEGF рецептора у перитуморском и туморском ткиву код пацијената са карциномом дојке

Протеинска експресија CXCR-4 и VEGF<sub>165b</sub> рецептора, као предиктора агресивности тумора, је детектована методом флуоресцентне микроскопије, коришћењем инвертног флуоресцентног микроскопа. У овом одељку *Резултата* су приказане репрезентативне слике протеинске експресије CXCR-4 и VEGF<sub>165b</sub> рецептора за 5 пацијената са карциномом дојке. Експресија ових протеина за остале пацијенте се налази у *Прилогу 1*.

#### 1.3.1 Протеинска експресија CXCR-4

На *Слици 20* је представљена протеинска експресија CXCR-4 рецептора на попречним пресецима кроз карциномско и перитуморско ткиво код 5 пацијената са карциномом. Изабрани

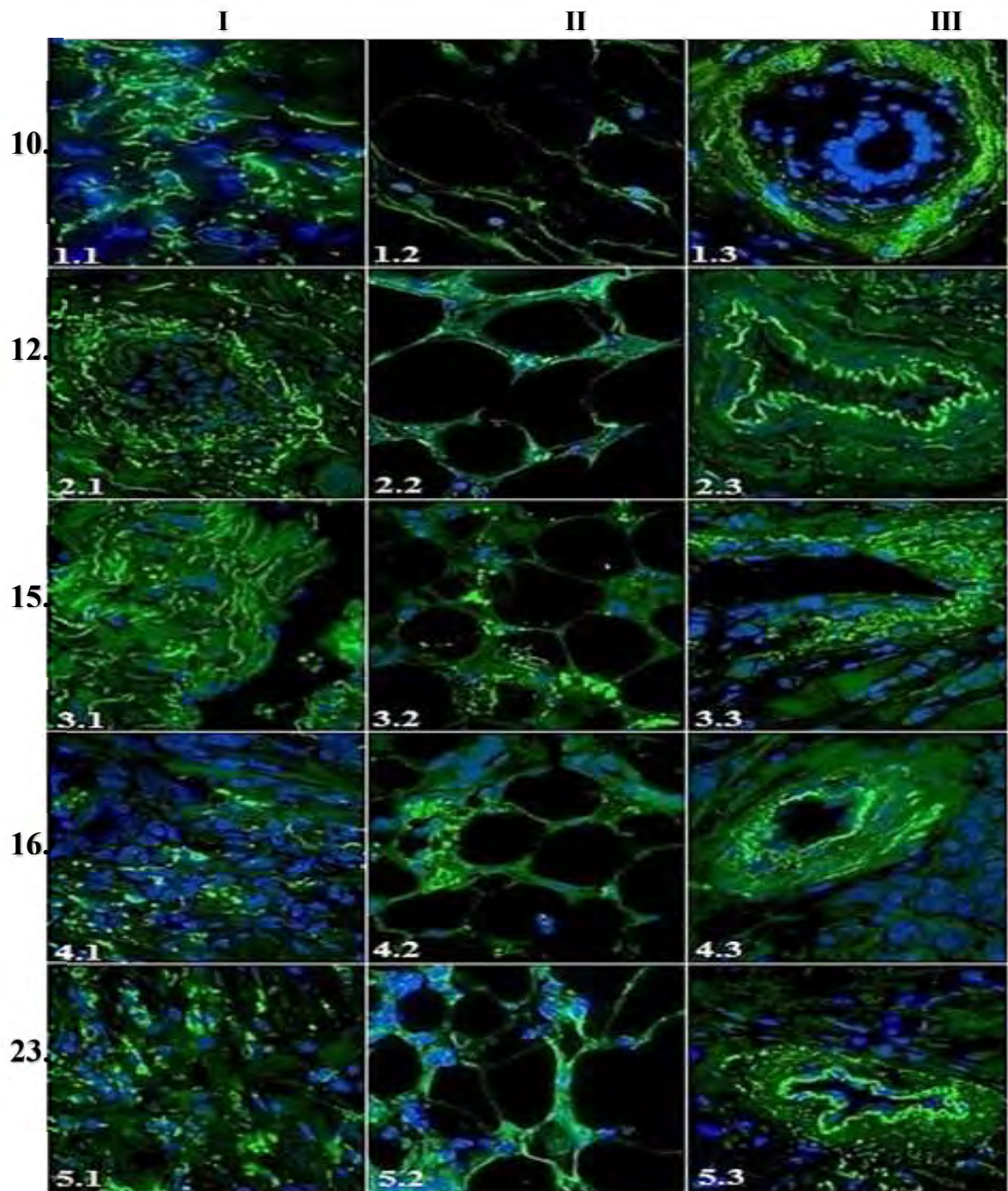
су репрезентативни узорци, који су означени редним бројевима 10., 12., 15., 16. и 23. Примећује се разлика у протеинској експресији CXCR-4 рецептора између попречних пресека кроз КТ представљено у првој колони (I) у односу на ПТ (колони II). Протеинска експресија CXCR-4 рецептора на попречном пресеку кроз крвни суд, представља унутрашњу позитивну контролу (колони III).

На попречном пресеку кроз КТ (I) се запажа појачана експресија CXCR-4 рецептора (интензивнија зелена боја рецептора) у односу на ПТ (II). На микрографијама (1.1, 2.1, 3.1, 4.1 и 5.1) се могу уочити туморске ћелије са атипичном структуром, са поремећеним односом једро-цитоплазма. Једра су већа у односу на једра здравих ћелија. Уочавају се мегаједарне структуре. Услед високог митотског индекса, карциномске ћелије често броје више једара, што је уочљиво на *Слици 20*, јер цитоплазма не стиже да се подели истом брзином.

У другој колони на *Слици 20* су представљени попречни пресеци кроз ПТ које окружује карцином (1.2, 2.2, 3.2 4.2 и 5.2). Микроокружење око тумора код карцинома дојке најчешће представља масно ткиво. На микрографијама 2.2, 3.2 и 4.2 се уочава појачана протеинска експресија CXCR-4 у односу на остале микрографије перитуморског ткива. Познато је да здраво ткиво дојке не експримира рецептор CXCR-4, стога ови резултати указују на измењену функцију и морфологију перитуморског ткива.

Последња колони (III) на *Слици 20* је позитивна контрола. Примећује се појачана експресија овог рецептора, која је уобичајено велика на попречним пресецима крвних судова. На слици се уочавају пресеци венске (2.3 и 5.3) и капиларне мреже (1.3, 3.3 и 4.3).

Слика 20. Протеинска експресија CXCR-4 рецептора у перитуморском (II колона) и ткиву карцинома (I колона) код пацијената са карциномом дојке. Унутрашња позитивна контрола представљена у је у колони III.



Слике су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а рецептори CXCR-4 зелено (секундарно антитело Goat Anti-Rabbit IgG FITC).

### 1.3.2 Протеинска експресија VEGF<sub>165b</sub> рецептора

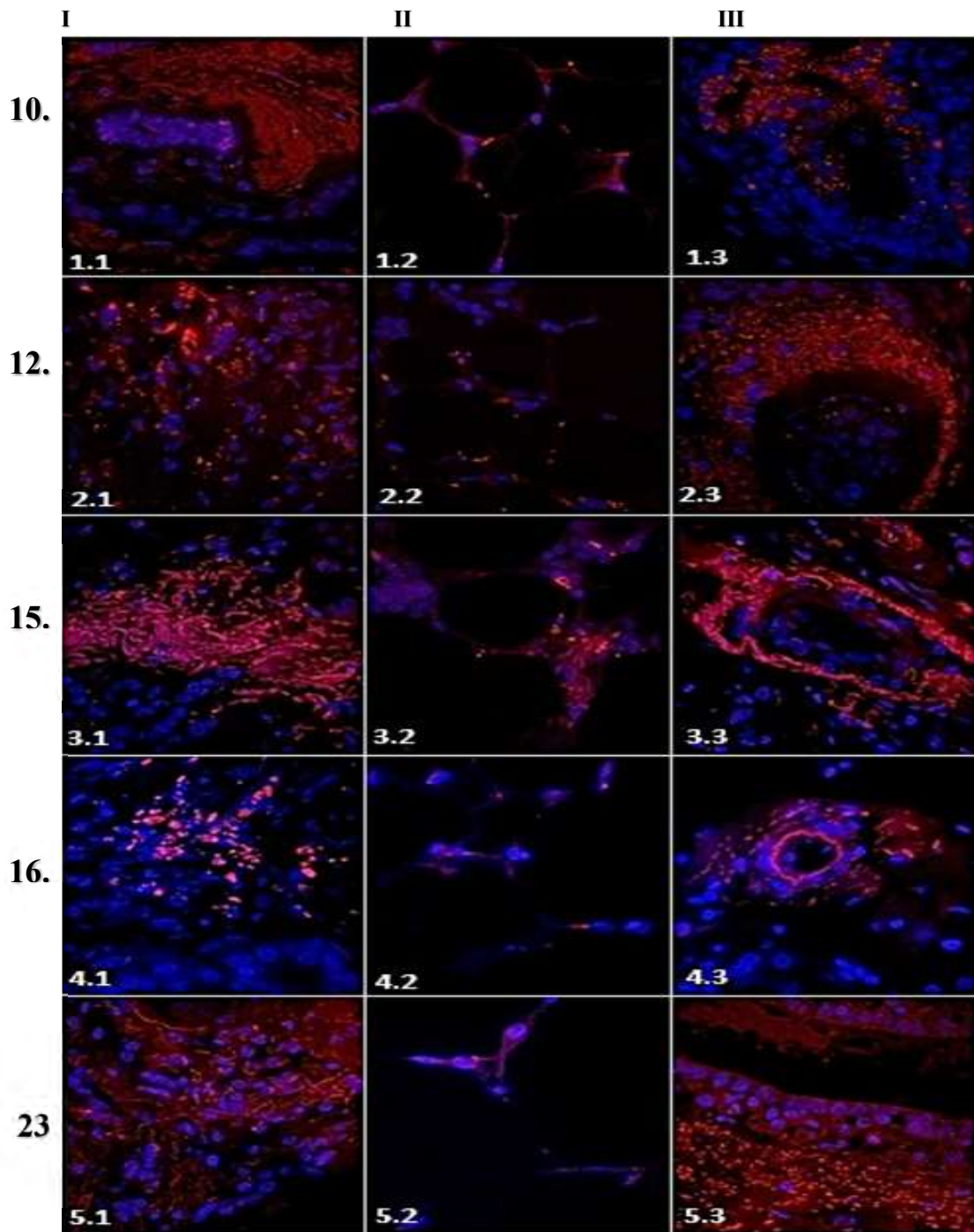
На *Слици 21* је представљена протеинска експресија снажног ангиогеног и митогеног фактора VEGF<sub>165b</sub> рецептора на попречним пресецима кроз карциномско и перитуморско ткиво код 5 пацијената са карциномом дојке. Изабрани су репрезентативни узорци, који су у овој студији означени редним бројевима 10., 12., 15., 16. и 23. Примећује се разлика у протеинској експресији VEGF<sub>165b</sub> рецептора између попречних пресека кроз карциномско ткиво представљено у првој колони (I) у односу на перитуморско ткиво (колони II). Протеинска експресија VEGF<sub>165b</sub> рецептора на попречном пресеку кроз крвни суд, представља унутрашњу позитивну контролу (колони III). На попречном пресеку кроз КТ (I) се запажа појачана експресија VEGF<sub>165b</sub> протеина (интензивнија црвена боја рецептора), у односу на ПТ (II). На микрографијама (1.1, 2.1, 3.1, 4.1 и 5.1) се могу уочити туморске ћелије са атипичном структуром, са поремећеним односом једро-цитоплазма. Једра су већа у односу на једра здравих ћелија. Услед високог митотског индекса, карциномске ћелије броје више једара што представљају плаво обојене структуре на микрографијама.

У другој колони (II) на *Слици 21* су представљени попречни пресеци кроз ПТ које окружује карцином (1.2, 2.2, 3.2 4.2 и 5.2). Како је већ наглашено, евидентна је значајно већа експресија VEGF<sub>165b</sub> протеина у КТ (I) у поређењу са ПТ (II). На микрографијама 2.2 и 3.2 се уочава појачана експресија VEGF<sub>165b</sub> протеина у односу на остале микрографије перитуморског ткива.

Последња колони (III) на *Слици 21* је узета као позитивна контрола. Уочава се појачана експресија овог рецептора, која је уобичајено велика на попречним пресецима крвних судова. Могу се уочити како пресеци венске, тако и капиларне мреже.

Разматрајући овде приказане случајеве, као и приказ протеинске експресије у перитуморском и канцерогеном ткиву свих пацијената (*Прилог 1*), може се закључити да је експресија VEGF<sub>165b</sub> и CXCR-4 рецептора већа у КТ у односу на ПТ. Треба узети у обзир да се ови рецептори не експримирају у здравом ткиву дојке, што сугерише да ПТ никако не представља здраво ткиво, јер под утицајем тумора постаје активни чинилац канцерогенезе, што потврђују представљени резултати. Такође, висока експресија ових рецептора у КТ може указати на лошију прогнозу болести.

Слика 21. Протеинска експресија VEGF рецептора у перитуморском (II колона) и ткиву карцинома (I колона) код пацијената са карциномом дојке. Унутрашња позитивна контрола представљена је у колони III.



Слике су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увељачању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), а рецептори VEGF црвено (секундарно антитело *Dnk pAb* у *Ms IgG PE*).



## 2. Примена нестандартних модалитета лечења

Конвенционални видови онколошке терапије имају бројна нежељена дејства, те је врло битно посветити пажњу новим модалитетима антитуморске терапије, која може имати подједнаку ефикасност, а знатно мање нежељених дејстава. Осим примене стандардних хемиотерапијских агенаса који имају веома изражена нежељена дејства на опште здравствено стање пацијената, у оквиру овог дела представљени су ефекти биоактивних супстанци биљака, електропорације и електрохемиотерапије као нови видови терапије карцинома.

### 2.1 Цитотоксични ефекти електропорације на карциномским и здравим ћелијским линијама

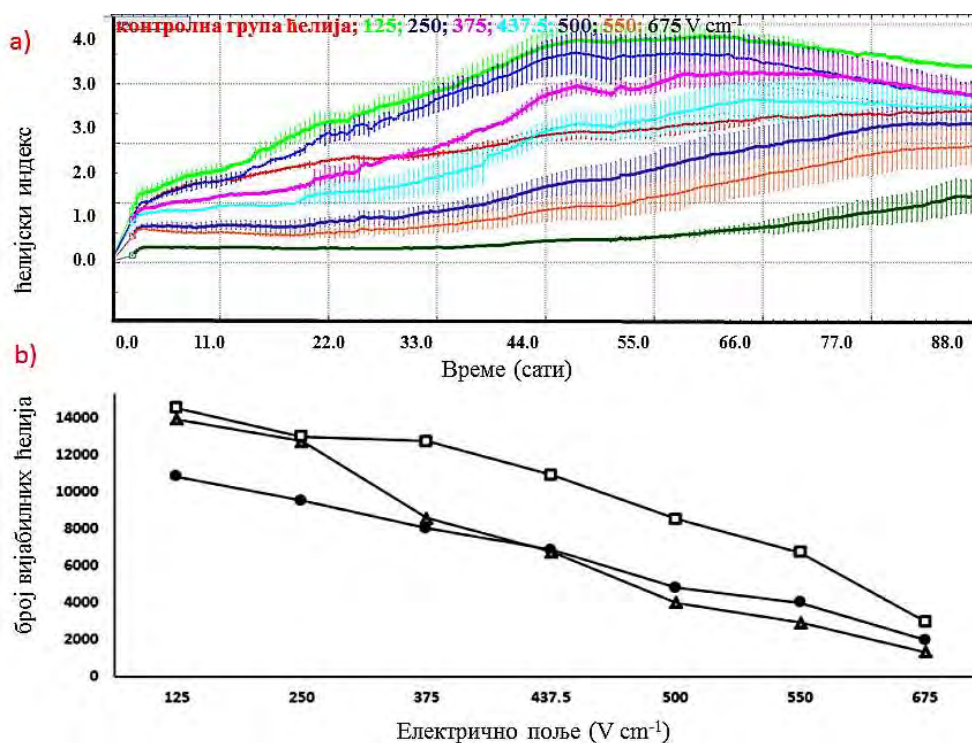
Цитотоксични ефекти електропорације, као једног од аспеката електротерапије карцинома, на канцерогеним и здравим ћелијским линијама, процењивни су на основу праћења вијабилности ћелија у реалном времену, RTCA методологијом (*xCELLigence System*), као и на основу одређивања типа ћелијске смрти акридин оранж / етидијум бромид микроскопском методом. У експерименту су коришћене хумане ћелије карцинома дојке и колона, као и хумане здраве ћелијске линије. Електропорација је изазивана следећим волтажама 50, 100, 150 175, 200, 220 и 270 V или изражене као јачина електричног поља 125, 250, 375, 437.5, 500, 550, 675 Vcm<sup>-1</sup>. Након третмана електропорацијом ћелије су засејаване у Е-плоче са 16 бунарића (концентрација третираних и нетретираних ћелија је била 10<sup>4</sup> ћелија по бунарићу). Резултати представљају континуирано праћење промена на ћелијама у одређеном временском интервалу (*real-time*) на *xCELLigence* апарату. Посебно су истакнути цитотоксични ефекти електропорације ћелија након 6, 24 и 72 сата од третмана, јер су то типични временски оквири за овакву врсту истраживања. Резултати представљају различито понашање ћелија на исте услове експеримента.

#### 2.1.1 Ефекти електропорације на вијабилност ћелијских линија и процена цитотоксичности

Коришћење *xCELLigence* технологије омогућава праћење ефеката неког третмана на адхерентним ћелијским линијама у сваком тренутку, *real time*, при чему се континуирано мери електрична импеданса која је комплементарна променама на ћелијама након примене различитих напона. Импеданса се мери помоћу микроелектроде која је интегрисана у дну сваког бунарића Е-плоче 16. Импедансе се приказују као ћелијски индекс (*Cell Index-CI*) и обезбеђују квантитативне информације о статусу ћелија у сваком тренутку.

Ефекти електропорације на MDA-MB-231 ћелијској линији су приказани на **Графикону 15**. Добијени резултати су анализирани и примећено је да електропорација инхибира вијабилност ћелија на дозно зависан начин (**Графикон 15a**). Ниски напони ( $125$  и  $250 \text{ V cm}^{-1}$ ) индукују пролиферацију ћелија, док су високи напони ( $500$ ,  $550$ ,  $675 \text{ V cm}^{-1}$ ) имали значајан цитотоксичан ефекат на MDA-MB-231 ћелијама. Када се ефекти различитих примењених волтажа анализирају у одређеним временским периодима (6, 24 и 72 сата од третмана), резултати показују да су напони  $375$ - $437.5 \text{ V cm}^{-1}$  изазвали акутно смањење броја вијабилних ћелија (након 6 и 24 сата), у односу на контролне ћелије ( $10^4$ , нетретирание ћелије). Након 72 сата третмана, вијабилност ћелија се значајно повећава, што показује да су се ћелије у потпуности опоравиле (**Графикон 15b**). Тек након примене напона виших од  $500 \text{ V cm}^{-1}$  значајно смањење броја вијабилних ћелија је примећено и након 72 сата од третмана. Цитотоксични ефекти електропорације су представљени као  $IC_{50}$  вредности (волтажа која убија 50% ћелија) у **Табели 3**. За MDA-MB-231 ћелије  $IC_{50}$  вредности су високе, у распону од  $501.42$ , након 6 сати до  $935.65 \text{ V cm}^{-1}$  након 72 сата, што потврђује опоравак и пролиферацију ћелија.

**Графикон 15.** Ефекти електропорације на ћелијској линији карцинома дојке MDA-MB-231 (a). Анализирање ефеката електропорације након 6, 24 и 72 сата (б).

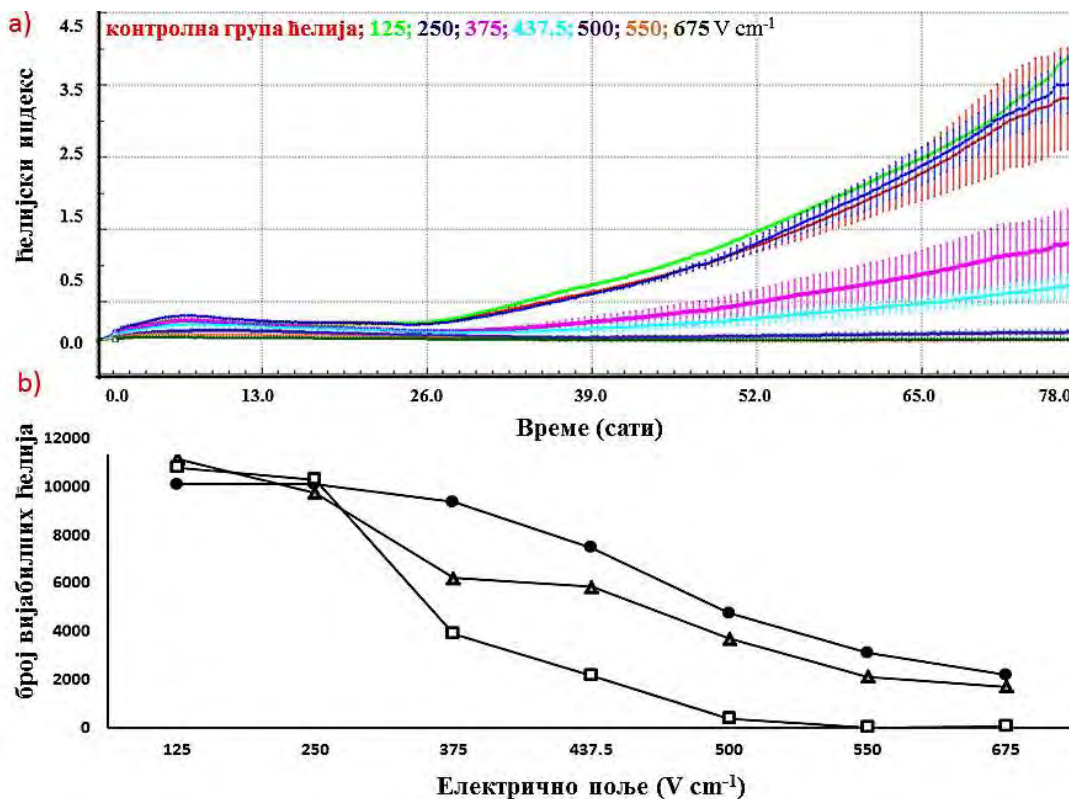


Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE из 3 независна експеримента; ● 6, Δ 24, □ 72 сата од третмана; број  $10^4$  представља контролне, нетретирание ћелије.



Следећа је анализирана ћелијска линија карцинома колона SW-480 након третмана електропорацијом. Уочено је да третмани ниским волтажама ( $125$  и  $250 \text{ V cm}^{-1}$ ) нису имали негативан ефекат на вијабилност ове ћелијске линије, већ напротив, уочена је стимулација пролиферације ових ћелија. Третман јачим електричним пољима ( $375$ - $675 \text{ V cm}^{-1}$ ) доводи до инхибиције ћелијске вијабилности дозно и временски зависно (*Графикон 16а*). Након анализе ефеката примењених волтажа у одређеним временским интервалима  $6$ ,  $24$  и  $72$  сата од третмана (*Графикон 16б*), статистички значајно смањење броја вијабилних ћелија је евидентирано након примене високих напона ( $375$ - $675 \text{ V cm}^{-1}$ ) у односу на контролну групу ћелија ( $10^4$ , нетретиране ћелије). Смањење броја ћелија, односно цитотоксичност третмана је пропорционална повећању напона и протеклом времену ( $IC_{50} = 204.64$ - $124.99 \text{ V cm}^{-1}$ ), што показује добру осетљивост ове канцерогене линије на третман електропорацијом.

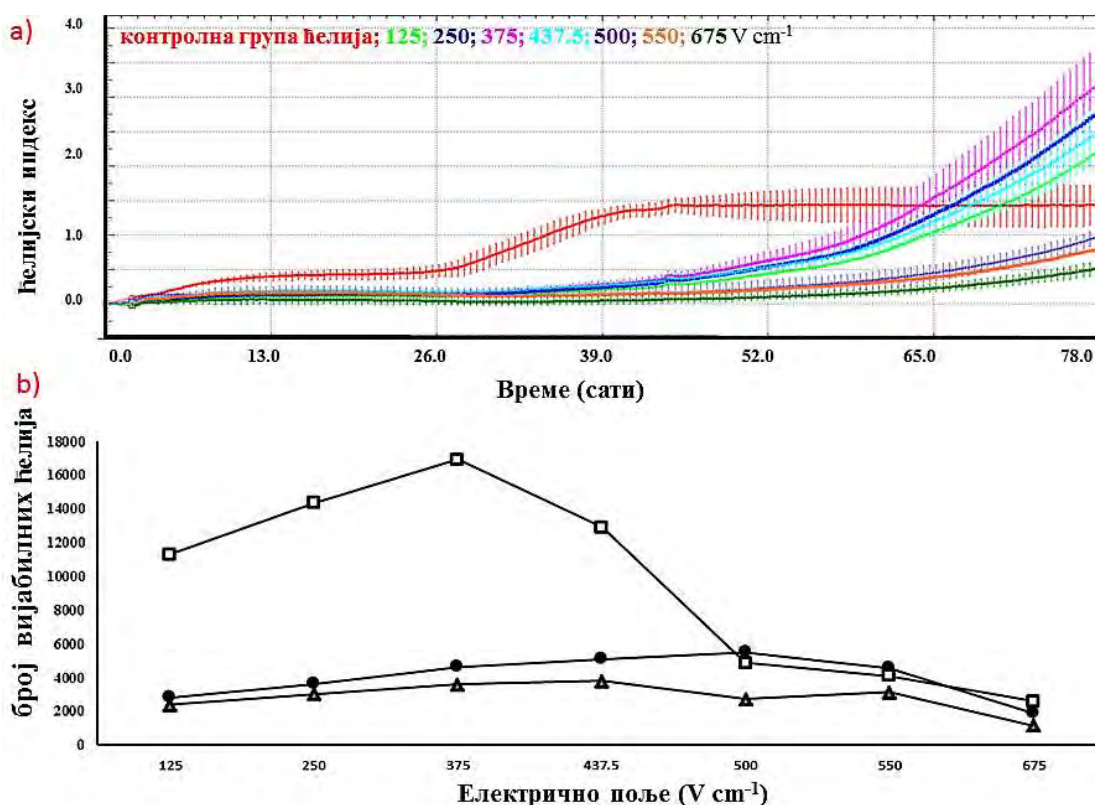
**Графикон 16.** Ефекти електропорације на ћелијској линији карцинома колона SW-480 (а). Анализирање ефеката електропорације након  $6$ ,  $24$  и  $72$  сата (б).



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE из 3 независна експеримента; ●  $6$ , Δ  $24$ , □  $72$  сата од третмана); број  $10^4$  представља контролне, нетретиране ћелије.

Електропорација у целокупном распону испитиваних волтажа значајно смањује вијабилност ћелијске линије карцинома колона НСТ-116 (*Графикон 17а*). Овај ефекат је био привремен, јер након 72 сата од третмана долази до потпуног опоравка ових ћелија ( $IC_{50} = 503.95$ ). Тек након примене напона преко  $500 \text{ V cm}^{-1}$ , смањење броја вијабилних ћелија се примећује и након 72 сата од третмана *Графикон 17б*. Потребно је истаћи највећу осетљивост НСТ-116 ћелија након 24 сата од третмана, када су  $IC_{50}$  вредности мање од најниже примењене волтаже у третману (*Табела 3*).

**Графикон 17.** Ефекти електропорације на ћелијској линији карцинома колона НСТ-116 (а). Анализирање ефеката електропорације након 6, 24 и 72 сата (б).

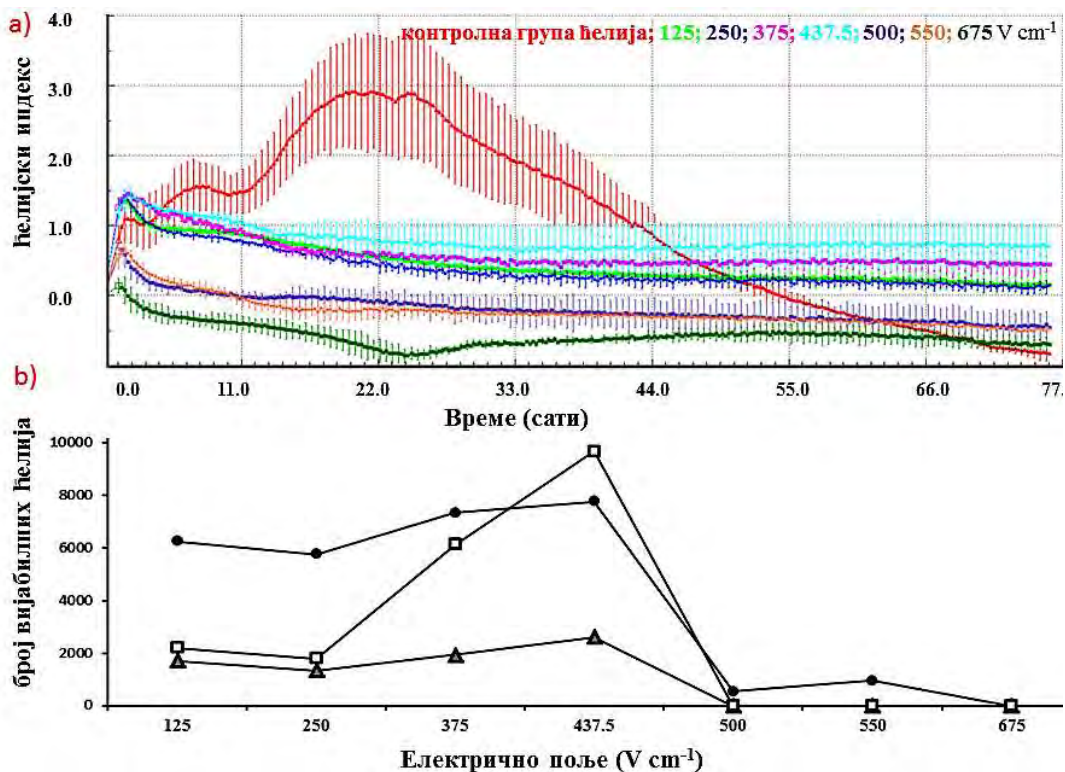


Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE из 3 независна експеримента;  $\bullet$  6,  $\Delta$ 24,  $\square$ 72 сата од третмана; број  $10^4$  представља контролне, нетретиране ћелије.

Ефекат електропорације смо пратили и на здравим ћелијама (хуманим ћелијским линијама фибробластима - MRC-5, примарним мишићним ћелијама аорте - hAoSM, и хуманим ендотелним ћелијама из умбиликалне вене - HUVEC). Резултати након третмана електропорације на MRC-5 ћелијама у реалном времену су представљени на *Графикону 18а*, и показују да су ове ћелије веома осетљиве на третман. Цитотоксични ефекат је посебно изражен код примене

високих напона (преко  $500 \text{ V cm}^{-1}$ ). У распону између  $250$  и  $437.5 \text{ V cm}^{-1}$ , цитотоксичан ефекат је имао акутан карактер, док је након  $72$  сата примећен опоравак ћелија, који ипак не достиже ниво контролних ћелија. Третман напонам од  $125$  до  $500 \text{ V cm}^{-1}$ , је довео до значајног смањења броја вијабилних ћелија, док третман преко  $500 \text{ V cm}^{-1}$  индукује потпуну лизу ћелија (*Графикон 18а* и *б*). Ефекти електропорације су анализирани након  $6$ ,  $24$  и  $72$  сата и представљени на *Графикону 17б*, где се јасније уочава оправак ћелија након  $72$  сата од третмана волтажама  $375$ - $437.5 \text{ V cm}^{-1}$ . Слично као и НСТ-116 канцерогене ћелије, здраве МРС-5 ћелије су значајно осетљиве на испитиване третмане електропорације, посебно након  $24$  сата, када су  $IC_{50}$  вредности мање од најниже примењене волтаже (*Табела 3*).

**Графикон 18.** Ефекти електропорације на здравој ћелијској линији хуманих фибробласта, МРС-5 (а). Анализирање ефеката електропорације након  $6$ ,  $24$  и  $72$  сата (б).

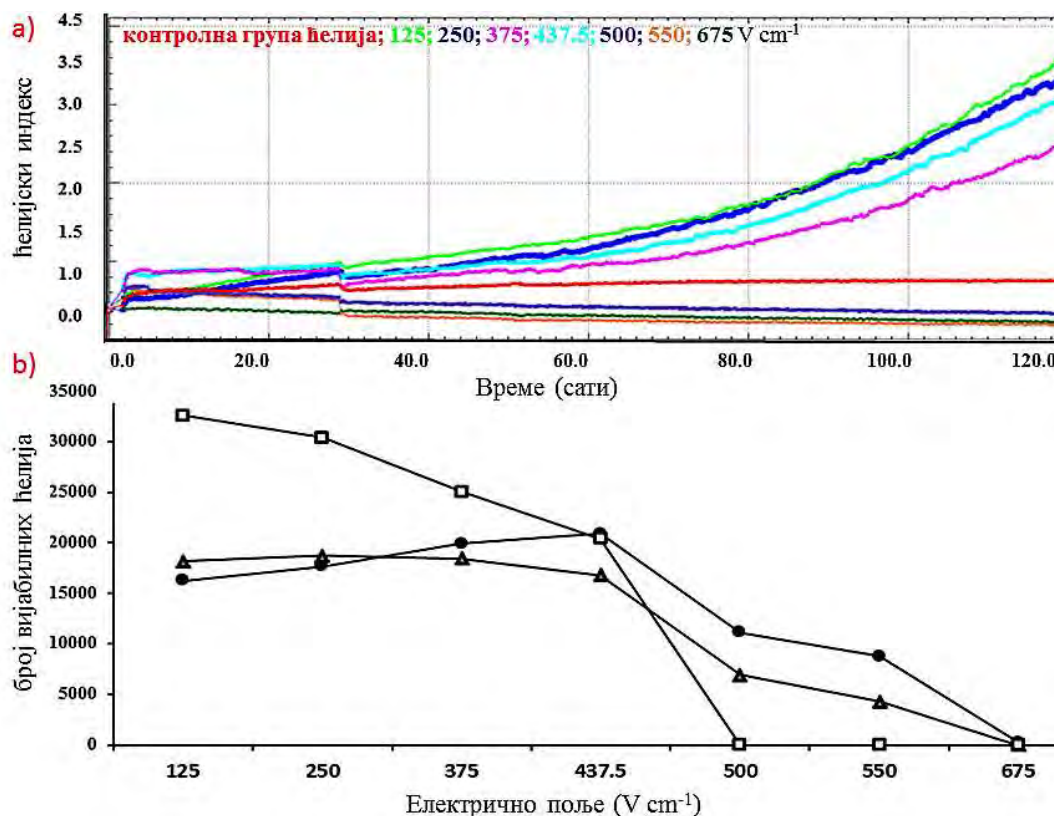


Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE из 3 независна експеримента; •  $\Delta$   $24$ , □  $72$  сата од третмана; број  $10^4$  представља контролне, нетретирание ћелије.

Ефекти електропорације су праћени на здравој ћелијској линији hAoSМ, примарна линија мишићних ћелија аорте, и приказани на *Графикону 19а*. Резултати показују да је електрично поље напона до  $437.5 \text{ V cm}^{-1}$  је имало стимулативно дејство на пролиферацију ових ћелија

пропорционално времену. Напони преко  $500 \text{ V cm}^{-1}$  довели су до потпуне лизе ћелија и може се рећи да је ово иреверзибилни ефекат. Ове промене се јасније уочавају када се ефекти електропорације анализирају након 6, 24 и 72 сата (*Графикон 19б*). У складу са оваквим ефектом, цитотоксичност третмана је значајна већ на волтажама нешто нижим од  $500 \text{ V cm}^{-1}$ , за све временске периоде, што се јасно види на основу  $IC_{50}$  вредности (*Табела 3*).

**Графикон 19.** Ефекти електропорације на здравој ћелијској линији примарних мишићних ћелија аорте, hAoSm (а) Анализирање ефеката електропорације након 6, 24 и 72 сата (б).

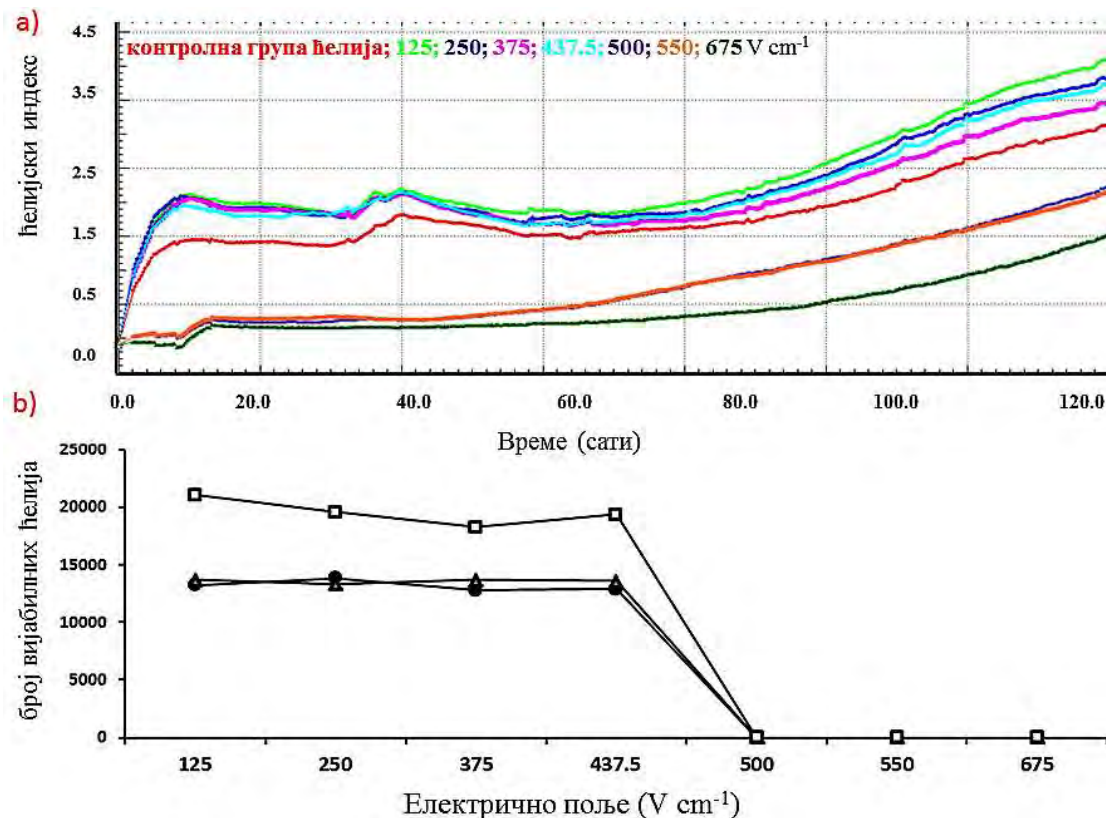


Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE из 3 независна експеримента; • 6,  $\Delta$ 24,  $\square$ 72 сата од третмана; број  $10^4$  представља контролне, нетретмане ћелије.

На крају, ефекте електропорације смо пратили и на примарној ћелијској линији HUVES, а резултати су приказани на *Графикону 20а*. Тестиране волтаже до  $437.5 \text{ V cm}^{-1}$  су показале стимулативни ефекат на пролиферацију ових ћелија, док су напони изнад  $500 \text{ V cm}^{-1}$  индуковали иреверзибилну лизу ћелија (*Графикон 20б*). Процена цитотоксичности на основу  $IC_{50}$  вредности за HUVES ћелије (*Табела 5*), показује да је њихова осетљивост на примењене третмане електропорацијом врло слична сензитивности здравих hAoSM ћелија.



**Графикон 20.** Ефекти електропорације на здравој ћелијској линији хуманих ендотелних ћелија из умбиликалне вене, HUVEC (а). Анализирање ефеката електропорације након 6, 24 и 72 сата (б).



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE из 3 независна експеримента;  $\bullet$ ,  $\Delta$ ,  $\square$  6, 24, 72 сата од третмана; број  $10^4$  представља контролне, нетретирание ћелије.

**Табела 5.** Цитотоксичност третмана електропорацијом -  $IC_{50}$  вредности ( $Vcm^{-1}$ ) за MDA-MB-231, SW-480, HCT-116, MRC-5, hAoSm и HUVEC ћелије након 6, 24 и 72 h.

	$IC_{50}/Vcm^{-1}$					
	MDA-MB-231	SW-480	HCT-116	MRC-5	hAoSMc	HUVEC
6 h	$501.42 \pm 0.21$	$511.60 \pm 0.13$	$486.85 \pm 1.47$	$255.32 \pm 2.13$	$490.1 \pm 1.23$	$569 \pm 1.13$
24 h	$515.62 \pm 0.59$	$423.55 \pm 0.13$	< 125	< 125	$492.6 \pm 1.02$	$550 \pm 0.93$
72 h	$935.65 \pm 1.23$	$312.47 \pm 1.12$	$503.95 \pm 0.41$	$488.25 \pm 1.35$	$498.9 \pm 0.96$	$493.4 \pm 0.99$

Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE из 3 независна експеримента.

### 2.1.2 Флуоресцентна микроскопска анализа ћелијске смрти

У циљу утврђивања типа ћелијске смрти изазване електропорацијом и квантификацијом живих, апоптотских и некротских ћелија карцинома дојке и колона, као и на здравим ћелијама, коришћена је метода АО/ЕВ. Морфолошке промене су представљене као смањени волумен

ћелија, промене у облику, кондензацији хроматина, мембрански „blebbing“ и фрагментисаност нуклеуса (*Табела 6, Слика 22*). Процент живих, апоптотских и некротских ћелија је анализиран након 24 сата од третмана електропорацијом.

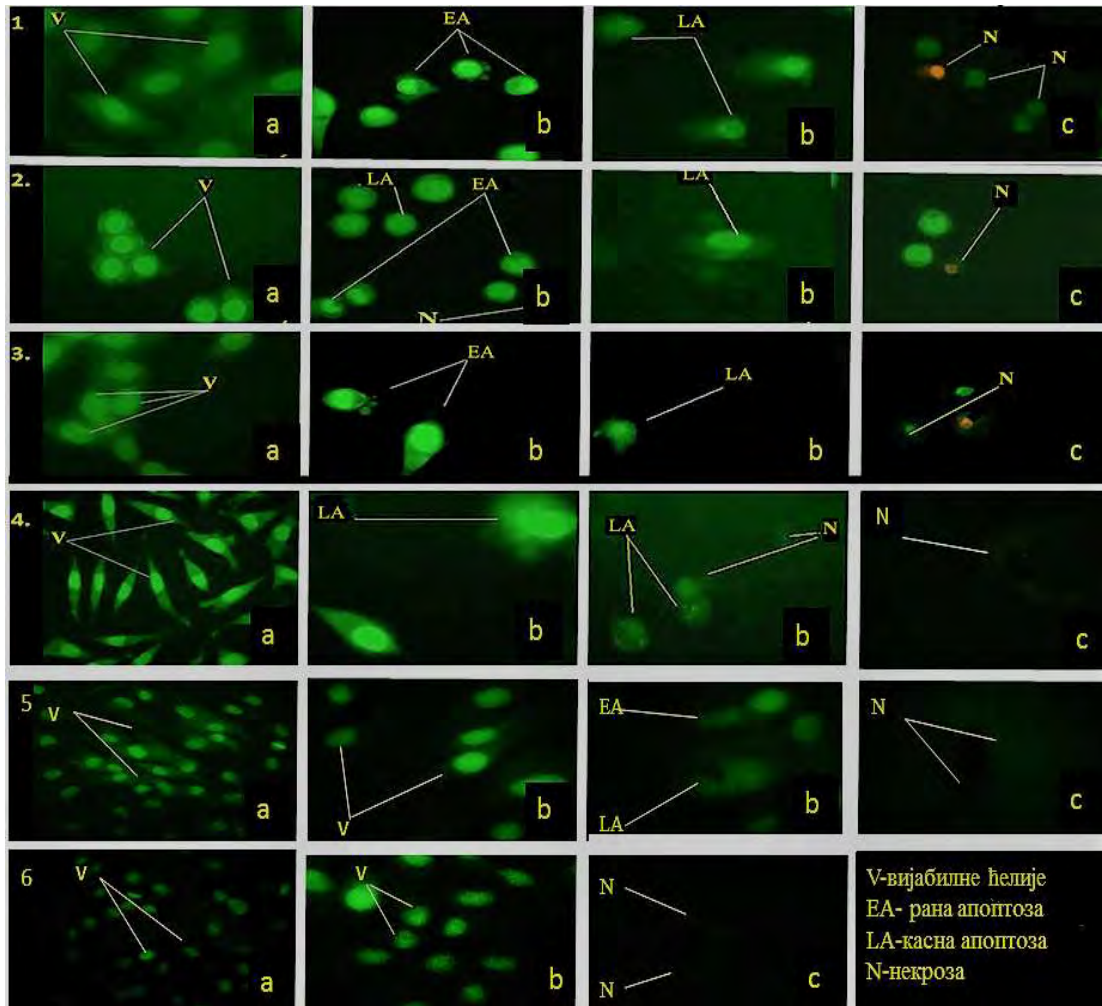
Добијени резултати су показали значајан проценат спонтане апоптозе у контролним (нетретираним) ћелијама карцинома дојке и колона (до 8.57% за MDA-MB-231 ћелије), у односу на здраве MRC-5, hAoSм HUVЕC (0.4, 0.2 и 0.5%). Ово запажање потврђује нестабилност карциномских ћелија на молекуларном нивоу. Резултати су показали да нижа волтажа од 375 V cm<sup>-1</sup> доминантно изазива рану апоптозу (осим за SW-480 ћелије), док је висока волтажа од 675 V cm<sup>-1</sup> повећавала проценат касне апоптозе и некрозе код свих ћелијских линија карцинома. Сензитивност карциномских ћелија у односу на третман електропорацијом је у следећој градацији HCT-116>SW-480>MDA-MB-231. Подаци добијени са флуоресцентне микроскопије су у складу са подацима добијеним са RTCA xCELLigence апарата (*Графикони 15-20*) и IC<sub>50</sub> вредностима (*Табела 5*). Анализа типа ћелијске смрти након електропорације такође потврђује високу осетљивост здравих MRC-5 ћелија (59.01% ћелија у раној апоптози) у поређењу са hAoSм (5% ћелија у раној апоптози) и HUVЕC (8,77% ћелија у раној апоптози) након дејства ниског електричног поља од 375 V cm<sup>-1</sup>. Може се приметити да исти напон на hAoSм и HUVЕC ћелијским линијама не изазива ни касну апоптозу нити некрозу, што указује на стабилност ових ћелија. Међутим, третман високим напоном од 675 V cm<sup>-1</sup> изазива касну апоптозу и некрозу у свим здравим ћелијским линијама, што је у складу са претходно приказаним резултатима за вијабилност ћелија у реалном времену.

**Табела 6.** Квантификација вијабилних, апоптотских и некротских MDA-MB-231, SW-480, HCT-116, MRC-5, hAoSM и HUVEC ћелија мерених АО/ЕВ методом на флуоресцентном микроскопу, 24 сата након електропорације.

Ћелијске линије	$V_{cm^{-1}}$	Вијабилне ћелије %	Рана апоптоза %	Касна апоптоза %	Некроза %
MDA-MB-231	контрола	$91.42 \pm 1.80$	$8.57 \pm 0.26$	0	0
	375	$77.45 \pm 0.23$	$13.17 \pm 0.69$	$8.28 \pm 0.15$	$1.10 \pm 0.01$
	675	$31.0 \pm 0.32$	$25.01 \pm 0.96$	$20.01 \pm 0.98$	$23.00 \pm 0.9$
SW-480	контрола	$91.61 \pm 0.30$	$8.39 \pm 0.56$	0	0
	375	$56.00 \pm 0.53$	$0.17 \pm 0.99$	$38.01 \pm 1.15$	$5.73 \pm 0.01$
	675	$9.82 \pm 0.72$	$30.84 \pm 0.36$	$35.04 \pm 0.12$	$24.30 \pm 0.13$
HCT-116	контрола	$93.42 \pm 0.30$	$6.58 \pm 0.56$	0	0
	375	$28.23 \pm 0.53$	$51.09 \pm 0.99$	$18.02 \pm 1.15$	$2.48 \pm 0.01$
	675	$10.80 \pm 0.72$	$14.25 \pm 0.36$	$55.25 \pm 0.12$	$19.70 \pm 0.13$
MRC-5	контрола	$99.6 \pm 0.26$	$0.4 \pm 0.59$	0	0
	375	$25.00 \pm 0.83$	$59.01 \pm 0.01$	$10.51 \pm 0.01$	$5.48 \pm 0.01$
	675	0	$2.9 \pm 0.58$	$32.84 \pm 0.85$	$63.31 \pm 0.93$
hAoSM	контрола	$99.8 \pm 0.32$	$0.2 \pm 0.59$	0	0
	375	$94.7 \pm 0.32$	$5.0 \pm 0.59$	$0.3 \pm 0.32$	0
	675	0	$0.8 \pm 0.32$	$19.2 \pm 0.32$	$80.0 \pm 0.32$
HUVEC	контрола	$99.42 \pm 1.09$	$0.58 \pm 0.82$	0	0
	375	$91.23 \pm 1.26$	$8.77 \pm 1.82$	0	0
	675	0	$1.9 \pm 0.58$	$32.84 \pm 0.85$	$65.26 \pm 0.57$

Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE из 3 независна експеримента.

**Слика 22.** Типичне морфолошке промене на MDA-MB-231 (1), SW-480 (2), HCT-116 (3), MRC-5 (4), hAoSm (5) и HUVEC (6) ћелијама, добијене флуоресцентним бојењем АО/ЕВ методом на микроскопу, увећање 400×. На слици су приказане репрезентативне слике нетретираних ћелија (a) и добијене након третмана електропорацијом 375 Vcm<sup>-1</sup> (b) и 675 Vcm<sup>-1</sup> (c).



**Напомена:** Нумеричка симулација ефеката електропорације представљена је у *Прилогу 3*.

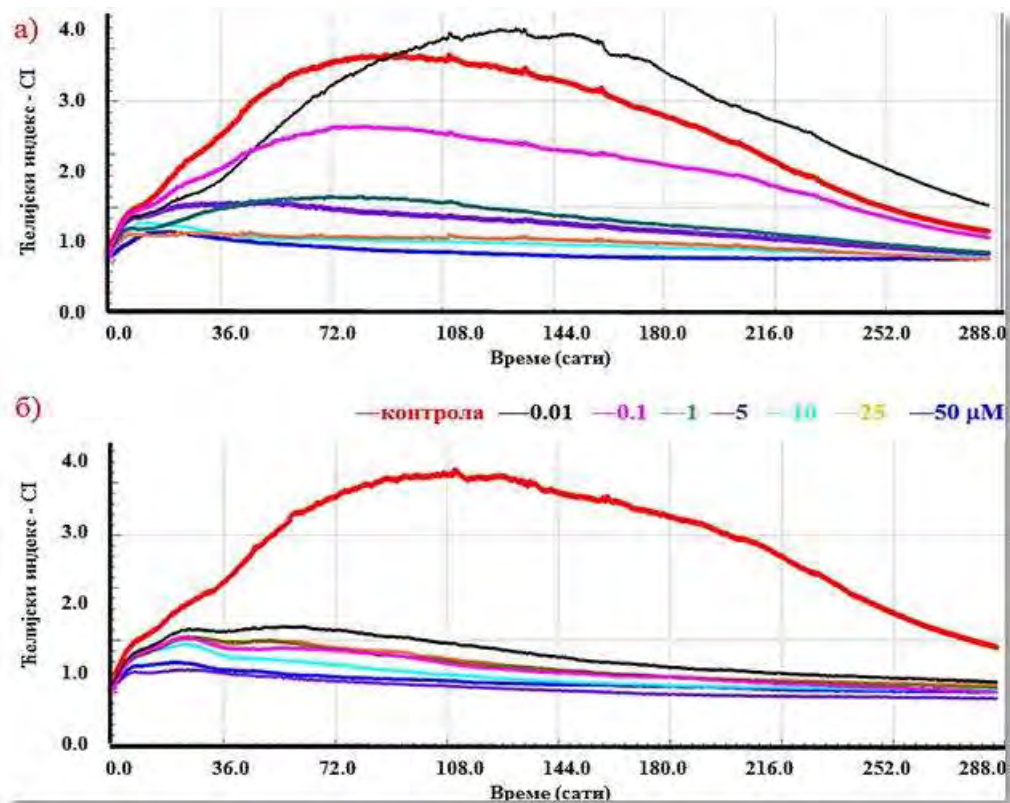


### 2.1.2 Ефекат електрохемиотерапије на ћелијским линијама карцинома дојке

Комбинација реверзибилне електропорације са хемиотерапијом је еволуирала у нову методу која се користи као третман солидних тумора познат под називом електрохемиотерапија. Електрохемиотерапија користи електрично поље да омогући повећану апсорпцију хемиотерапеутских лекова селективно у ћелије тумора. Ово је локални третман електричног поља одређеног напона на ћелијама, а као резултат је повећана пермеабилност плазма мембране. На овај начин, антинеопластични агенс, лакше улази у ћелију. Повећавањем концентрације лека у интрацелуларном простору, повећава се и његово дејство. У третману електрохемиотерапије је коришћен антинеопластични агенс *наклитаксела* (концентрације 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 25 и 50  $\mu\text{M}$ ) у комбинацији са напонам од 150 V ( $375 \text{ V cm}^{-1}$ ). На основу литературних, али и података добијених из претходног експеримента (поглавље 2.1 Цитотоксични ефекти електропорације на здравим и карциномским ћелијским линијама) изабран је напон од 150 V, који на ћелијама не изазива штетан ефекат. У кивети са суспензијом ћелија и одговарајућом концентрацијом *наклитаксела* вршена је електрохемиотерапија тј. аплициран је напон од 150 V, који је тренутно отварао поре на ћелијским мембранама и на тај начин омогућавао леку да уђе у интрацелуларни простор. Након оваквог третмана, ћелије су засађиване у Е-плоче са 16 бунарића и наступило је континуирано праћење ефеката.

На *Графикону 21а* је приказан ефекат третмана електрохемиотерапије на MDA-MB-231 ћелијама карцинома дојке, праћен у реалном времену (*xCELLigence, RTCA technology*). Цитотоксични ефекат *наклитаксела* је временски и дозно завистан код ове ћелијске линије. Што је концентрација лека већа и време третмана дуже, цитотоксични ефекти су израженији у односу на контролне, нетретирание ћелије. На *Графикону 20б* су представљени цитотоксични ефекти електрохемиотерапије, односно комбиновани третман електропорације напона од  $375 \text{ V cm}^{-1}$  и *наклитаксела* у свим испитиваним дозама. Резултати су показали значајан цитотоксични ефекат електрохемиотерапије и при коришћењу најмањих концентрација (0.01  $\mu\text{M}$ ). Цитотоксичност котретмана је значајно повећана у односу на третман само *наклитакселом*, односно  $\text{IC}_{50}$  вредности су ниже у котретману (*Табела 7*).

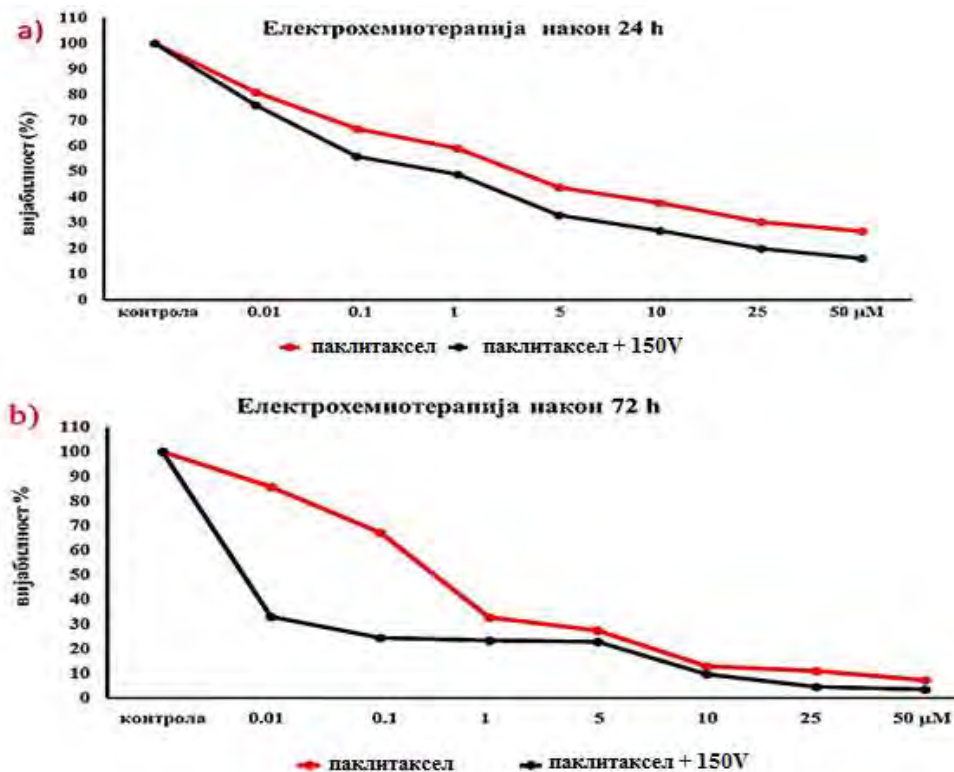
Графикон 21. *Real time* праћење цитотоксичних ефеката паклитаксела (а) и електрохемиотерапије (б) на ћелијској линији карцинома дојке MDA-MB-231.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE из 3 независна експеримента.

На *Графикону 22а* и *б* су представљени ефекти електрохемиотерапије након 24 и 72 сата од третмана. Може се јасније уочити цитотоксичан ефекат паклитаксела када је комбинован са електропорацијом, чак и при апликацији најмањих доза овог цитостатика.

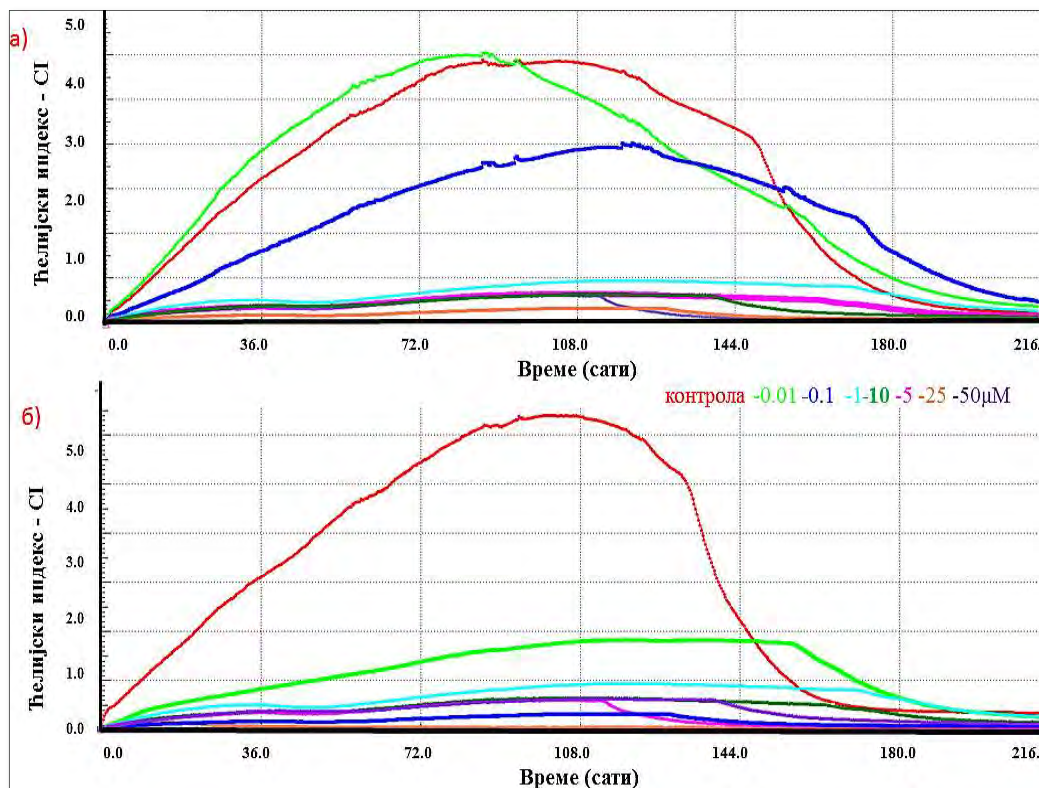
**Графикон 22.** *Real time* праћење цитотоксичних ефеката паклитаксела и комбиноване електрохемиотерапије код MDA-MB-231 ћелијске линије карцинома дојке, након 24 (а) и 72 сата (б) од третмана.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE из 3 независна експеримента.

На **Графикону 23a** је приказан ефекат третмана антинеопластичним леком паклитаксела на MCF-7 ћелијама карцинома дојке у реалном времену. Третман најнижом концентрацијом паклитаксела (0.01  $\mu$ M) није показао цитотоксично дејство у односу на контролне нетретирание ћелије. Све остале концентрације паклитаксела показују цитотоксични ефекат који је временски и дозно зависан код ове ћелијске линије. Што је концентрација лека већа и време третмана дуже, цитотоксични ефекти су израженији. На **Графикону 22б** су представљени цитотоксични ефекти електрохемиотерапије, односно комбиновани третман паклитаксела и електропорације (напон 375 V  $\text{cm}^{-1}$ ). Резултати су показали значајан цитотоксични ефекат електрохемиотерапије и при коришћењу најниже концентрације паклитаксела (0.01  $\mu$ M) у односу на контролне ћелије, што је показано и нижим  $\text{IC}_{50}$  вредностима у котретману (**Табела 7**).

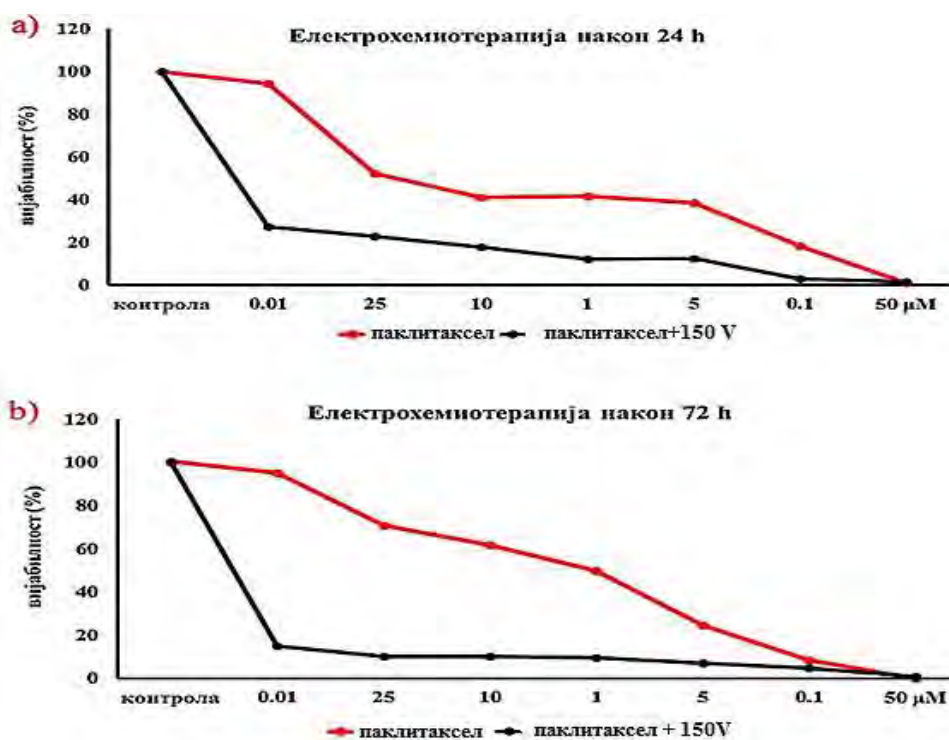
**Графикон 23.** *Real time* праћење цитотоксичних ефеката паклитаксела (а) и електрохемиотерапије (б) код ћелијских линија карцинома дојке MCF-7.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  SE.

На **Графикону 24** су приказани цитотоксични ефекти паклитаксела и електрохемиотерапије код MCF-7 ћелијске линије карцинома дојке, након 24 и 72 сата од третмана. Резултати су показали изразито дозно зависно цитотоксично дејство паклитаксела након 24 сата од третмана у поређењу са нетретираним, контролним ћелијама (а). Овај ефекат се значајно појачава при комбиновању паклитаксела са електропорацијом. Након 72 сата од третмана, уочава се благи опоравак ћелија при коришћењу нижих концентрација појединачног третмана паклитаксела (до 1  $\mu$ M), док више концентрације и даље узрокују цитотоксичност на овим ћелијама. Комбиновани третман паклитаксела и електропорације је показао јако цитотоксично дејство, у свим примењеним концентрацијама, што се може закључити и на основу нижих IC<sub>50</sub> вредности у котретману (**Табела 7**).

**Графикон 24.** *Real time* праћење цитотоксичних ефеката паклитаксела и електрохемиотерапије код MCF-7 ћелијске линије карцинома дојке, након 24 (а) и 72 сата (б) од третмана.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  SE.

**Табела 7.** Цитотоксичност паклитаксела и електрохемиотерапије -  $IC_{50}$  вредности ( $\mu$ M) за MDA-MB-231 и MCF-7 ћелије након 24 и 72 h.

		$IC_{50}$	
MDA-MB-231	24 h	паклитаксел	$2.57 \pm 0.26$
		паклитаксел +150V	$0.39 \pm 1.96$
	72 h	паклитаксел	$0.37 \pm 0.82$
		паклитаксел +150V	$0.02 \pm 0.001$
MCF-7	24 h	паклитаксел	$0.70 \pm 0.26$
		паклитаксел +150V	$0.002 \pm 1.9$
	72 h	паклитаксел	$0.92 \pm 0.82$
		паклитаксел +150V	$0.05 \pm 0.001$

Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE из 3 независна експеримента.

## 2.2 Ефекти екстракта биљака на параметре неоангиогенезе у ћелијским линијама MRC-5 и MDA-MB-231

У циљу проналажења нових видова терапије карцинома дојке, испитивали смо антиинвазивно дејство *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* на здравој (MRC-5) и карциномској (MDA-MB-231) ћелијској линији као антинеопластични третман.

Експресија иРНК  $\beta$ -actin-а као *housekeeping* гена је стабилно и подједнако експримирана у обе ћелијске линије, и у свим узорцима. Из ових разлога  $\beta$ -actin је погодан за одређивање релативне експресије других гена. Релативна експресија иРНК за *MMP-9*, *CXCL-12*, *VEGF-A*, *HIF-1 $\alpha$*  и *iNOS* гене у здравим MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама карцинома дојке је приказана у **Табели 8**. Резултати показују да је MDA-MB-231 ћелије експримирају гене укључене у процесе метастазе, миграције и инвазије, у односу на здраве MRC-5 ћелије, код које су ови гени супримирани, изузев иРНК за *iNOS* ген. Будући да су MDA-MB-231 ћелије изоловане из плеуре плућа, тј представљају метастатске депозите примарног карцинома дојке, овакав резултат сугерише да је ова ћелијска линија добар модел систем за испитивања антиинвазивних биоактивних супстанци, односно у испитивањима инхибиције метастазирања карцинома. Такође, на основу експресије гена за параметре неоангиогенезе, MRC-5 ћелијска линија представља добру контролну ћелијску линију у метастатским сигналним путевима.

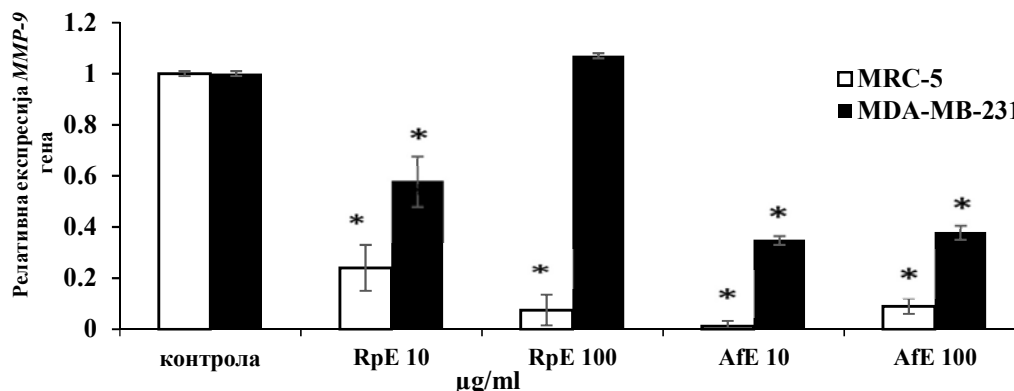
**Табела 8.** Релативна експресија иРНК за *MMP-9*, *VEGF-A*, *HIF-1 $\alpha$* , *CXCL-12* и *iNOS* гене у нетретираним, контролним MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама

Контролне ћелије	$\beta$ -actin	<i>MMP-9</i>	<i>VEGF-A</i>	<i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	<i>CXCL-12</i>	<i>iNOS</i>
MRC-5	1	0.05	0.03	0.01	0.06	1.6
MDA-MB-231	1	2.28	2.23	4.11	6.23	1.04

На **Графикону 25** су представљене вредности експресије иРНК *MMP-9* гена у здравим MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама карцинома дојке, након 24 сата од третмана екстрактима *R. pseudoacacia* (*RpE*) и *A. fruticosa* (*AfE*) у односу на контролне нетретиране ћелије. Испитивани третмани доводе до статистички значајне инхибиције експресије иРНК *MMP-9* гена код обе ћелијске линије у односу на контролне ћелије. Изузетак је третман *RpE* 100  $\mu$ g/ml који код MDA-MB-231 не изазива овакве промене. Треба поменути да *AfE* у концентрацији 10  $\mu$ g/ml скоро у

потпуности супримира експресију *MMP-9* гена код здравих MRC-5 ћелија. Промене су израженије у здоровој ћелијској линији, а јаче ефекте испољава *AfE*.

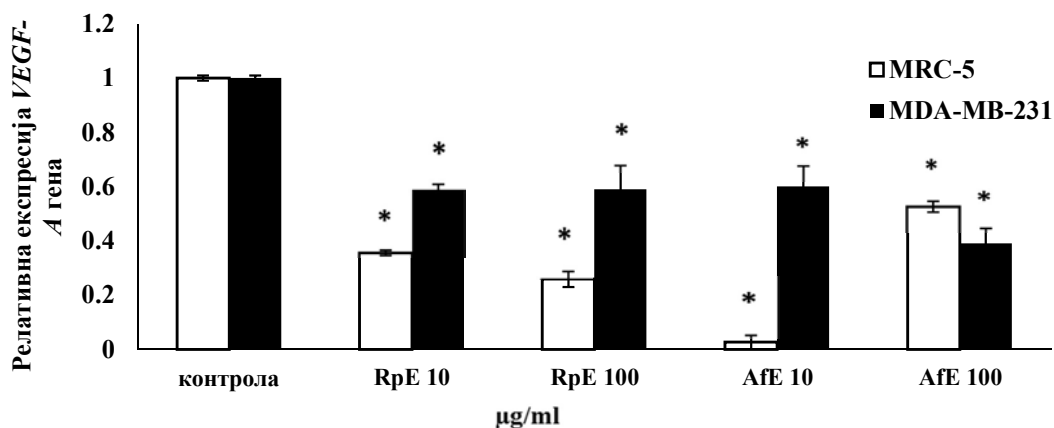
**Графикон 25.** Ефекти екстраката биљака *R. pseudoacacia* и *A. fruticosa* на експресију иРНК *MMP-9* гена у MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 сата од третмана.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за два независна експеримента; \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика у односу на контролу;  $\beta$ -actin је референтни ген за нормализацију генске експресије ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

На **Графикону 26** је представљена експресија иРНК *VEGF-A* гена код MRC-5 и MDA-MB-231 ћелија након третмана *RpE* и *AfE*. Сви третмани изазивају статистички значајно смањење експресије иРНК *VEGF-A* гена у обе испитиване ћелијске линије. Код MRC-5 здравих ћелија може се приметити готово потпуна супресија овог гена након третмана *AfE* (10 µg/ml). Промене су израженије у здоровој ћелијској линији у присуству *RpE*.

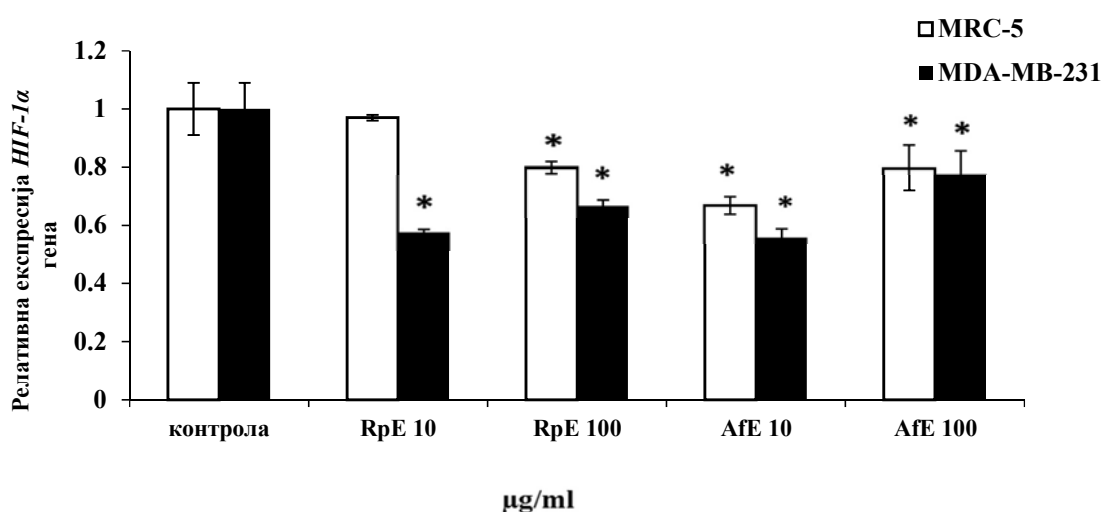
**Графикон 26.** Ефекти екстраката биљака *R. pseudoacacia* и *A. fruticosa* на генску експресију иРНК *VEGF-A* гена у MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 сата од третмана.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за два независна експеримента; \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика у односу на контролу;  $\beta$ -actin је референтни ген за нормализацију генске експресије ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

На **Графикону 27** је представљена генска експресија *HIF-1 $\alpha$*  гена код MRC-5 и MDA-MB-231 ћелија након третмана *RpE* и *AfE*. Изузев третмана *RpE* 10  $\mu\text{g/ml}$ , који код здраве ћелијске линије не изазива промене у експресији *HIF-1 $\alpha$*  гена у поређењу са контролним ћелијама, остали третмани код обе ћелијске линије смањују експресију испитиваног гена. Промене у експресији овог гена су израженије у MDA-MB-231 ћелијској линији.

**Графикон 27.** Ефекти екстраката биљака *R. pseudoacacia* и *A. fruticosa* на експресију *HIF-1 $\alpha$*  гена у MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 сата од третмана.

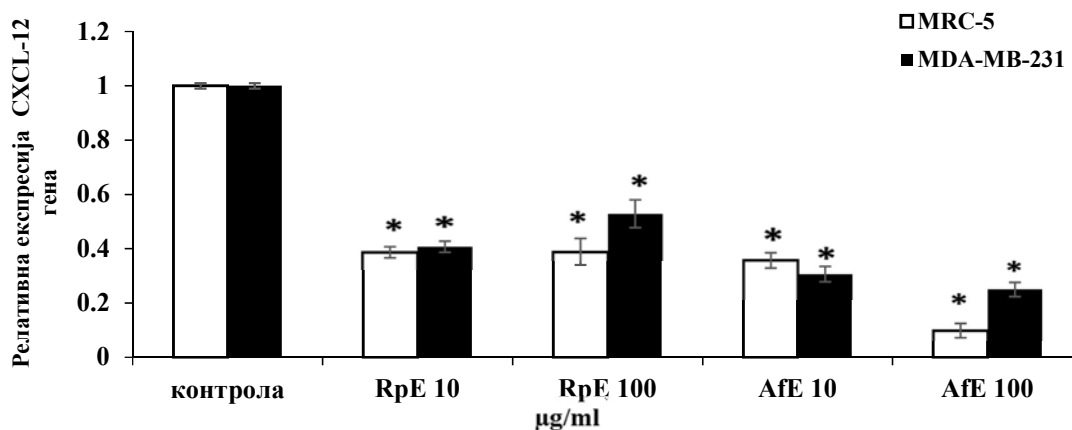


Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за два независна експеримента; \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика у односу на контролу;  $\beta$ -actin је референтни ген за нормализацију генске експресије ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

На **Графикону 28** је представљена генска експресија иРНК *CXCL-12* гена код MRC-5 и MDA-MB-231 ћелија након третмана *RpE* и *AfE*. Код обе ћелијске линије, испитивани параметар инвазивности је значајно супримиран након третмана. Јаче ефекте на супресију овог гена испољава *AfE*.



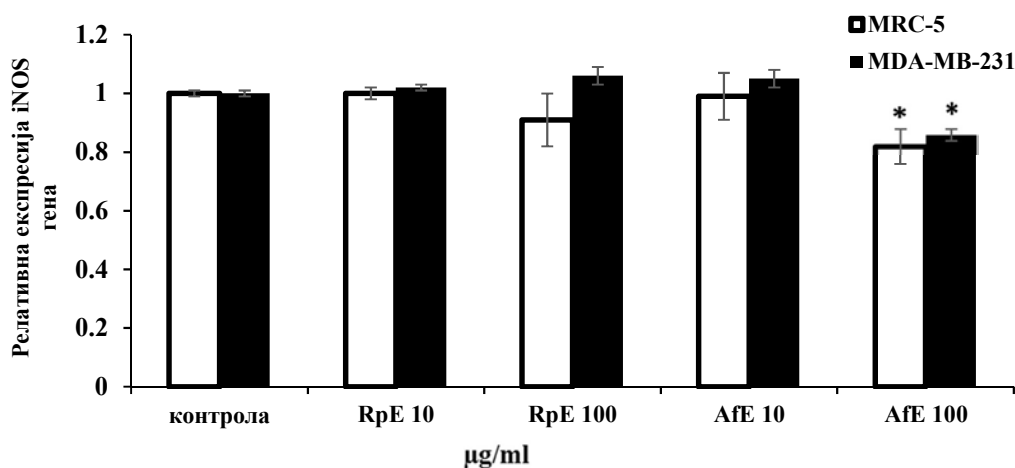
**Графикон 28.** Ефекти екстраката биљака *R. pseudoacacia* и *A. fruticosa* на експресију иРНК *CXCL-12* гена у MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 сата од третмана.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за два независна експеримента; \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика у односу на контролу;  $\beta$ -actin је референтни ген за нормализацију генске експресије ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

Релативна експресија иРНК *iNOS* гена у MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама није статистички значајно промењена у односу на контролне ћелије, осим у третману *AfE* у концентрацији 100  $\mu\text{g/ml}$  који статистички значајно инхибира експресију овог гена (**Графикон 29**).

**Графикон 29.** Анти-инвазивна активност екстраката биљака *R. pseudoacacia* и *A. fruticosa* на експресију иРНК *iNOS* гена у MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 сата од третмана.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за два независна експеримента; \* $p < 0.05$  статистички значајна разлика у односу на контролу;  $\beta$ -actin је референтни ген за нормализацију генске експресије ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

### 3 *Data-mining*

Појам вештачке интелигенције подразумева област биоинформатике, чији је циљ креирање софтвера који су у стању да се понашају „интелигентно“, тј да „уче“. Зато се ови системи не програмирају, већ се тренирају, односно уче се да на основу претходног искуства доносе одлуке. Истраживач на основу већ добро дефинисаних проблема, са познатим резултатима, обучава систем за најпрецизнију могућу предикцију, тако да софтвер тек након одређеног тренинга постаје спреман за употребу. Наравно, логично је да немају сви испитивани параметри исту вредност, тако да се врши претпроцесирање свих параметара, опет помоћу одређених софтвера, у циљу избора оних параметара који за испитивану проблематику имају највећи значај. *Artificial neural networks (ANNs)* је инспирисан радом људског мозга, тј његовом неуронском архитектуром. Сваки од посматраних параметара који је аналог неурона реагује са околним неуронима, тј. параметрима и даје своје излазе-закључке, који се преносе на наредни слој неурона и на тај начин се формира коначна предикција. Сваки од неурона има локалну меморију у којој памти податке које обрађује. Овај алгоритам је добар за случајеве када се обрађује велики број података за које нисмо сигурни на који начин интерреагују и колики је утицај једних на друге, тако да се могу открити неке везе између параметара које нису лако уочљиве.

У нашој студији сви добијени резултати, анамнестички, клинички, *imaging*, патохистолошки и молекуларни параметри генске и протеинске експресије ангиогенезе су обрађени помоћу модерних информационих технологија и софтвера (*data-mining*) за предвиђање исхода болести, што може резултирати бројним сугестијама у избору одговарајућег терапијског модалитета специфичног за сваког појединачног пацијента.

Спровели смо две врсте испитивања. Прво испитивање **(а)** се односило на употребу параметара који представљају стандардни скуп информација којима ординирајући лекар располаже након хируршке интервенције и патохистолошке обраде препарата и састоји се анамнестичких, дијагностичких и патохистолошких података који престављају рутински процес лечења. База се састојала од 146 пацијената, а испитивани параметри су били 5-огодишњи период преживљавања и појава рецидива. Друга база података се састојала од 50 пацијената код којих су поред рутинских анализа урађене и неке које нису део стандарне дијагностичке процедуре **(б)**. Конкретно, на све параметре који су испитивани у првој групи пацијената додати су специфични параметри неоангиогенезе, инвазивности и метастазирања у КТ и ПТ ткиву (генска експресија

*CXCL-12*, *HIF-1 $\alpha$* , *VEGF-A*, *iNOS* и концентрација MMP-9). Испитивани параметар који је праћен била је појава метастаза.

### 3.1 Прогноза преживљавања

Пожељно је да се испита више *Machine Learning* система док се не открије који даје најтачнију прогнозу исхода болести. На самом почетку је испитана могућност класификације без претходне селекције испитиваних параметара. Шест различитих класификационих модела је развијено и испитано за процену 5-огодишњег преживљавања (ANN, SVM, LR, k-NN, DT и NB). Особине класификационих модела су: 1) Тачност (*Accuracy-AC*) представља пропорцију укупног броја предвиђања која су била тачна; 2) Сензитивност (*Sensitivity-SENS*) је дефинисана као пропорција позитивних налаза који су исправно класификовани. Представља способност да се исправно детектује појединачни пацијент који поседује особину од интереса; 3) Специфичност (*Specificity*) је мера тачности теста у односу на лажно позитивне резултате. У **Табели 9** је представљена класификациона тачност сваког модела, заједно са оптималним параметрима.

**Табела 9.** Резултати тестирања класификационих модела за проблем преживљавања коришћењем читавог сета података.

Класификатори	ANN	SVM	LR	k-NN	DT	NB
Тачност	0.842	0.815	0.788	0.829	0.829	0.801
Сензитивност	0.622	0.541	0.595	0.351	0.459	0.649
Специфичност	0.917	0.908	0.853	0.991	0.954	0.853
AUC	0.849	0.724	0.777	0.756	0.636	0.831

Коришћен је класификациони алгоритам са комбинацијом неколико параметара.

**1. ANN:**

- number of neurons: 20, 30, 40
- momentum: 0.2, 0.3, 0.8
- learning rate: 0.1, 0.3

**2. SVM:**

- kernel: polynomial, RBF

**3. kNN:**

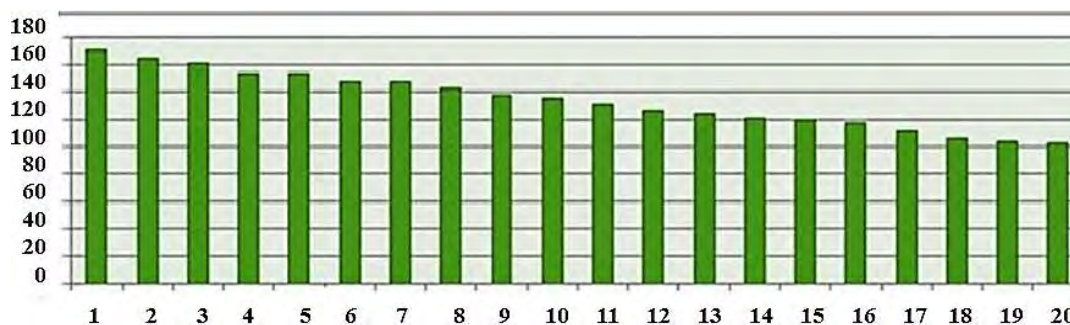
- k = 5, k=10

Модел заснован на ANN алгоритму је показао највећу тачност (0.842). Ипак, сензитивност овог модела је била 0.622 што представља ниску вредност. Генерално, ни један од

модела није показао добре резултате када је у питању сензитивност. Зато је експеримент поновљен уз претходну селекцију и обраду параметара о пацијентима од којих се састојала база података.

Алгоритми који су коришћени за трансформацију базе података и селекцију параметара су били следећи, mRMR, ReliefF и Information Gain, тако да смо према једначини 1 (*Прилог 2*) издвојили 20 параметара: метастазе, ангиоинвазија, рецептори за HER-2, итд. Њихов утицај (према једначини 1, *Прилог 2*) је описан на *Графикону 30*.

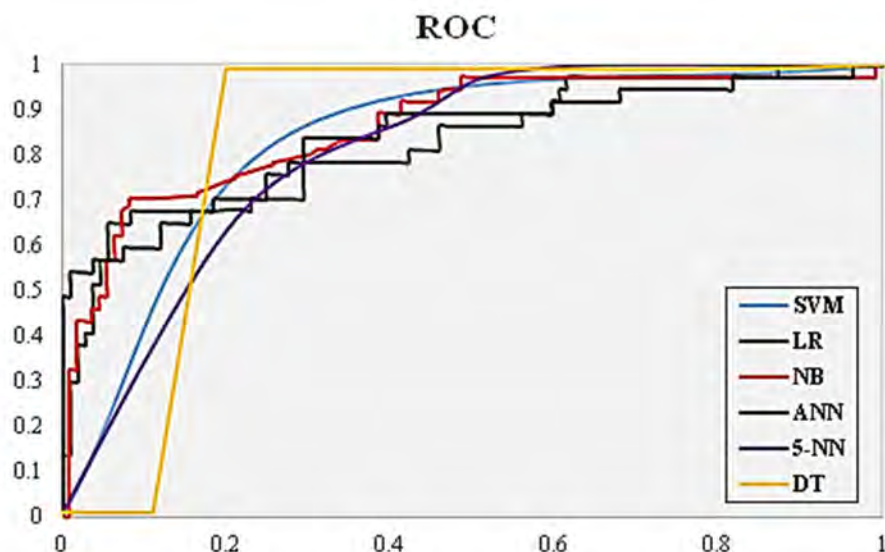
**Графикон 30.** Двадесет одабраних параметара који су имали највећи утицај на исход болести.



1) метастаза, 2) ангиоинвазија, 3) рецептори за HER-2, 4) *Nottingham* прогностички индекс (NPI), 5) лимфни нодуси 6) рецептори за естроген, 7) хистолошки подтип, 8) митотски индекс, 9) хистолошки тип, 10) стадијум болести, 11) рецептори за прогестерон, 12) придружене болести, 13) перинеурална инвазија, 14) билатерални тумор, 15) други циклус хормонске терапије, 16) број захваћених лимфних нодуса, 17) дојење 18) други циклус хемиотерапије, 19) хемиотерапија, 20) величина тумора.

Када је коришћен редуковани сет података како је претходно наведено, *Naive Bayes* и *Support Vector Machine* алгоритми су показали побољшање по питању сензитивности и AUC параметара. Уопштено, најбољи резултати су постигнути коришћењем *Naive Bayes* алгоритма – AC = 0.856, SENS = 0.731, SPEC = 0.918, AUC = 0.873. ROC крива тестираних алгоритама је приказана на *Графикону 31*.

**Графикон 31.** ROC крива за коришћење класификационих алгоритама обрадом редукованог сета параметара



Support Vector Machine (SVM), Logistic Regression (LR), Naive Bayes (NB), Artificial Neural Network (ANN), k-nearest neighbours (k-NN), Decision Tree (DT).

### 3.2 Предикција рецидива и метастазе карцинома дојке

У следећој анализи података, пацијенти су класификовани у групе са високим и ниским ризиком када је у питању вероватноћа појаве рецидива (*Табела 10*).

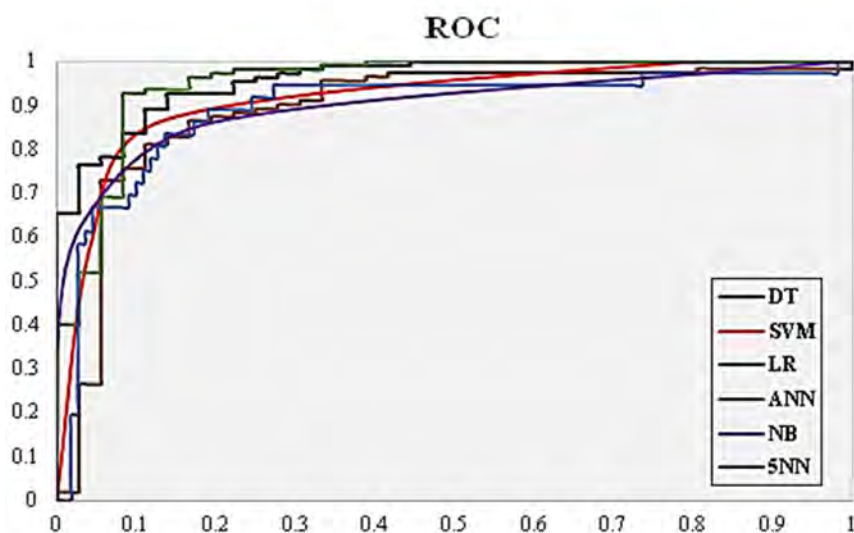
**Табела 10.** Резултати тестирања класификационих алгоритама када је у питању рецидив болести.

Класификатор	ANN	SVM	LR	k-NN	DT	NB
Тачност	0.932	0.952	0.911	0.836	0.966	0.856
Сензитивност	0.964	0.982	0.964	0.98	0.991	0.891
Специфичност	0.833	0.861	0.75	0.333	0.889	0.75
AUC	0.952	0.921	0.96	0.885	0.833	0.891

*Decision Tree* (DT) алгоритам је показао најбоље особине по питању класификације када се узму у обзир следећи параметри: AC = 0.9657, SENS = 0.991 и SPEC = 0.889. Ипак, на бази

AUC као параметра који показује колико добро класификациони алгоритам може да издвоји позитивне и негативне примере изабрали смо ANN класификациони алгоритам и закључили да су резултати охрабрујући (AC = 0.9315, SENS = 0.964, SPEC = 0.833, AUC = 0.952). ROC крива тестираних класификационих алгоритама је представљена на **Графоку 32**.

**Графикон 32.** ROC крива класификационог алгорита за предикцију појаве рецидива карцинома дојке.



Support Vector Machine (SVM), Logistic Regression (LR), Naive Bayes (NB), Artificial Neural Network (ANN), k-nearest neighbours (k-NN), Decision Tree (DT).

### 3.3 Предикција метастаза карцинома дојке

Испитивање смо унапредили увођењем нових параметара, који нису део рутинске обраде пацијената. Наиме, нови *input* подаци су били маркери неоангиогенезе, инвазивности и метастазирања (експресија *VEGF-A*, *HIF-1 $\alpha$* , *CXCL-12*, *iNOS* гена и концентрација MMP-9), одабрани и одрађени у оквиру дисертације на основу претрага доступних база података као најважнији у наведеним процесима туморогенезе. Испитивање је спроведено аналогно претходно описаном, али са нешто другачијим обрађеним сетом података. Наведени параметри су испитивани како у КТ, тако и у ПТ ткиву, што је до сада веома мало описано у литератури. Посебну новину представља начин обраде ових, иначе недовољно проучених параметара употребом модерних софтверских решења, *data mining* система.

Дефинисано је неколико проблема истраживања:

- Развити интелигентни модел за предикцију метастазе на основу измерених параметара ангиогенезе у тумору (КТ) и перитуморском ткиву (ПТ)
- Развити интелигентни модел за предикцију метастазе на основу односа (количника) измерених одговарајућих параметара ангиогенезе у КТ и ПТ
- Развити интелигентни модел за предикцију метастазе на основу клиничких и поменутих хистолошких параметара.

**Претпроцесирање.** С обзиром да је база садржала нумеричке и описне атрибуте, нумерички атрибути су дискретизовани тако што је опсег измерених вредности подељен на 10 мањих дисјунктних опсега на основу исте или сличне фреквенције појављивања вредности. Сваки подинтервал се третира као дискретна вредност атрибута.

**Атрибути** су селектовани применом MRMR алгоритма (*Minimum redundancy maximum relevance*) који се заснива на максимизацији релевантности атрибута према класи са једне стране и минимизацији редувантности међу атрибутима са друге стране.

На организационом **Графикону 32** су предствљени најбоље ранжирани атрибути за које су постигнуте најбоље перформансе.

**Графикон 33.** Најбоље ранжирани атрибути у предикцији метастаза код пацијената са карциномом дојке.



За обучавање модела коришћени су репрезентативни алгоритми за надгледано учење:

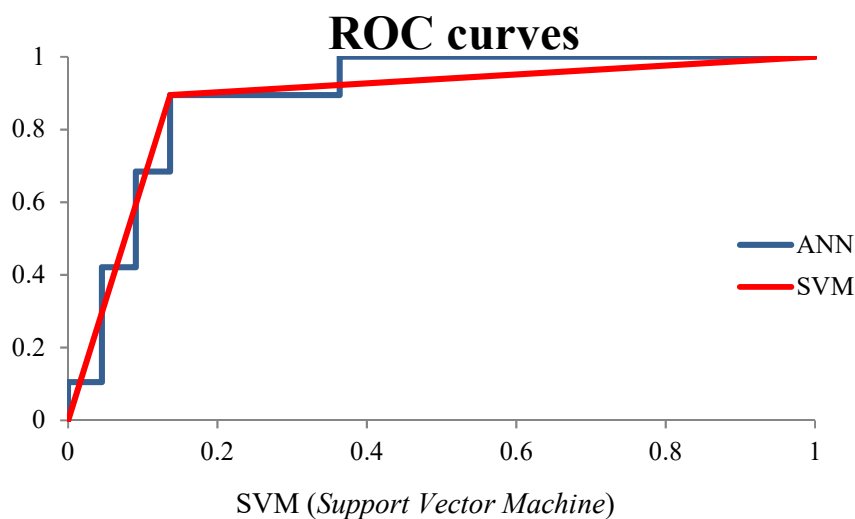
- *Naive Bayes* класификатор (NB)
- Логистичка регресија (*Logistic Regression* - LR)
- К- најближих суседа (*K-nearest neighbours* - K-NN)
- Дрво одлучивања (*Decision Tree* – DT)
- Случајна шума (*Random forest* - RF)
- Метод потпорних вектора (*Support Vector Machine* - SVM)
- Вештачка неуронска мрежа (*Artificial Neural Network* – ANN)

Предложен класификатор који је показао најбоље резултате је приказан у **Табели 11** и на **Графикону 33**.

**Табела 11.** Предложен класификатор је SVM (*Support Vector Machine*) алгоритмом.

Алгоритам	Тачност	Сензитивност	Специфичност	AUC
ANN	0.854	0.818	0.895	0.895
<b>SVM</b>	<b>0.878</b>	<b>0.864</b>	<b>0.895</b>	<b>0.879</b>

**Графикон 34.** ROC крива класификационог алгоритма за предикцију појаве метастаза код пацијената са карциномом дојке.





## V ДИСКУСИЈА

Карцином дојке је малигна болест од које жене у нашој земљи и даље најчешће обољевају и умиру, иако је карцином дојке потпуно излечив кад се открије у раном стадијуму. Самопрегледи, редовни прегледи у домовима здравља, и организовани скрининг прегледи, спасавају живот. Карцином дојке је системска болест, која се често развија подмукло у форми безболног тумора и без субјективних тегоба (Pešić и сар., 2007). Светска здравствена организација је проценила да ће у овом веку свака 8. жена на планети оболети од ове болести. Број новооболелих је у сталном порасту, у свету се повећава за 1-2% годишње, док је код нас тај број је скочио за 10% у односу на 2003. Нажалост, не смемо занемарити чињеницу да се у тренутку постављања дијагнозе само код трећине жена у Србији ради о болести у раном стадијуму, а да готово две трећине жена има регионално проширену болест или регионалне метастазе, што има катастрофалне последице. Свакако ови подаци указују на смањену шансу за њихово излечење, стога је проценат смртности од ове болести у Србији веома висок (18%) (Miljuš и сар., 2014).

Стандардни видови терапије карцинома дојке подразумевају хируршки третман, радиотерапију и хемиотерапију (адјувантна и неoadјувантна), хормонску и биолошку терапију. Упркос оствареном напретку у дијагностици и лечењу, очигледан је висок морбидитет и морталитет од карцинома дојке, тако да су неопходни нови приступи у лечењу ове болести. Чињеница је да су данашњи онколошки протоколи превише крути и апроксимативни и донекле занемарују особености пацијента и биологију тумора сваког пацијента. Сходно томе, циљ коме тежи модерна онкологија је индивидуализација терапије, што је и основна премиса ове дисертације. У том циљу праћени су молекуларни параметри неоангиогенезе у ткиву карцинома дојки, као један од механизма који је круцијалан у процесу појаве и развоја тумора. Добијени резултати, као потенцијални тумор маркери су обрађени помоћу модерних информационих технологија за предвиђање исхода болести, што може резултирати новим протоколима лечења који могу бити специфични за сваког појединачног пацијента.

Отуда и не чуди идеја о употреби нових или већ постојећих информационих технологија као прогностичких калкулатора, који би могли имати важну улогу у предвиђању појаве рецидива и метастаза болести, као и претпостављеног периода преживљавања за сваког појединачног пацијента.

Осим тога, конвенционални видови онколошке терапије имају бројна и тешка нежељена дејства, те је врло битно посветити пажњу новим модалитетима антитуморске терапије, који могу имати подједнаку ефикасност, а знатно мање нежељених дејстава, као што су употреба електропорације, електрохемиотерапије и примена фитотерапије.

### **Молекуларни параметри неоангиогенезе у ткиву карцинома дојки**

Неоангиогенеза, формирање нових крвних судова из претходно постојећих крвних судова, игра кључну улогу у настанку и развоју тумора. У туморима ниске диференцијације васкуларна мрежа не може да испрати бујање малигног ткива и раст тумора који је превише интензиван. Услед рапидног смањења  $pO_2$ , недостатка нутријената и других фактора у тумору се иницира „*angiogenic switch*“, након чега се ослобађају бројни фактори који индукују „клијање“ и хемотаксију, односно кретање ендотелних ћелија према туморској маси (Folkman и сар., 2007). У хипоксичним условима долази до стабилизације *HIF-1 $\alpha$* , који даље активира експресију вишеструких гена који доприносе процесу ангиогенезе. Повећање експресије *VEGF* доводи до повећања васкуларне пермеабилности, док фибробластни фактор раста омогућава раст ендотелних ћелија. *HIF-1 $\alpha$*  заједно са *VEGF* индукује повећање експресије матрикс металопротеиназа (посебно *MMP-9*) које разграђују екстрацелуларни матрикс и олакшавају миграцију ендотелних ћелија и отпуштање фактора раста (van Hinsbergh и Koolwijk, 2008). Фактори који се ослобађају у микроокружењу тумора активирају тумор-асоциране макрофаге, који касније производе ангиогене факторе, попут *VEGF* и *MMP* и додатно потпомажу процес ангиогенезе (Guo и сар., 2013). Стромални фибробласти смештени у туморском ткиву, под утицајем *VEGF* продукују *CXCL-12*, који се везује за *CXCR-4*, рецепторе на туморским ћелијама, што иницира формирање нових крвних судова и мобилизацију проангиогених ћелија из коштане сржи (Zheng и сар., 2007; Chavakis и сар., 2008). На тај начин се стварају услови за неоангиогенезу, инвазију и дисеминацију малигнух ћелија у друге органе, али се превазилази и баријера за нутријентима и другим неопходним факторима за раст и развој малигнух ћелија (Sakurai и Kudo, 2011; Senger и Davis, 2011). Стога терапија која има анти-инвазивне, анти-ангиогене, анти-метастатске ефекте има огроман значај у лечењу пацијената са карциномом.

### Концентрација MMP-9

Туморске ћелије секретују металопротеиназе у латентној форми, као зимогене (proMMP). Протеолитичка активација зимогена се одиграва у екстраћелијском простору, преко плазмина и урокиназа плазминоген активатора (uPA) или преко других чланова MMP фамилије (Newby, 2005). Термин „ангиогени прекидач“, одређен поремећајем равнотеже између про- и анти-ангиогенетских фактора, под утицајем два протеолитичка система, uPA и MMP, мења дормантно стање ћелија и покреће инвазивни раст тумора. MMP-9 је неопходна за тзв. „ангиогенезни прекидач“ и њена повећана концентрација може бити предиктивна за прелаз не-ангиогеног, микроскопског, дормантног тумора у ангиогени и инвазивни облик (Polyak и Hahn, 2006).

Сматра се да је хируршка интервенција коректно одрађена у онколошком смислу уколико се ради о тзв. R0 ресекцији. R0 ресекција подразумева да су маргине препарата „чисте“ макроскопски и микроскопски, што би подразумевало одстрањење тумора у целости, тј. нема резидуалних малигнућ ћелија у перитуморском ткиву, што јесте идеал коме се тежи приликом извођења хируршке интервенције. На тај начин хируршка интервенција добија епитет „радикалне“ операције, која има за циљ излечење пацијента, било самостално или у садејству са другим видовима терапије. R1 ресекција подразумева да су маргине препарата „макроскопски чисте“, али патохистолошка анализа указује да је тумор присутан на маргинама препарата, тј. малигне ћелије су остале у перитуморском ткиву, иако то није видљиво голим оком, што свакако није пожељно. R2 ресекција подразумева да маргине препарата нису макроскопски ни микроскопски „чисте“, тј. хирург током интервенције врши тзв. циторедуктивну операцију, којој није циљ екстракција тумора „in toto“ (у целости), већ само његова редукција у циљу омогућавања адјувантним видовима терапије, радио и хемиотерапији, да боље делују уколико је маса туморског ткива мања (Seinen и сар., 2012; Uggeri и сар., 2015; Margonis и сар., 2016; Khan и сар., 2016).

MMP-9 је протеолитички ензим, који деградира базалну мембрану и екстрацелуларни матрикс. Промовише прогресију карцинома повећавајући пролиферацију ћелија карцинома, миграцију, инвазију, метастазирање и ангиогенезу. Овакве ефекте MMP-9 испољава преко ремоделирања и деградације разноврсне групе супстрата који су структурне компоненте екстрацелуларног матрикса. Такође регулише бројне сигналне путеве утичући на факторе раста, концентрацију цитокина, експресију тирозин киназних рецептора, итд. (Bjorklund и Koivunen, 2005). Бројни радови сугеришу да MMP-9 може послужити као добар прогностички маркер, мада је улога MMPs као модулятора тумора и његовог микроокружења и даље нејасна, потребна су додатна истраживања на овом пољу (Yousef и сар., 2014). Ензим MMP-9 се налази у цитоплазми

туморских ћелија, али и у стромалним фибробластним ћелијама које представљају једну од компоненти микроокружења тумора (Pellikainen и сар., 2004). Иако туморске ћелије пробијају више ткивних баријера у циљу пролиферације и ширења, постоје докази који сугеришу да ћелије микроокружења тумора, као што су стромалне ћелије, потпомажу овакве процесе, тј. утичу на прогресију тумора (Charous и сар., 1997; O-Charoenrat и сар., 2001; Zhang и сар., 2008).

Наша претпоставка је да нису све R0 ресекције исте, тј. да у одређеним случајевима, иако су маргине препарата чисте на макроскопском као и на микроскопском нивоу, ипак нису чисте на молекуларном нивоу. Иако нема малигнућ ћелија у перитуморском ткиву, претпоставка је да постоје промене у нивоима одређених маркера, који могу указати на даљи ток болести. Перитуморско ткиво никако не представља пасиван чинилац у патогенези и развоју тумора и ми смо покушали да пронађемо који би то параметри, тј. маркери у перитуморском ткиву могли да помогну у предикцији прогресије малигне болести. Према литературним подацима, а свакако и када се узме у обзир њена улога у разградњи екстраћелијског матрикса, било би логично очекивати да MMP-9 може имати значајну улогу у овим процесима (Johanna и сар., 2004). Другим речима, изучавањем одређених маркера агресивности болести у перитуморском ткиву као што је MMP-9, као и њиховог односа у туморском и перитуморском ткиву може помоћи у предикцији биолошког понашања тумора у смислу агресивности болести. На тај начин може се издвојити група пацијената са R0 ресекцијом код којих постоји повећан ризик за метастазирање и/или рецидив болести упркос коректно одрађеној радикалној хируршкој интервенцији, са свим импликацијама на ток лечења.

Литературни подаци сугеришу да постоји корелација између MMP-9 и одређених клиничко-патолошких параметара (Song и сар., 2015). У овој студији смо поредили концентрацију MMP-9 у тумору и његовом окружењу и везу са клиничко-патолошким параметрима код пацијената са карциномом дојке. Показали смо да је производња укупне MMP-9 у перитуморском ткиву већа него у самом тумору. Врло је мало радова у којима су се аутори бавили изучавањем нивоа MMP-9 у перитуморском ткиву. Wu и сарадници (2014) наводе да су нашли већу концентрацију MMP-9 у туморском него у перитуморском ткиву. Разлика у резултатима њихове и наше студије се вероватно може приписати томе да су они у својој студији узорковали перитуморско ткиво на више од 5 cm удаљености од примарног тумора, док смо ми исто узорковали на око 3 cm удаљености од примарног тумора, што вероватно говори у прилог постојању градијације нивоа експресије MMP-9 како се удаљавамо од тумора.

У студији коју смо спровели на 50 пацијената са дијагнозом *Ductale invasivum mamme* и *Lobulare invasivum mamme*, нисмо нашли везу између продукције MMP-9 и хистолошког типа

карцинома што је у складу са литературним подацима (Wu и сар., 2014). Студије су показале да концентрација MMP-9 није у корелацији са хистолошким типом кацинома дојке, тј. не постоји статистички значајна разлика у продукцији MMP-9 између дукталног и лобуларног типа карцинома (Wu и сар., 2014). Са друге стране и код једног и код другог типа констатоване су значајно више концентрације у перитуморском него у туморском ткиву. Неки радови износе често контрадикторне ставове о повезаности нивоа серумске концентрације MMP-9 и одређених клиничко-патолошких својстава, али се углавном слажу да не постоји значајна повезаност између нивоа MMP-9 са једне, и величине тумора и појаве удаљених метастаза са друге стране, али постоји повезаност између концентрације MMP-9 и појаве метастаза у аксиларним лимфним нодусима (Нео и сар., 2014).

Наши резултати су показали да количина MMP-9 у микроокружењу тумора расте са повећањем хистолошког градуса. Добро диференцирани тумори (G1 и G2), често корелирају са бољом прогнозом, док G3 представљају лоше диференциране туморске ћелије и такви тумори имају висок потенцијал агресивности. Нашли смо да туморско ткиво продукује готово исте количине MMP-9 када је у питању хистолошки градус G1, G2 и G3, али перитуморско ткиво код G3 градуса (*high grade*) продукује значајно више концентрације MMP-9 у поређењу са G1 (*low grade*) и G2 (*intermediate grade*). Важна карактеристика инвазивних тумора је могућност да производе литичке ензиме, као што су металопроотеиназе, стога пораст ових ензима може да корелира са агресивноћу тумора. Наши резултати одговарају литератури, више концентрације MMP-9 су у корелацији са веома агресивним туморима, високог градуса (Köhrmann и сар., 2009).

Постоје подаци у литератури који показују да је висока експресија MMP-9 повезана са величином тумора (T), као и са лошом диференцијацијом (G3) (Johanna и сар., 2004), што потврђују и наши резултати. Интересантно је да се са повећањем величине тумора однос концентрације MMP-9 у тумору и перитуморском ткиву значајно мења. Тако је код тумора величине T1 тај однос 1: 1.12 у корист перитуморског ткива, док је код тумора величине T3 тај однос чак 1: 9.41, тј. са повећањем величине, тумор продукује све мање количине MMP-9, али зато перитуморско окружење наставља да продукује MMP-9 у интензивираној количини. Сматрамо да је веома битно пратити концентрацију MMP-9 и у перитуморском ткиву, а не само у тумору, јер њихов измењен однос сведочи да је перитуморско ткиво, све само не пасивни чинилац у туморогенези.

Liu и сарадници су у својој студији на 164 пацијента са дијагнозом *nasopharyngeal carcinoma*, нашли да концентрација MMP-9 не корелира са клиничко-патолошким параметрима као што су године пацијената, пол, навике (пушење), величина тумора као и присуство удаљених

метастаза, али и позитивну корелацију између концентрације MMP-9 и присуства метастатских ћелија у лимфним нодусима (N класификација) и стадијума болести (I-II, III-IV) (Liu и сар., 2010). Нео и сарадници су своја истраживања спровели на 77 пацијента и демонстрирали позитивну корелацију између серумских и нивоа MMP-9 у захваћеним лимфним нодусима код пацијената са инвазивним дукталним карциномом дојке и предложили коришћење MMP-9 као предиктора развоја карцинома дојке и метастазирања у лимфне нодусе (Нео и сар., 2014). Наши резултати су у том погледу конзистентни са литературним. Показују да у узнатредовалим стадијумима болести (T3, N2, M1) значајно више MMP-9 продукује перитуморско него туморско ткиво. Тако окружење тумора у развијеној болести преузима улогу и постаје доминантни извор MMP-9. Нпр., у N0 стадијуму однос концентрација MMP-9 у туморском и перитуморском ткиву је 1: 1.44, док је у N2 стадијуму болести тај однос чак 1: 26.5. Из ових података закључујемо да је концентрација MMP-9 у перитуморском ткиву директно пропорционална степену захваћености аксиларних лимфних нодуса. Што је разлика већа у корист перитуморског ткива, ради се о више узнатредовалој болести са лошијом прогнозом. Намеће се закључак да, иако се хируршки uklони примарни тумор, активност MMP-9 неће бити смањена, захваљујући повећаној продукцији од стране перитуморског ткива.

Наши резултати су показали да се повећана продукција MMP-9 у перитуморском ткиву карцинома дојке јавља код пацијената са позитивним естрогенским и прогестеронским рецепторима. Естроген и прогестерон имају функцију у расту и развоју циљаних ткива и играју кључну улогу у развоју хормонски зависних карцинома (карцином дојке, карцином јајника и итд). Ефекти естрогена и прогестерона су остварени преко естрогенских и прогестеронских рецептора, а који су чланови суперфамилије нуклеарних стероидних рецептора (Kousidou и сар., 2008). У литератури се могу наћи подаци који показују да не постоји статистички значајна повезаност између нивоа серумске MMP-9 са једне, и естрогенског, прогестеронског и HER-2 статуса са друге стране (Daniele и сар., 2010). Утврђено је да код карцинома дојке, естроген може промовисати интеракцију између тумора и строме преко регулације експресије хепараназе гена (*heparan sulfat N-sulfo-D-glukozamin endoglukanaza - Hpa1*) (Elkin и сар., 2003; Nilsson и сар., 2007). Молекуларна основа такве интеракције укључује деградацију и ремоделовање екстрацелуларног матрикса. Кључну улогу у овим процесима играју чланови MMPs фамилије и њихови инхибитори. Постоје докази да би естроген и сродна једињења могли учествовати у регулацији ових процеса (Losordo и Isner, 2001).

Наши резултати су показали да се већа концентрација MMP-9 продукује код пацијената са неекспримираним рецепторима за HER-2 у карциномском и перитуморском ткиву. У *in vitro*

експериментима на ћелијским линијама са експримираним рецепторима за HER-2 (MCF-7) и ћелијским линијама без ових рецептора (MDA-MB-231) пронађено је да се на основу експресије MMP-9 може закључити у којим удаљеним органима се могу очекивати метастазе карцинома дојке. Тако у експерименту са ћелијама које имају изражене HER-2 рецепторе и повишен ниво MMP-9 удаљене метастазе се најчешће јављају у мозгу, док код групе у којој није експримиран HER-2, метастазе се могу очекивати у другим органима као што су кости и плеура. То свакако може сугерисати да анализирање MMP-9 може утицати на даљи ток лечења ових пацијената (Stark и сар., 2007; Momeny и сар., 2015).

Наши резултати су показали да су знатно виши нивои MMP-9 у перитуморском ткиву повезани са HER-2 негативним карциномима дојке. Литературни подаци тврде да је висока експресија MMP-9 у ћелијама карцинома повезана са HER-2 експресијом, али само у подгрупи пацијената са чистим лимфним нодусима. Такође, висока експресија MMP-9 у строми је повезана са HER-2 експресијом, али само у случајевима када такви карциноми експримирају и естрогенске рецепторе. То указује да је однос између нивоа MMP-9 и различитих клиничко-патолошких карактеристика веома комплексан и потребна су даља истраживања (Johanna et al., 2004).

У свим старосним категоријама концентрација MMP-9 је значајно већа у перитуморском него у туморском ткиву. Такође, концентрација MMP-9 у перитуморском ткиву је статистички значајно већа у групи пацијената млађих од 40 година у односу на оне старије од 40 година. Наши резултати су у сагласности са литературним налазима (Rashad и сар., 2014).

Ово истраживање потврђује да карцином дојке чак и у раној фази без регионалних лимфних или удаљених метастаза, доводи до промена у перитуморском ткиву, које је могуће детектовати на молекулском, али не на патохистолошком нивоу. Анализа укупне концентрације MMP-9 указује да перитуморско ткиво не представља пасивни фактор у процесу развоја и ширења малигну оболјења. Туморско окружење код развијеније болести преузима улогу и постаје доминантан извор MMP-9. Перитуморско ткиво на удаљености од 3 cm од тумора производи више MMP-9 од самог тумора. Повећање величине тумора и захваћеност лимфних чворова мења однос MMP-9 концентрације у тумору и перитуморском ткиву у корист перитуморског ткива. Што је разлика већа у корист перитуморског ткива ради се о више унапредовалој болести са лошијом прогнозом. Анализа односа MMP-9 у перитуморском и ткиву карцинома код пацијената са канцером дојке указује на групу болесника са високим ризиком од метастаза у аксиларним лимфним чворовима, доказујући да MMP-9 је добар прогностички индикатор прогресије болести код карцинома дојке.

### **Експресија *VEGF* гена**

Ангиогенеза и формирање нових крвних судова је есенцијални корак у развоју, прогресији и метастазирању малигних тумора (Folkman, 1987; Ferrara, 2002). VEGF је примарни стимуланс ангиогенезе у туморима и своју функцију остварује везујући се за VEGF рецептор-2 (VEGFR-2, такође познат и као flk/kdr) и VEGFR-1 (познат каоflt) који се експримирају у ендотелним ћелијама (Ferrara и сар., 2003). VEGFR, даље узрокује каскаду догађаја који резултују митозом ендотелијалних ћелија и формирањем нових крвних судова, као и повећањем васкуларне пермеабилности што омогућава тумору да има довољно нутријената и да може даље да прогредира (Shibuya, 2003).

Литературни подаци показују да је експресија *VEGF* гена значајно повећана код метастатског дукталног карцинома дојке што је у корелацији са лошим клиничким исходом болести (Zhao и сар., 2012; Keyhani и сар., 2013), и наши резултати се слажу са литературним. Мада је констатована нижа експресија *VEGF* у случају лобуларног хистолошког типа тумора, код њега, као и код дукталног карцинома дојке, неоангиогенеза игра веома важну улогу. Међутим, у случају лобуларног карцинома, према литературним подацима, VEGF не игра доминантну улогу, већ преовлађују други молекуларни механизми који су у блиској повезаности са HIF-1 $\alpha$  (Coradini и сар., 2002).

У литератури постоји мноштво радова који се тичу испитивања утицаја ангиогенезе, VEGF и VEGF-R у туморском ткиву (Kerbel и сар., 2008; Zhuang и сар., 2013; Feng и сар., 2017), али је врло мало радова који су се бавили испитивањем утицаја поменутих параметара у перитуморском ткиву које има веома значајну улогу у процесу туморске прогресије. Наши резултати показују да значајно вишу експресију *VEGF* у самом туморском ткиву него у туморском окружењу. У литератури постоје слични подаци за карцином дојке у почетном стадијуму развоја као и за хепатоцелуларни карцином (Lin и сар., 2001). Макрофаги у перитуморском окружењу који експримирају рецепторе VEGFR-1 су посебно значајни и могу играти важну улогу у процесу рецидивирања, тј поновног јављања болести. Они, наиме, могу продуковати факторе који потпомажу раст тумора и метастазирање, што опет резултује лошим исходом (Lin и сар., 2001). Да ли је експресија *VEGF* у перитуморском ткиву последица целуларне интеракције (туморског ткива и окружења), или је то последица релативне хипоперфузије услед механичког притиска тумора на перитуморско ткиво, још увек није довољно јасно (Li и сар., 2011). Експресија *VEGF* је статистички значајно виша у туморском него у перитуморском ткиву, без обзира на већину клиничкопатолошких карактеристика и



хистолошки подтип тумора дојке, и наши резултати су по том питању конзистентни са литературним (Srabović и сар., 2015).

Карцином дојке код младих жена (мање од 35 година) представља засебан клинички ентитет који се по многим особинама значајно разликује од карцинома дојке код жена средње доби или старијих (Zhang и сар., 2015). Наша студија је показала да жене млађе од 40 година имају изузетно висок протеински ниво MMP-9, док остали испитивани параметри као што су *VEGF*, *HIF-1*, *CXCL-12* и *iNOS* нису виши у односу на групу пацијенткиња старијих од 40 година. Свакако да у обзир треба узети лимитирајући фактор да у испитиваној групи од 50 пацијенткиња, свега су две пацијенткиње млађе од 40 година.

Наши резултати показују да експресија *VEGF* у перитуморском ткиву није зависна од тога да ли је постигнута R0 или R1 ресекција, док је експресија статистички значајно виша у туморском него у перитуморском ткиву када је у питању R1 ресекција, што је у складу са литературним подацима (Zhao и сар., 2012). Одавно је познато да стероидни хормони имају веома значајну улогу у регулацији експресије *VEGF*, мада се већина радова тиче конкретно утицаја естрогена, док се о утицају прогестерона зна прилично мање. Наше истраживање такође показује да у случају прогестрон позитивних карцинома дојке долази до статистички значајно веће експресије *VEGF*, него код PR- карцинома, што је у складу са литературом (Botelho и сар., 2015). Наши резултати су показали да не постоји статистички значајна разлика између експресије *VEGF* и статуса естрогенских рецептора у туморском ткиву. Fucsar и сарадници су своја истраживања спровели на 233 пацијента са карцином дојке и демонстрирали да корелација између *VEGF* и статуса естрогена нема утицаја на ангиогенетски прекидач, али може утицати на одабир терапије (Fucsar и сар., 2006).

Највећа експресија *VEGF* у туморском ткиву је примећена у групи HER негативних карцинома дојке. Литературни подаци потврђују овакву констатацију (Canonici и сар., 2013; Desroches-Castan и сар., 2015). Мада је *HIF-1 $\alpha$*  потребан за транскрипциону регулацију *VEGF* експресије и даље је недовољно јасно да ли је *HIF-1 $\alpha$*  директно укључен у HER-2 индуковану *VEGF* експресију (Wang и сар., 2015).

Висока експресија *VEGF* доводи до стимулације пролиферације ендотелних ћелија које даље стимулишу неоангиогенезу и лимфангиогенезу. Новонастала васкуларна и лимфатична мрежа показује бројне дисфункције, почев од неправилног гранања до повећане пропустљивости зида крвног и лимфног суда. Ови новонастали абнормални судови двојачо иду на руку прогресији тумора; пре свега обезбеђују туморском ткиву довољно нутријената, а са друге стране омогућавају олакшан продор малигних ћелија и њихову даљу хематогену и лимфогену

дисеминацију, тј. метастазирање. Из ранијих студија је већ познато да постоји позитивна корелација између нивоа VEGF-C у плазми пацијената са карциномом дојке и појаве метастаза (Chien и сар., 2013; Omoto и сар., 2014).

Наши резултати су показали да постоји изузетно висока експресија *VEGF* у перитуморском и туморском ткиву пацијената са захваћеним лимфним нодусима (N2 група). Висока експресија *VEGF* доводи до значајних промена у перитуморском окружењу и стимулације неоангиогенезе и лимфангиогенезе што може послужити као предиктивни параметер када су у питању метастазе у стражарским или “*sentinel*” лимфним нодусима (Liersch и сар., 2012). У почетним стадијумима болести (T1), доминантну улогу у продукцији *VEGF* има перитуморско ткиво у односу на туморско окружење, док са развојем карцинома (T3 стадијум) долази до инверзије овог односа и доминантну улогу у продукцији *VEGF* преузима туморско ткиво.

VEGF има доминантну улогу, не само у ангиогенези, већ и у лимфангиогенези, а одавно је познато да се карциноми не шире само хематогено већ и лимфогеним путем. Међутим, дужи низ година лимфатична мрежа је била прилично недоступна истраживачима за праћење, пре свега због непостојања маркера који би селективно обележио лимфне судове. Тек пре неколико година је развијено антитело D2-40 које је било у стању да специфично препозна протеин подопланин, сензитиван и специфичан маркер, поготово када је у питању лимфатична мрежа код карцинома дојке. На тај начин је уведен у употребу нов параметар, густина лимфних судова (енг. *lymphatic vessel density - LVD*) који може служити за предикцију исхода карциномске болести (El-Gendi и Abdel-Hadi, 2009). Постоје студије које указују да је значајно већа густина лимфатичне мреже присутна у перитуморском ткиву највећих тумора, тј. што је тумор већи, улогу у продукцији *VEGF* полако преузима и перитуморско ткиво, тако да је лимфангиогенеза веома изражена и у перитуморском ткиву око највећих тумора.

У овом истраживању показано је да је експресија *VEGF* у туморском ткиву највећег тумора (T3) 85.22 пута већа него код туморског ткива T1 које је мање од 2 cm. Како туморско ткиво расте, тако и перитуморско ткиво повећава експресију *VEGF* гена, која је 12.55 пута већа у перитуморском ткиву код највећег тумора (T3) у односу на перитуморско ткиво око тумора величине до 5 cm (T2). Истраживања су показала да постоји јасна разлика у експресији VEGF у перитуморском ткиву у односу на здраво ткиво дојке, где је ова појава много мање изражена, тако да здраво ткиво дојке има ниску експресију VEGF, као и туморско ткиво у узнапредовалом стадијуму болести (Zhang и сар., 2017). Јі и сарадници су у својим истраживањима нашли да постоји већа густина лимфатичне мреже и већа експресија *VEGF* гена у перитуморском окружењу око мањих тумора. Стога, интратуморска лимфатична мрежа може бити

компромитована инвазијом туморских ћелија које се агресивно понашају и повећавају интерстицијални притисак услед експанзије туморске масе, а као одговор на такво стање је повећање експресије *VEGF* гена (Ji, 2006). Изучавање лимфатичне мреже у перитуморском ткиву може послужити као важан прогностички маркер јер су раније студије, као и наша, показале да перитуморска лимфангиогенеза и експресија *VEGF* у туморском окружењу у комбинацији са TNM класификацијом представљају изузетно важан предиктор прогресије карциномске болести, појаве лимфних метастаза, периода преживљавања без болести и средњег преживљавања (Zhao и сар., 2012).

За *VEGF* је познато да индукује продукцију плазминогена и повећава васкуларну пермеабилност, чиме омогућава лакши продор малигних ћелија у крвоток, њихову дисеминацију и формирање удаљених метастаза. У комбинацији са повишеном концентрацијом MMP-9 детерминише одређене подтипове карцинома дојке као билошки веома агресивне и склоне метастазирању, како у регионалне лимфне нодусе, тако и у удаљена ткива и органе. Наши резултати указују на статистички значајно више нивое експресије *VEGF* у туморском него у перитуморском ткиву. Није било статистички значајне разлике у експресији *VEGF* у туморском ткиву у групи пацијената са потврђеним метастазама и оних код којих присуство метастаза није доказано, а литературни подаци потврђују ове резултате (Delli и сар., 2010).

Када је у питању хистолошки градус наша студија је показала да окружење око тумора код пацијената са G1 и G2 градусом имају већу експресију *VEGF* гена у односу на тумор. У G3 градусу долази до инверзије овог односа и статистички значајно виша експресија *VEGF* је констатована у туморском него у перитуморском ткиву. У литератури се могу наћи подаци, који се односе на испитивање експресије *VEGF* гена у серуму и који показују да постоји линеарни пораст експресије са порастом градуса тумора, стога наши резултати су у сагласности са литературом (Thielemann и сар., 2013). Недиферентовани тумори високог градуса имају агресиван биолошки профил, висок митотски индекс и услед брзих и некоролисаних деоба, настаје потреба за настанком нове васкуларне мреже, јер постојећа васкуларна мрежа не може да испрати велике потребе тумора за нутријентима и кисеоником. Отуда и „*overexpression*“ *VEGF* гена код оваквих карцинома (Thielemann и сар., 2013). Наши резултати су показали да је висока експресија *VEGF-A* гена карактеристика пацијената са дијагнозом *Invasive Ductal Carcinoma*. Такође, сугеришу да *VEGF-A* ген може представљати добар прогностички маркер агресивних тумора. Уколико је тумор већих димензија, вишег градуса, са појавом секундарних депозита у аксиларним лимфним нодусима и експресија *VEGF-A* гена је већа. Висока експресија је показана

и у групама пацијената са рецепторима PR+ и HER-2- што сугерише на посебан одабир хормонске терапије.

Експресија иРНК *VEGF-A* гена је висока код дукталних карцинома дојке. Уколико је тумор већих димензија, вишег градуса, са појавом секундарних депозита у аксиларним лимфним нодусима и експресија иРНК *VEGF-A* гена је већа. Висока експресија је показана и у групама пацијената са рецепторима PR+ и HER-2-.

### **Експресија *HIF-1 $\alpha$* гена**

Веза између хипоксије и прогресије карцинома је истраживачима одавно позната. Хипоксија је последица различитих фактора, као што су величина, локализација, тип и прокрвљеност тумора. Један од најзначајнијих параметара који се јавља као последица хипоксије је *HIF-1*. Интратуморска хипоксија је параметер лоше прогнозе када је у питању карцином дојке. Документовано је да су такви тумори биолошки агресивни, често метастазирају и, нажалост, отпорни су на већину стандардних модалитета терапија, као што су хемиотерапија и радиотерапија (Cerci и сар., 2016).

Повећана експресија *HIF-1 $\alpha$*  је изражена код многих тумора, а посебно код карцинома дојке. Vos и сарадници су приметили да постоји повишена експресија *HIF-1 $\alpha$*  у случајевима дукталног карцинома дојке, али не и код нормалног ткива дојке, или код дукталне хиперплазије. Наше испитавање такође показује да 9.13 пута већа експресија *HIF-1 $\alpha$*  постоји у случајевима дукталног карцинома него код лобуларног хистолошког типа (Vos и сар., 2001).

Доказали смо да је *HIF-1 $\alpha$*  експримиран и у туморском и у перитуморском ткиву, без обзира на хистолошки тип тумора, тип ресекције, године пацијента, хормонски и HER-2 статус пацијента. Такође, у већем броју случајева, експресија *HIF-1 $\alpha$*  је виша у туморском него у перитуморском ткиву. То је у складу са литературним подацима, који наводе да је средњи парцијални притисак кисеоника ( $pO_2$ ) у нормалном ткиву дојке око 65 mmHg, док је код карцинома та вредност око 10 mmHg, тако да је хипоксија и присуство *HIF-1 $\alpha$*  очекивано. Више од половине испитиваних карцинома дојке чак има парцијални притисак кисеоника у ткиву мањи од 2.5 mmHg (Vaupel и сар., 2007). У случајевима када је из неког разлога урађена R1 ресекција, тј. када на маргинама препарата има микроскопски видљивих малигних ћелија, експресија *HIF-1 $\alpha$*  је статистички значајно виша него у случају R0 ресекције. Могући разлог би био то што је R1 ресекција урађена у случајевима јако унапредовалих тумора, а познато је да је експресија *HIF-1 $\alpha$*  изражена у клинички агресивним и унапредовалим туморима, што је такође у складу са доступним подацима (Mees и сар., 2009). Наше испитавање показује да експресија *HIF-1 $\alpha$*  ни у

туморском ни у перитуморском ткиву код пацијенткиња са карциномом дојке није добно зависна, што је у сагласности са подацима доступним у литератури (Vos и сар., 2003).

У литератури се могу наћи подаци о повезаности естрогена и *HIF-1* са развојем и прогресијом карцинома дојке (Sudhagar и сар., 2011). Естроген и *HIF-1* су заједно укључени у бројне процесе у вези са напредовањем карцинома дојке као што су пролиферација, диференцијација, ангиогенеза, метаболизам и апоптоза (George и сар., 2012). Естроген индукује ER $\alpha$ -c-Src-PI3K интеракцију, која даље активира PI3K/AKT/mTOR сигнални пут и *HIF-1 $\alpha$*  транскрипцију. Естроген, такође активира друге сигналне путеве као што је GPER/EGFR/ERK/c-fos што води повећању експресије *HIF-1 $\alpha$* , а који у крајњој инстанци повећава експресију *VEGF* (De Francesco и сар., 2014). Такође, естроген може директно индуковати *HIF-1 $\alpha$*  транскрипцију (Yang и сар., 2015). Ови литературни подаци се подударају са онима које смо ми добили у нашој студији, мада разлика није статистички значајна.

Испитивањем експресије *HIF-1 $\alpha$*  у туморском и перитуморском ткиву пацијената са карциномом дојке закључили смо да је статистички значајно виша експресија *HIF-1 $\alpha$*  у случају HER-2 негативних у односу на HER-2 позитивне туморе. У групи HER-2+, *HIF-1 $\alpha$*  вероватно делује синергистички са HER-2. Повећавањем рецептора за хумани епидермални фактор, ћелије карцинома брже расту, пролиферишу, а тиме карцином постаје веома агресиван. Код групе без рецептора за HER-2, хипоксија представља доминантан механизам за напредовање и раст тумора узрокујући неке друге сигналне путеве (Yehia и сар., 2015; Sirkisoon и сар., 2016). У литератури се могу пронаћи подаци који сугеришу да је повећана експресија *HIF-1 $\alpha$*  у корелацији са негативним прогестеронским рецепторима и наш налаз је у сагласности са литературним (Gruber и сар., 2004).

Из литературе је познато да је експресија *HIF-1 $\alpha$*  израженија у раним стадијумима карцинома дојке и наши подаци сугеришу да је повећана експресија *HIF-1 $\alpha$*  у туморском ткиву групе T1 у поређењу са перитуморским ткивом, што се слаже са литературом (Lai и сар., 2014). Међутим, са повећањем величине тумора опада експресија *HIF-1 $\alpha$*  у туморском, али значајно расте у перитуморском ткиву, које постаје његов доминантни извор. Резултати показују да повећањем тумора долази до рапидног повећања експресије *HIF-1* у перитуморском ткиву, тако да је његова експресија скоро 15 пута већа у T3 него у T1 стадијуму. Једно од објашњења би била механичка хипотеза, тј могућност да велики тумор врши јак притисак на перитуморско ткиво, колабира околну васкуларну мрежу и узрокује хипоперфузију ткива и следствено хипоксију, што за узврат активира експресију *HIF-1 $\alpha$* . То потврђује нашу хипотезу да је перитуморско ткиво активан чинилац у туморогенези и процесима метастазирања. Добар показатељ тога је чињеница

да перитуморско ткиво може постати у одређеним условима круцијални фактор који може довести до напредовања малигне болести, као што је случај у тзв. “*tumor bed effect*”. Наиме, ради се о следећем механизму: хемиотерапија и зрачна терапија се користе у лечењу, у адјувантном и неoadјувантном модалитету, али нажалост могу имати нежељена дејства и толико изменити туморско микрокружење, изазвати хипоксичне услове и активацију *HIF-1 $\alpha$*  који даље познатим механизмима активира *VEGF* и неоангиогенезу, *MMPs* и каскаду напредовања тумора и метастазирања. На тај начин долази до рецидива тумора који су много агресивнији него примарни, склони брзом напредовању, локалном ширењу и метастазирању (Asparuhova и сар., 2015). Активацијом транскрипције гена који кодирају *VEGF*, *HIF-1* игра критичну улогу у ангиогенези. Директна веза између *HIF-1*, *VEGF* и неоангиогенезе је вишеструко документована у литератури (Ravi и сар., 2000). Повећана експресија *HIF-1 $\alpha$*  код пацијената са карциномом дојке је у корелацији са негативним лимфним нодусима у аксили и представља лош прогностички параметар за ову групу пацијената. Резултати се слажу са напред наведеним (Bos и сар., 2003).

Процес метастазирања је веома сложен и састоји се од више ступњева: 1) *Епително-мезенхимна транзиција (EMT)*, што подразумева губљење интерцелуларног контакта и повећање мобилности малигнућ ћелија. Малигнуће ћелије све више губе особине епителне и добијају особине мезенхималне ћелије. Ови процеси се одвијају под утицајем Е-кадхерина, виментина, клаудина-1, велике фамилије трансмембранских протеина, када долази до реорганизације ћелијског цитоскелета, повећања мобилности малигнућ ћелија и откидања ћелија од примарног тумора, што је предуслов дисеминације (Maу и сар., 2011). *HIF-1* сигнални пут, такође укључује дуге низове некодирајуће РНК као што је *H19 lncRNA* (енгл. *H19-Long non coding RNAs-H19 lncRNA*) које потпомажу поменуте процесе (Matouk и сар., 2014); 2) *Локална ткивна инвазија*, тј. деградација перитуморског ткива, екстрацелуларног матрикса, углавном под утицајем матрикс-металопротеиназа чији смо утицај такође проучавали у овој студији. Ми смо проучавали утицај *MMP-9* која деградира тип IV колагена, који представља главну компоненту базалне мембране, а тумор постаје инвазивни оног тренутка када пенетрира базалну мембрану (Krishnamachary и сар., 2006); 3) *Интравазација*, што подразумева процес пенетрације малигнућ ћелија кроз зид крвних судова и њихов улазак у циркулацију. Недавне студије су указале да *HIF-1 $\alpha$*  има круцијалну улогу у процесу инвазије регулацијом нивоа про-колаген пролил (P4HA1 и P4HA2) и лизил (PLOD1 и PLOD2) хидроксилаза (Gilkes и сар., 2013). Такође, треба знати да малигнуће ћелије могу продрети не само у крв, већ и у лимфне судове тако да карцином дојке може дати, како хематогене, тако и лимфогене метастазе; 4) *одомаћење*, тј. процес преживљавања и привикавања малигнућ ћелија на живот у циркулацији. Познато је да мање од 0,1% малигнућ ћелија које су продрле у

циркулацију може дати метастазе; 5) *екстравазацију*, тј. пенетрирање малигну хелија кроз зидове крвних судова али овог пута у обрнутом смеру, односно њихов излазак из крвног суда у околно ткиво удаљених органа. Zhang и сарадници су показали да HIF-1 потпомаже екстравазацију малигну хелија у плућима (Zhang и сар., 2012). Касније је идентификован и ангиопоетин-4 који потпомаже слабљење веза између ендотелних хелија крвног суда и излазак малигну хелија у околно ткиво. Када је коришћена компетитивна блокада HIF-1 у експерименталним условима, овај процес се није јављао, што указује на HIF-1 као потенцијалну терапијску мету (Zhang и сар., 2012); 6) *формирање окружења* у коме секундарни депозит може да расте и формира метастазу. HIF-1 индукује каскаду догађаја који су у вези не само са примарним тумором, већ и са удаљеним ткивима и органима у којима новоформирани секундарни депозити могу наћи плодно тло. Наиме, HIF-1 мобилише одређене хелије из коштане сржи, које формирају кластере на местима на којима ће се формирати метастазе и омогућавају насељавање малигну хелија. У овим процесима круцијалну улогу имају чланови фамилије лизил оксидаза (LOX), укључујући LOX, LOXL2 и LOXL4 (Zhang и сар., 2012). У свим овим корацима HIF-1 има веома значајну улогу. Зато је логично очекивати више мРНК *HIF-1* гена у случајевима тумора који су дали метастазе (Liu и сар., 2015), што потврђују и наши резултати.

Експресија *HIF-1*, према нашим резултатима је највиша у туморском ткиву код тумора G2 градуса, док у G3 градусу експресија *HIF-1* опада у туморском, али значајно расте у перитуморском ткиву, чак 4 пута више. То је очекиван налаз, јер у туморима ниске диференцијације (G3) развој васкуларне мреже не може да испрати бујање малигног ткива и раст тумора који је превише интензиван, те долази до некрозе у самом тумору, а некротичне хелије не могу да експримирају HIF-1, тако да перитуморско ткиво преузима доминантну улогу у његовој продукцији.

Добро је познато, на основу недавних студија, да “нормално” перитуморско ткиво код пацијенткиња са карциномом дојке није исто што и нормално ткиво дојке код пацијенткиња које немају карцином или имају бенигне промене у дојци. Микроскопски неизмењено перитуморско ткиво ипак показује бројне абнормалности на генетичком и молекуларном нивоу које могу имати утицаја у процесу канцерогенезе (Schummer и сар., 2010; Zubor и сар., 2015; Margan и сар., 2016), што и јесте окосница нашег истраживања.

Наши резултати показују да није довољна само детаљна анализа туморског, већ обавезно и перитуморског ткива, јер се често значајније промене на молекуларном нивоу дешавају у микроокружењу карцинома. Са повећањем величине и градуса тумора опада експресија *HIF-1 $\alpha$*  гена у туморском, али значајно расте у перитуморском ткиву, које постаје његов доминантни

извор. Експресија *HIF-1 $\alpha$*  гена у туморском ткиву је у корелацији са појавом регионалних аксиларних или удаљених метастаза, а тиме се *HIF-1 $\alpha$*  ген може уврстити у прогностичке маркере ширења и напредовања болести.

### Експресија *CXCL-12* гена

Хемокини *CXCL-12*, познат и као стромални *cell-derived factor-1* (*SDF-1*) и *VEGF*, које продукују и луче хипоксични тумори, су снажни стимулатори ангиогенезе. *CXCL-12* је биомаркер новије генерације чије је изучавање веома актуелно, те нема довољно литературних података са којима смо могли да извршимо поређење. Према нашем сазнању ретке су студије које су се бавиле изучавањем експресије *CXCL-12* у самом туморском ткиву карцинома дојке, а ово је једна од првих студија која се бави изучавањем његове експресије и у перитуморском ткиву.

Литературни подаци показују да *VEGF* стимулише експресију *CXCL-12* и рецептора *CXCR-4*. Ћелије које су претходно третиране *VEGF*-ом показују повећан миграторни и ангиогени одговор на *CXCL-12*, сугеришући да *VEGF* стимулација има комплементарно дејство са *SDF-1/CXCR-4* сигналним путем у индукцији ангиогенезе (Carretero-Ortega и сар., 2010). Миграција ендотелних ћелија је одлучујући корак у процесу ангиогенезе под утицајем *VEGF* и *CXCL-12*. *VEGF* учествује у процесима ћелијске миграције, пролиферације, експресије проангиогених фактора, међу којима је један од важнијих *CXCR-4* (Kruczek и сар., 2005). Стромални фибробласти смештени у туморском ткиву продукују *CXCL-12*, који се везује за *CXCR-4*, рецепторе на туморским ћелијама, што иницира формирање нових крвних судова и мобилизацију проангиогених ћелија из коштане сржи (Zheng и сар., 2007; Chavakis и сар., 2008). Muller и сарадници су доказали да *CXCR-4* није експримиран у нормалном ткиву дојке, али јесте у карциномском ткиву дојке и метастатским ћелијама (Muller и сар., 2001).

Ми смо у својој студији показали да се *CXCL-12* не експримира само у туморском, већ и у перитуморском ткиву у неким случајевима и више него у самом тумору. *CXCL-12*, лиганд за *CXCR-4*, највише се експримира у циљним органима у којима карцином дојке може дати метастазе као што су плућа, коштана срж, јетра, лимфни нодуси (Muller и сар., 2001). Такође, постоје подаци у литератури који наводе да је експресија *CXCR-4* изражена у случају инвазивног дукталног карцинома дојке. У нашој студији на 50 пацијената, одређивали смо протеинску експресију *CXCR-4*. Показали смо да је овај рецептор веома изражен у ткиву карцинома. Такође, наши налази су показали да се овај рецептор среће и у перитуморском ткиву, што опет потврђује чињеницу да је перитуморско ткиво врло измењено под утицајем малигних ћелија.



У туморском и перитуморском ткиву смо одређивали експресију *CXCL-12* и поредили са хистолошким типом карцинома. Резултати су показали да туморско ткиво дукталног типа карцинома има статистички значајно вишу експресију овог гена у поређењу са лобуларним типом, што је у складу са литературним подацима (Ramos и ср., 2011). Утврдили смо да је експресија *CXCL-12* статистички значајно виша у перитуморском ткиву у случају лобуларног у поређењу са окружењем око дукталног хистолошког типа карцинома дојке. На основу наших сазнања, тренутно нема литературних података о испитивањима овог гена у перитуморском ткиву дојке.

*CXCR-4* и његов лиганд *CXCL-12* су главни стимулатори раста код естроген позитивних карцинома дојке. Наши резултати указују да постоји статистички значајно виша експресија *CXCL-12* у случајевима ER+ него у случајевима ER- карцинома дојке, што је у складу са литературним подацима (Boudot и сар., 2011). О међусобном утицају прогестерона и *CXCL-12/CXCR-4* се може наћи веома мало радова у доступним базама података. Па ипак, иако је то недовољно истражена и обрађена тема постоје радови који показују да прогестерон може имати модулишућу улогу у експресији више хемокинских рецептора, између осталих и *CXCR-4*. Веза између нивоа *CXCL-12* у тумору и перитуморском ткиву са прогестеронским статусом пацијенткиња је прилично мање описивана у литератури. Наши резултати су показали значајно вишу експресију *CXCL-12* код пацијената са PR+. Wu и сарадници наводе да нема статистички значајне повезаности између експресије *CXCL-12* и хормонског статуса (нивоа естрогена и прогестерона), али сугеришу да постоји очигледна корелација између нивоа *CXCL-12* и метастатске болести као и просечног времена преживљавања пацијената са карциномом дојке (Wu и сар., 2015). Када је у питању поређење експресије *CXCL-12* у туморском и перитуморском ткиву, наши резултати указују да је ниво експресије овог гена статистички значајно виши у туморском него у перитуморском ткиву, без обзира на хормонски статус, мада нема сличних радова описаних у литератури који упоређују туморско и перитуморско ткиво у погледу експресије *CXCL-12*. Описана је значајна негативна корелација између нивоа *CXCL-12* експресије и рецептора за HER-2 (Wu и сар., 2015), што потврђују и наши резултати. То је потенцијално важна чињеница због теоријске могућности блокирања веома значајне *CXCL-12/CXCR-4/CXCR-7* осовине (потенцијална терапијска мета) код *triple negative* карцинома дојке, код којих су терапијске могућности иначе веома ограничене (Wu и сар., 2015).

Сигнални пут *CXCL-12/CXCR-4* је повезана са процесом интравасације који подразумева улазак малигних ћелија у крвну и лимфну мрежу, што је предуслов метастазирања. Заиста, у радовима се описује велика бројност макрофага са повишеном експресијом рецептора *CXCR-4*,

а који су локализовани око крвних судова у близини тумора. Тиме омогућавају везу тумора са околним крвним судовима (Sanchez и сар., 2011). Стога не чуди јака корелација између поменуте осовине са једне стране и лимфонодалних и удаљених метастаза са друге стране код пацијената са карциномом дојке. Наши резултати поткрепљују овакве литературне налазе. Закључили смо да туморско ткиво експримира више *CXCL-12* него перитуморско ткиво како у групи која нема детектованих метастаза, тако и у групи пацијената са доказаним метастазама. У М1 групи пацијената туморско ткиво експримира 10,83 пута више *CXCL-12* него туморско ткиво М0 групе пацијената. Постоји јасна позитивна корелација у нашим налазима када је у питању ниво експресије *CXCL-12* и броја захваћених лимфних нодуса. У N1 стадијуму болести експресија *CXCL-12* у туморском ткиву је дупло већа, док је у N2 стадијуму 5.5 пута већа него у N0 стадијуму, тако да је градијација очигледна. Ови налази се слажу са литературом (Hernandez и сар., 2011). У литератури нисмо успели да нађемо податке о истраживањима *CXCL-12* у перитуморском ткиву, док наши резултати показују да је градијацијско повећање експресије *CXCL-12* присутно и у перитуморском ткиву. Показано је да је ова разлика далеко већа у перитуморском ткиву, тј. да је експресија *CXCL-12* гена у ПТ N2 групе, већа 64.83 пута од ПТ N1, и 48.5 пута већа од ПТ N0 групе. Ово је још једна потврда која говори о улози перитуморског ткива у развоју и ширењу тумора.

Литературни подаци показују да ниво експресије *CXCL-12* у туморском ткиву није повезан са стадијумом, тј. величином тумора (Hernandez и сар., 2011), и наши налази се слажу са објављеним. Међутим, ми смо нашли да је ниво експресије *CXCL-12* веома значајно измењен у перитуморском ткиву у зависности од стадијума болести. Тако, у стадијуму T1 експресија *CXCL-12* је 8.5 пута виша у туморском него у перитуморском ткиву, док се са повећањем стадијума тај однос значајно мења (у T3 стадијуму однос је 1: 5.54, али овог пута у корист перитуморског ткива). Ови подаци указују на то да перитуморско ткиво са локалним напредовањем тумора преузима од њега улогу у продукцији *CXCL-12* и временом постаје доминантан извор овог хемокина. Ниво експресије *CXCL-12* у перитуморском ткиву се значајно мења са порастом величине тумора (експресија *CXCL-12* у перитуморском ткиву T3 групе је већа 45 пута од T2, а чак 67.5 пута већа од T1), што опет сугерише веома значајне промене у молекуларном профилу перитуморског ткива током процеса раста и развоја тумора.

Код G1 градуса тумора виша је експресија *CXCL-12* у перитуморском ткиву него у самом тумору. Исти налаз је и код G3 градуса болести али је овај однос знатно већи у корист перитуморског ткива и износи 1: 16.7. Овај феномен је вероватно последица ниске диференцијације малигнућ ћелија код G3 градуса, тј. његове велике биолошке агресивности.

Неоангиогенеза не може да испрати бујање туморског ткива, услед тога долази до масовних некроза и једноставно нема довољно функционалних туморских ћелија које су у стању да породукују *CXCL-12*, те доминантну улогу у његовој производњи преузима перитуморско ткиво. Нажалост, нисмо успели да нађемо доступне литературне податке ради упоређивања.

Последњих неколико година, постоји велики интерес за откривањем нових биомаркера за праћење и рано дијагностиковање карцинома. Нажалост, и поред интензивних напора истраживача, недовољно брзо, или чак прекасно се дијагностикује карцином дојке. Наша студија се управо бавила истраживањем недовољно испитаних биомаркера *CXCL-12* и његовог рецептора *CXCR-4*, који по свему судећи треба да заузму битну улогу у предикцији прогнозе болести код пацијената са карциномом дојке.

Повишени нивои иРНК *CXCL-12* гена у перитуморском ткиву се налазе у случајевима T3, N2 и G3 (висока агресивност или узнатредовали тумор), док повишене вредности у туморском ткиву указују на вероватну појаву удаљених метастаза. Туморско ткиво жена старијих од 40 година експримира знатно више *CXCL-12* гена него перитуморско ткиво, док је код млађих жена већа експресија у перитуморском ткиву.

Разматрајући протеинску експресију *CXCR-4* у перитуморском и карциномском ткиву код испитиваних пацијената може се закључити да је експресија *VEGF<sub>165b</sub>* и *CXCR-4* рецептора већа у КТ у односу на ПТ. Треба узети у обзир да се ови рецептори не експримирају у здравом ткиву дојке, што сугерише да ПТ никако не представља здраво ткиво, јер под утицајем тумора постаје активни чинилац канцерогенезе, што потврђују представљени резултати. Такође, висока експресија ових рецептора у КТ може указати на лошију прогнозу болести.

### ***Експресија iNOS гена***

Обиље ангиогених стимуланаса индукује продукцију азот оксида (NO), који је важан интер- и интрацелуларни сигнални молекул синтетисан из L-аргинина у присуству азот моноксид синтетазе (NOS). Од три изоформе NOS-а, индуцибилна производи највеће количине NO и повезана је са бројним патологијама. Иако је њихова прецизна улога нејасна, индуцибилна и ендотелна NOS су укључене у процесе као што су прогресија тумора и ангиогенеза, и чини се да њихова активност зависи од дистрибуције, концентрације и трајања изложености, као и суштинске осетљивости ћелија на NO (Kostourou и сар., 2011). Тако, ниске концентрације NO у туморским ћелијама утичу на повећање експресије проангиогених и миграторних гена (*MMP-9*,

*VEGF*, *HIF-1 $\alpha$* ), док високе концентрације делују цитотоксично на туморске ћелије, подстичући експресију проапоптотских гена (Vanini и сар., 2015).

У овој студији смо испитивали генску експресију *iNOS* и везе са неоангиогентским потенцијалом код пацијената са карциномом дојке. Експресија *iNOS* гена је повезана са високим туморским градусом и агресивношћу. NO помаже или пак инхибира процес метастазирања, у зависности од његове концентрације (Burke и сар., 2013). Наше истраживање указује да је повишен ниво *iNOS* гена присутан како у самим туморским ћелијама, тако и у перитуморском ткиву, што је у корелацији са литературним подацима. Такође се могу наћи докази у базама података да ниво *iNOS* гена није повећан у нормалном ткиву дојке, тј. код бенигних лезија, што још једном потврђује нашу премису да перитуморско ткиво и здраво ткиво никако не треба поистовећивати. Доказано је да, уколико је повишен ниво *iNOS* гена и у самим туморским ћелијама, као и у перитуморским стромалним ћелијама, микроваскуларна густина је већа, што јасно указује на везу *iNOS* са неоангиогенезом, а прогноза болести је лошија (Vakkala и сар., 2000). Даље, из наших резултата се јасно примећује, да са порастом градуса тумора рапидно расте експресија *iNOS* гена у туморском ткиву, тако да је његов ниво према нашим налазима 38.5 пута већи код тумора G3 градуса, него код тумора G1 градуса, што је у сагласности са литературним подацима (Jin и сар., 2015).

Познато је да је висок градус тумора, тј његова ниска диференцијација показатељ биолошке агресивности тумора и лошег исхода болести, тако да и ниво *iNOS* гена у туморском ткиву може послужити као индиректан предиктор у прогнози болести код пацијената са карциномом дојке. Слична ситуација је и када је у питању величина тумора, тј што је тумор већи, експресија *iNOS* и у туморском и у перитуморском ткиву се повећава, тако да је у T3 стадијуму највиша и оба испитивана ткива, што се такође слаже са доступним подацима у литератури (Xu и сар., 2002; Jin и сар., 2015).

Метастаза карцинома представља ширење и раст туморских ћелија преко ангиогенезе, инвазије, колонизације и коначно пролиферације из оригиналне неоплазме ка другим органима, која може бити изузетно тешка за лечење и зато често доводи до смртог исхода (Cheng и сар., 2014). Азот моноксид је сигнални молекул који има различите патолошке и физиолошке улоге у организму. У последње две деценије се интензивно истраживала функција NO у регулацији формирања карцинома, напредовања и метастазирања. Наши резултати су показали да је далеко већа експресија *iNOS* гена у ткиву тумора који су метастазирали. *iNOS* и продуковани NO могу изазвати рано метастазирање индукцијом IL-8 и хемокинских рецептора као што је CXCR-4 (Yasuoka и сар., 2008), што је такође тема нашег истраживања. Активација HIF-1 промовише

експресију *iNOS*, а сличну функцију има и VEGF, што све у крајњој инстанци резултује активацијом неоангиогенезе са свим последицама на раст, развој тумора и појаву метастаза (Matrone и сар., 2004). На концепту блокаде *iNOS* је заснована експериментална терапија карцинома дојке, поготово агресивних облика, резистентних на конвенционалну терапију, као што је *triple negative* карцином дојке (Granados-Principál и сар., 2015).

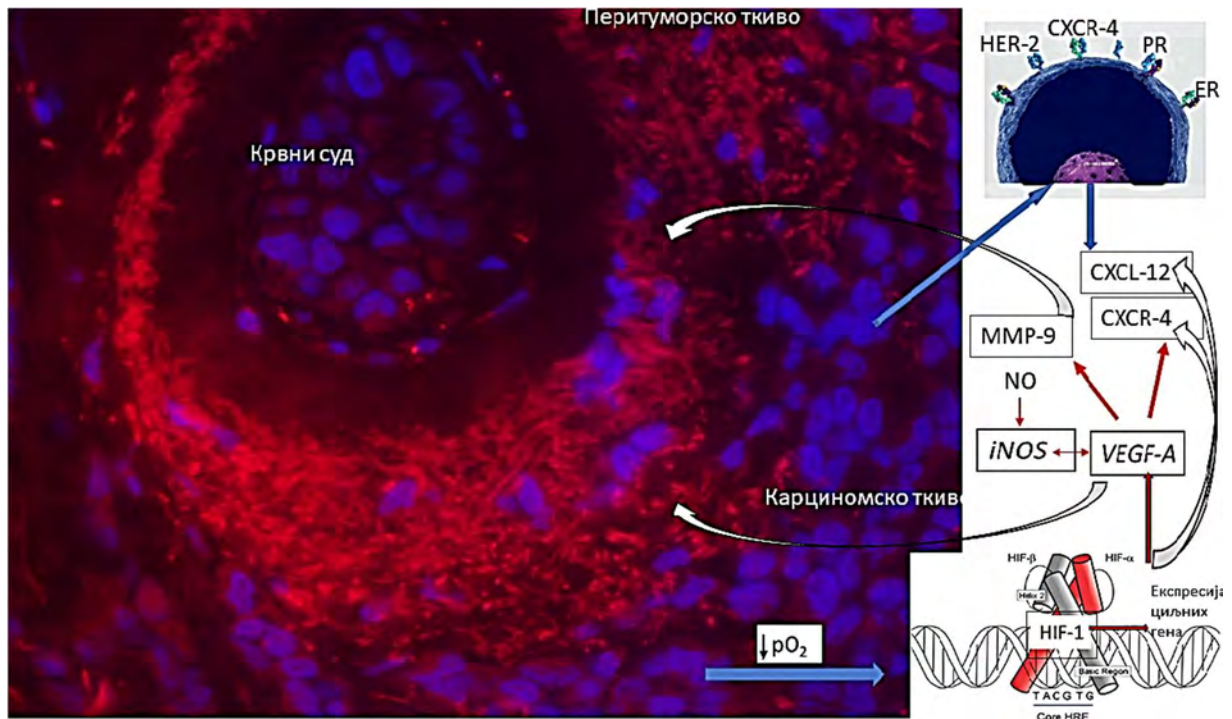
Наша студија показује да је експресија *iNOS* виша у ER и PR позитивним туморима, него у ER и PR негативним, што је у сагласности са литературним подацима (Martin и сар., 2000).

Експресија *iNOS*-а даље покреће читаву каскаду догађаја, повећавајући експресију *MMP-9* гена и на тај начин омогућава ангиогенезу, инвазију, као и појаву метастаза. Насупрот томе, када је експресија *iNOS* блокирана, туморска неоангиогенеза је супримирана. Интерлеукин-33, регулатор васкуларизације ткива, такође потпомаже пролиферацију, миграцију, ангиогенезу и васкуларну пермеабилност стимулацијом ендотелног NO кроз ST2/TRAF6-Akt-eNOS сигнални пут (Cheng и сар., 2014; Jiang и сар., 2014).

Наши резултати указују на јаку корелацију између експресије *iNOS* и појаве метастаза у регионалним лимфним нодусима. Овај наш закључак је у складу са литературним подацима (Nakamura и сар., 2006). Претпостављени механизам деловања је да *iNOS* индукује експресију *VEGF*, за који је добро познато да стимулише не само ангиогенезу већ и лимфогенезу, повећава пропустљивост лимфних судова, олакшава продор малигних ћелија у лимфоток и на тај начин оне долазе до својих првих баријера, тј. филтера-лимфних нодуса. На тај начин настају секундарни депозити-метастазе у регионалним лимфним нодусима. Уколико прођу и ову препреку, малигне ћелије улазе даље у циркулацију и долази до масовне дисеминације болести. Лимфонодални статус код карцинома дојке је добро познати предиктор исхода болести, као и детерминишући фактор за избор, како одговарајуће хируршке интервенције, тако и пре- или постоперативне хемио- и радиотерапије (Nakamura и сар., 2006).

На основу изнетих резултата, може се закључити да је ово једини ген чија је експресија већа у туморском ткиву лобуларног у односу на дуктални тип карцинома дојке. Стога проучавање експресије *iNOS* гена може послужити као биомаркер код пацијената са дијагнозом *Invasive Lobular Carcinoma*. Експресија *iNOS* се градијски повећава са порастом величине тумора, захваћеношћу лимфних нодуса, појавом удаљених метастаза и ниском диференцијацијом тумора.

На основу презентованих и продискутованих резултата ове студије, шема молекуларних механизма неоангиогенезе у туморском и перитуморском ткиву пацијенткиња са канцером дојке представљена је на **Слици 23**.



Слика 23: Молекуларни механизми неоангиогенезе код пацијената са карциномом дојке.

## Примена нестандартних модалитета лечења

### Електропорација

Електропорација представља релативно нов, обећавајући модалитет у лечењу карцинома, поготово када се узме у обзир да има минимална нежељена дејства, за разлику од стандардних форми антитуморске терапије као што су радиотерапија и хемиотерапија. Остале локалне аблативне технике као што су криоаблација, радиофреквентна аблација (RFA), аблација микроталасима, као и HIFU (терапија високофокусираним ултразвуком) представљају термалне технике, тј. путем локално генерисане топлоте уништавају циљне ткивне промене, али стога могу лако оштети околне осетљиве структуре (Wagstaff и сар., 2015). Са друге стране, електропорација је нетермална аблативна метода која штеди околно здраво ткиво и виталне структуре као што су крвни судови, нерви, околони органи. Ово је главна предност електропорације (Wagstaff и сар., 2016). У литератури су углавном описани радови са коришћењем високих волтажа, реда 200–

1000 V cm<sup>-1</sup>, где су ћелијска адхезија и преживљавање након електропорацијског третмана анализирани *crystal violet* и МТТ есејем (Pehlivanova и сар., 2012).

У нашој студији смо користили здраве и канцерске ћелијске линије хуманог порекла као модел систем за тестирање цитотоксичних ефеката електропорације и елктрохемиотерапије. Такође, коришћене су релативно ниске волтаже у циљу налажења електропорацијског третмана који би имао селективан цитотоксични ефекат, тј. који би уништавао само карциномске а штедео здраве ћелије. Континуирани *real-time* мониторинг ћелијске вијабилности *in vitro* је изведен коришћењем биосензор *RTCA* технологије. *xCELLigence* је валидиран у студијама које су изучавале комплексна ћелијска понашања као што су вијабилност, миграција и одговор на лекове (Kho и сар., 2015). На основу сагледавања литературе, у нашој студији је први пут коришћена *RTCA* технологија за мониторинг цитотоксичних ефеката електропорације на адхерентне ћелијске линије.

Ефекти електропорације на испитиваним ћелијским линијама карцинома дојке (MDA-MB-231) и дебелог црева (SW-480 and HCT-116) су упоређивани са утицајем на здраве ћелијске линије (MRC-5, hAoSm, HUVEC). Фибробласти MRC-5 линије су коришћени као модел систем здраве ћелијске линије, јер се околина тумора углавном састоји од ћелија које потичу од фибробласта. Такође, добро је познато да фибробласти имају модулишућу улогу у процесу развоја тумора и његовој прогресији (Туан и сар., 2011). Ћелијске линије hAoSm и HUVEC су коришћене као контрола, јер су артеријски и венски крвни судови присутни у готово свим ткивима. Обично се користе као лабораторијски модел системи за проучавање функције и патологије ендотелних ћелија и ангиогенезе (Park и сар., 2006), што је у складу са тематиком дисертације - испитивање молекуларних механизма неоангиогенезе.

На основу добијених резултата се може закључити да излагање *triple negative* ћелијске линије карцинома дојке MDA-MB-231 волтажним пулсевима до 500 V cm<sup>-1</sup> води брзом али привременом поремећају вијабилности и тај процес је био зависан од јачине електричног поља. После 24 сата од третмана, репаративни ћелијски механизми су надвладали и ћелије су почињале да се опорављају и опет пролиферишу, указујући да примењено електрично поље, ове јачине и дужине експозиције, није било довољно да уништи ћелије канцера дојки. Са порастом примењене волтаже, репаративни ћелијски механизми су постајали инсуфицијентни и могућност ћелија да се опораве након електропорацијског третмана је постајала све мања. Једина терапијска могућност када је у питању овај тип ћелија је била електропорација у иреверзибилном моду, када је аблација постигана високим волтажама. Овај закључак је сагласан са литературним подацима

(Neal и сар., 2010), где је описано да  $1000 \text{ V cm}^{-1}$  поље може бити коришћено за постизање аблативног ефекта код MDA-MB-231 изолованих из женки Nu/Nu мишева.

Такође, наши резултати су конзистентни са литературним и када је у питању утицај електропације на фибробласте, углавном када су у питању ниже волтаже до  $500 \text{ V cm}^{-1}$ . Литература описује као механизам оштећења ових ћелија поремећај цитоскелетних структура (Pehlivanova и сар., 2012). Примена електропације високим волтажама на MDA-MB-231 ћелијама изазива иреверзибилни ефекат када се постиже аблација, али примена нижих волтажа има сасвим другачију намену, тј може се вршити трансфекција ( $400 \text{ V cm}^{-1}$ ) (Chopiniet и сар., 2013). Нашли смо потенцијалну искористљивост за електропацију волтажа реда  $150\text{--}437,5 \text{ V cm}^{-1}$  на ћелијску линију карцинома колоректума SW-480, јер у овом случају електропација изазива трајна оштећења карциномских ћелија које умиру након 72 h од третмана (иреверзибилне електропације) док се здраве ћелије MRC-5 опорављају 72 h након третмана (реверзибилне електропације). Код друге две здраве ћелијске линије (hAoSm и HUVeC) које смо испитивали долазило је чак до пролиферативног ефекта након третмана. На овај начин, успели би смо да постигнемо високо жељени циљ модерне онкологије, тј. успели би смо да уништимо само карциномске ћелије, за разлику од агресивних третмана који се данас примењују у лечењу.

На основу досадашњих резултата, предпостављамо да би било потребно понављати електропацијски пулс након одређеног периода времена у циљу да се повећа деструктивни ефекат на карциномске ћелије и да се дефинитивно униште преостале карциномске ћелије. Ми предлажемо да тај интервал не буде краћи од 72 h јер је толико времена потребно здравим ћелијама да се опораве, а за карциномске ћелије тај период није довољан. На тај начин се може постићи кумулативно дејство на карциномске ћелије, без оштећења здравог ткива, тј. постиже се максималан цитотоксични ефекат на малигно ткиво, са минималним оштећењем околног, здравог ткива. То заиста и јесте принцип коме се тежи и који се користи и у примени других стандардних метода антинеопластичног лечења (Angus и Piotrowska, 2014).

Добијени резултати указују да ЕП третман под истим условима има различит утицај на различите ћелијске линије истог порекла (HCT-116 и SW-480). Разлика може бити приписана различитим биолошким карактеристикама испитиваних карцинома колона. Мада имају исто ћелијско, тј. хистолошко порекло као и SW-480, HCT-116 ћелије показују комплетан опоравак (72 h након третмана) након иницијалног цитотоксичног ефекта електропације. Постоји мутација на p53 гену као и његова висока експресија код SW-480 ћелијске линије (Rodrigues и сар., 1990), и ове ћелије су боље реаговале на ЕП, независно од дужине експозиције. Са друге стране, HCT-116 ћелије имају дефицит у ДНК *mismatch repair* систему, са мутацијом на *hMLH1*



гену (Boyer и сар., 1995). *MLH1* ген припада *MMP (mismatch repair)* генима који имају кључну улогу у корекцији грешака које се јављају приликом процеса репликације ДНК. *MLH1* ген је осетљив на метилацију промотора, која води његовој инактивацији и последичној микросателитској нестабилности (Samimi и сар., 2000). То је један од узрока терапијске резистенције овог типа карцинома. За разлику од високих волтажа које се користе у сврху нетермалне аблације (Neal и сар., 2010; Pehlivanova и сар., 2012), ми смо користили ниске волтаже, до  $675 \text{ V cm}^{-1}$ , у циљу да пронађемо онај опсег у коме би ЕП селективно деловала искључиво на карциномске ћелије. Оваква селективност је пронађена у опсегу 375 до  $437.5 \text{ V cm}^{-1}$ . Мора се нагласити да је овај ефекат зависио од типа ћелија. Уочен је само код једне ћелијске линије (SW-480), док је код других изостао.

Постоје два типа индукције ћелијске смрти и то су апоптоза и некроза. Ово је значајно са становишта антиканцерске терапије (Lin и Baehrecke, 2015). Макрофаги порепознају ране промене које настају током процеса апоптозе веома брзо и превенирају појаву инфламације и имуног одговора, док некротичне ћелије увек изазивају инфламацију, тј. упални процес и одговор имуног система (Savill Fadok, 2000). Индукција некрозе током антинеопластичне терапије је повезана са инфламацијом и оштећењем околних ћелија, док је апоптоза ограничена на појединачну ћелију и представља пожељан, боље организован процес уклањања старих, оштећених или карциномских ћелија. Апоптоза се још назива и контролисана ћелијска смрт, “програмирана ћелијска смрт”, што је процес који захтева утрошак АТФ (de Miguel и сар., 2016).

Резултати су показали да нижа волтажа од  $375 \text{ V cm}^{-1}$  доминантно изазива рану апоптозу (осим за SW-480 ћелије), док је висока волтажа од  $675 \text{ V cm}^{-1}$  повећавала проценат касне апоптозе и некрозе код свих ћелијских линија карцинома. Треба нагласити да је значајан проценат спонтане апоптозе у контролним (нетретираним) ћелијама карцинома дојке и колоне (до 8.57% за MDA-MB-231 ћелије), у односу на здраве MRC-5, hAoSm HUVEC (0.4, 0.2 и 0.5%). Ово запажање потврђује нестабилност карциномских ћелија на молекуларном нивоу (Napotnik и сар., 2016). Наше истраживање је показало да електропорациони третман ( $375 \text{ V cm}^{-1}$ ) доводи до значајног повећања броја ћелија у апоптози, што је један од механизма за заустављање туморског раста (Veebe и сар., 2002). Са порастом интензитета поља, ефекти на ћелије су израженији. Наши резултати су показали да са повећањем волтаже поља долази до повећања броја ћелија које су у некрози. Више волтаже узрокују трајно отварање пора на ћелијској мембрани, што доводи до неконтролисаног уласка јона из екстрацелуларног простора и услед недостатка АТФ за обновљање хомеостазе, све већи број ћелија улази у некрозу (Silve и Mir, 2011). Коришћењем ове методе, закључили смо да коришћење нижих волтажа ( $375 \text{ V cm}^{-1}$ ) води

апоптози као доминантном типу ћелијске смрти, док високе волтаже ( $675 \text{ V cm}^{-1}$ ) углавном узрокују некрозу.

Резултати добијени флуоресцентном микроскопијом се подударају са претходно наведеним добијеним коришћењем *RTCA*. Додатна корист од АО/ЕВ анализе је то што се може одредити тип ћелијске смрти, а што се не може постићи употребом *RTCA* методе. Користили смо методологију примене појединачног пулса јер су претходне анализе показале боље преузимање обојених молекула применом појединачних пулсева. Резултати су показали да је у нетретираној групи проценат ћелија које су у спонтаној апоптози занемарљив у односу на број ћелија у апоптози након ЕП третмана. Тада се налазе карактеристичне промене видљиве флуоресцентном микроскопијом као што су скупљање, формација микронуклеуса, фрагментација и кондензација хроматина, *blebbing*, као и формирање апоптотских тела (Munoz-Pinedo, 2012). У нашим лабораторијским условима, како здраве, тако и карциномске SW-480 ћелије су показале већу сензитивност на ЕП третман ( $375\text{--}437.5 \text{ V cm}^{-1}$ ), код којих је тумор супресор p53 ген мутиран. Остале изучаване ћелијске линије су се опорављале након ЕП третмана.

Наши резултати показују да различити карциноми различито реагују на исти електропорацијски третман. За ћелијску линију SW-480 карцинома колона смо пронашли електропорацијске услове при којима долази до иреверзибилног оштећења карциномских, али не и контролних здравих MRC-5, hAoSm и HUVEC ћелијских линија, и то у опсегу  $375\text{--}437.5 \text{ V/cm}^{-1}$ . Када се упореди утицај електропорације на *triple negative* ћелијску линију карцинома дојке MDA-MB-231 и колон канцерску ћелијску линију HCT-116 са утицајем на здраве ћелијске линије MRC-5, hAoSm и HUVEC, закључује се да селективност у смислу да се униште само болесне ћелије а поштеде здраве, не може бити постигнута. Нашли смо да тип ћелијске смрти зависи од услова електропорације, тј. примењене волтаже, дужине експозиције, али и од особина самих третираних ћелија. Тако, ниже волтаже доводе до апоптозе, док висока волтажа код свих ћелија изазива некрозу.

Компјутерска симулација може бити веома корисна у предвиђању ћелијског понашања у условима ЕП. Ћелијске линије су прилично скупе и њихово узгајање захтева доста времена и труда. Стога, овај тип симулације може бити веома користан, јер штеди време и труд истраживача као и уложен новац. На бази експеримената у којима смо испитивали утицај ЕП на одређену ћелијску линију од сакупљених података се формира база података. Коришћењем представљеног нумеричког модела могуће је нумерички проценити проценат вијабилних ћелија у сваком моменту након ЕП третмана (Cvetković и сар., 2017). Презентовани модел разматра неколико биолошких аспеката – агресивност тумора, интеракцију између карциномских ћелија, ефекат

утрошка кисеоника, итд. Добро слагање експерименталних и резултата добијених компјутерском симулацијом показује да модел може бити успешно коришћен за предикцију понашања ћелија под условима електропорације какви нису конкретно коришћени у експерименту, тј. можемо испитивати шта би се вероватно дешавало под условима експозиције (дужина, број пулсева, интензитет поља, итд.) које нисмо користили у конкретном експерименту. Улазни параметри добијени конкретним експерименталним испитивањима се користе за израду базе података, коју користи поменути софтвер. Ово може побољшати планирање будућих експеримената и дати додатна објашњења која су у вези са ефектима ЕП на испитиване ћелијске линије.

#### ***Ефекат електрохемиотерапије на ћелијским линијама***

Електропорација се може користити у ирверзибилном модусу, када се постиже трајно отварање пора на ћелијској мембрани, што доводи до смрти ћелије због губитка хомеостазе у инфлуксу и ефлуксу јона. Тиме се постиже аблативни ефекат на ткиво, тј долази до смрти третираних ћелија (Маог и сар., 2009). Такође, електропорација се користи и у реверзибилном моду, тј апликацијом струје одређених особина може се изазвати привремено отварање мембранских пора, том приликом у ћелију могу ући неки макромолекули који иначе не могу проћи кроз мембрану, а потом долази до затварања пора и ћелија се враћа у првобитно стање. Уколико се реверзибилна електротерапија користи да би се у ћелију убацило антинеопластично средство, тј цитостатик, онда се овакав вид терапије назива електрохемиотерапија (Miklavčič и сар., 2015). Међутим, овакав вид терапије још увек није широко заживео у клиничкој пракси, упркос својим очигледним предностима. Пре свега њеном употребом се постиже ефекат локалне хемиотерапије, тј употребом веома мале концентрације цитостатика се постиже врло висока (и до 100 пута већа) концентрација цитостатика у циљном региону ткива, док су количине цитостатика које одлазе у слободну циркулацију веома мале. Тиме се постиже двојаки ефекат; прво, концентрација цитостатика у третираном ткиву је вишеструко већа а тиме и учинак лека, док су са друге стране бројна и добро позната системска нежељена дејства, блиско скопчана са употребом антинеопластичне терапије, вишеструко умањена због незнатне количине лека који се дистрибуира циркулацијом.

Мали број тумора, као што су меланом, тумори мокраћне бешике, итд. је био предмет проучавања ефеката електрохемиотерапије према доступној литератури. Ми смо испитивања вршили на ћелијским линијама карцинома дојке. Литературно је познато да неки антинеопластични агенси имају знатно већи учинак уколико се користе у оквиру електрохемиотерапије, него када се користе у стандардним режимима хемиотерапије. Један од таквих лекова је паклитаксел, за који је доказано да оваквим модусом терапије постиже већу концентрацију у ткиву него приликом стандардне апликације (Miklavčič и сар., 2015). Наша истраживања су показала цитотоксичан ефекат паклитаксела на MDA-MB-231 и MCF-7 ћелијама карцинома дојке у свим праћеним временским интервалима.

Када је у питању електрохемиотерапија паклитакселом, ово дејство се значајно повећава код обе ћелијске линије. Наши претходни налази су показали велику резистентност MDA-MB-231 ћелијске линије на дејство електропорације. Само у случају коришћења високих напона, који су у исто време имали јако цитотоксично дејство и на здравим линијама, MDA-MB-231 ћелије су показивале високи степен некрозе (Cvetković и сар., 2017). *Triple-negative*, MDA-MB-231 метастатска ћелијска линија карцинома дојке је изолована из плеуре пацијента са карциномом дојке (Duffy et al., 2008). Представља добар модел систем за анализирање потенцијалних видова терапије за ову врсту карцинома. Третман паклитакселом у комбинацији са електричним пољем је код ових ћелија је показао 2.59 пута већу цитотоксичност у односу на апликацију овог лека без електропорације, 72 сата од третмана.

MCF-7 метастатска ћелијска линија карцинома дојке, такође изолована из плеуре, представља добар *in vitro* модел за проучавање механизма ендокрине терапије, будући да има експримиране рецепторе за естроген и прогестерон (Levenson и Jordan 1997). MCF-7 ћелије су показале већу осетљивост на електрохемиотерапијски третман паклитакселом у односу на MDA-MB-231. Тако је електрохемиотерапија код ових ћелија имала 6.40 пута већу цитотоксичност у односу на апликацију само паклитакселом. Електрохемотерапија се може користити изоловано или у комбинацији са хируршким третманом. Доказана је њена ефикасност у неoadјувантном модалитету. Наиме, до одређених тумора је хируршки тешко доћи, како због присуства важних физиолошких структура (нпр. нерава и крвних судова) или због потенцијалног оштећења на другим органима, или неког другог разлога. Електрохемиотерапија се може користити у циљу смањења тумора пре хируршког уклањања, тј. да би се тумор увео у операбилан опсег, односно превео из неоперабилног у операбилни стадијум. Нажалост, електрохемиотерапија као адјувантна терапија у циљу стерилизације евентуално заосталих малигних ћелија након хируршке интервенције, колико је нама познато, за сада није објављена у литератури (Sabula,

2012; Wiater и сар., 2013). Друга веома значајна карактеристика електрохемиотерапијског лечења је та да ова метода не спада у тзв. термичке методе, тј локално генерисање топлоте није метода којом се уништавају малигне ћелије. На тај начин се електрохемиотерапијом могу третирати тумори који су у блиској вези са важним органима или структурама као што су крвни судови, који се другим, термичким методама лако могу повредити и довести до крварења које је веома тешко контролисати. Такође, нема ефекта преноса топлоте крвном струјом у близини великих крвних судова, што је карактеристично за термичке методе (Gargiulo и сар., 2012; Mozzillo и сар., 2012).

### ***Ефекти фитотерапије на неоангиогенетске параметре на MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијским линијама***

Упркос оствареном напретку у дијагностици и терапији карцинома дојке, искорак који је остварен у продужењу просечног преживљавања код пацијената са узнапредовалим метастазама је готово безначајан. Интеракција између тумора и туморског окружења је веома значајна у процесима инвазије и метастазирања, тако да и сама терапија мора да разматра болест као целину тј. укључујући и тумор и перитуморско окружење (Zibara и сар., 2015).

Превенција и третман карцинома подразумевају често употребу лекова и суплемената који су природне супстанце, а не синтетичке, укључујући екстракте биљака. За многе од њих је у експерименталним условима доказано да имају цитотоксично дејство, или да имају способност да инхибирају инвазивност, ангиогенезу или процес метастазирања (Dai и Mumper, 2010). Биолошки ефекти које биљке индукују зависе од врсте и концентрације биоактивних супстанци у свом саставу. Према литератури *R. pseudoacacia* у свом хемијском саставу садржи полифенолне компоненте попут танина и специфичних монотерпена. Највећи садржај полифенола нађен је у екстракту лишћа. HPLC анализа је показала присуство катехина, рутина, резератрола и кверцетина у лишћу ове биљне врсте (Marinas и сар., 2014). Из *A. fruticosa* су изоловани изофлавонони, флаванони и ротеноиди (Jakovljević и сар., 2015). Изоловани глукозиди изофлавонона су глукопиранозиди. Изоловани флаванон је 5,7,3'-трихидрокси-6,8,5'-триизопренил-4'-метоксифлавонон, поред једињења: аморин, изоаморин, кверцетин, формонетин, аморфа хинони и диметилмедикарпин (Ohuma и сар., 1998).

У нашој студији смо испитивали утицај екстраката биљака *R. pseudoacacia* и *A. fruticosa* на здравим MRC-5 и карциномским MDA-MB-231 ћелијским линијама. Претпоставља се да одређени феноли и флавоноиди представљају активне супстанце код ових биљака (Cvetković и

сар., непубликовани резултати). Код *R. pseudoacacia*, *quercetin* је најзаступљенији флавоноид, док је од фенолних киселина најчешћа хлорогенична киселина и 3-НВА (*3-hydroxybenzoic acid*), тако да се биоактивно дејство приписује њима. Код *A. fruticosa*, најзаступљенија фенолна киселина је 3-НВА, док су најзаступљенији флавоноиди *epicatechin*, *catechin* и *rutin* (Cvetković и сар., непубликовани резултати). Наши резултати су показали да је MDA-MB-231 ћелијска линија отпорнија на испитиване третмане, што је у сагласности са литературним подацима (Chavez и сар., 2010).

Анализирана је експресија добро познатих гена туморске инвазивности као што су *MMP-9*, *VEGF-A*, *HIF-1α*, *CXCL-12* и *iNOS* гена у здравим и карциномским ћелијама. Наши налази су показали да су ови гени веома експримирани у нетретираним метастатским ћелијама карцинома дојке у односу на здраве, контролне ћелије, те стога представљају добар модел систем за оваква истраживања.

Резултати су показали снажно анти-инвазивно дејство испитиваних биљних екстраката путем инхибиције генске експресије. Након третмана екстрактима *R. pseudoacacia* и *A. fruticosa* релативна експресија *VEGF-A*, *HIF-1α*, *CXCL-12* и *iNOS* је била статистички значајно нижа у свим случајевима у односу на контролну групу. Експресија *MMP-9* гена је такође инхибирана, након свих третмана, код обе ћелијске линије, са изузетком третмана *R. pseudoacacia* (100 µg/ml) када су у питању MRC-5 ћелије. Израженију активност је показала *A. fruticosa* него *R. pseudoacacia*. Доказано је да су тестирани екстракти биљака снижавали генску експресију свих параметара инвазије (*MMP-9*, *VEGF-A*, *HIF-1α*, *CXCL-12* и *iNOS*) у поређењу са контролном групом, указујући на велики антиинвазивни потенцијал ових биљака и могућу терапијску примену.

Израженији анти-инвазивни потенцијал *A. fruticosa* у односу на *R. pseudoacacia* је последица веће концентрације биолошки активних фенола, сугеришући да није важан само састав већ и количина, тј. концентрација активних супстанци у екстрактима биљака. *Catechin* и *epicatechin* су најчешћи флавоноиди у *A. fruticosa*. У литератури се могу наћи подаци, који указују да *catechin* пореклом из зеленог чаја може инхибирати експресију *MMP-9* (Demeule и сар., 2000).

*Quercetin*, *epicatechin*, *catechin* и *rutin* су флавоноиди и представљају биолошки активне супстанце воћу, поврћу и у многим другим биљкама, укључујући и *R. pseudoacacia* и *A. fruticosa*, које су биле тема нашег истраживања. Поједине студије су описале антитуморску активност *quercetin*-а путем инхибиције инвазивног потенцијала код различитих типова карцинома, укључујући карцином дојке. Један од описаних механизма којим он постиже биолошку активност је *downregulation* *MMP-9*, добро познатог предиктора карциномске инвазивности и прогресије малигне болести. Претпостављени механизам дејства је *quercetin*-ом посредована

супресија MMP-9 генске експресије путем блокирања протеин киназе C (PKC) сигналног пута (Lin и сар., 2008). Могући механизми антитуморског дејства *epicatechin* и *catechin*-а су бројни и уључују антиоксидативне и прооксидативне активности, углавном посредоване реактивним врстама кисеоника, инхибицијом ензимске активности, инхибицијом рецептора тирозин киназе, епигенетски механизми, ефекти на microRNA, итд. Доказано је да *epicatechin* и *catechin*, присутни у испитиваним биљкама, могу инхибирати VEGF-индуковану ангиогенезу, један од главних фактора који утичу на карциномску прогресију. Описани молекуларни механизам је супресија тирозинске фосфорилације, снижење експресије *VEGF* транскрипта, *c-jun* транскрипта, *c-fos* транскрипта, као и PKC (Lamy и сар., 2002). Наши резултати су у сагласности са литературним. Највећа супресија *VEGF* гена је постигнута код MRC-5 ћелијске линије након третмана *A. fruticosa* у концентрацији 10 µg/ml.

*Epicatechin* и *catechin* могу да повећају експресију, главне microRNA (mir-210) регулисане од стране HIF-1α. То је повезано са привремено стабилизованим HIF-1α код карциномских ћелијских линија након третмана *epicatechin* и *catechin*-ом. Ова два флавоноида се такође могу везати за кисеоник зависни деградациони домен HIF-1α, који представља промотор који реагује на хипоксију, а што даље спречава хидроксилација-зависну убиквитинацију и деградацију HIF-1α (Wang и сар., 2015).

Према нашем сазнању нема доступних литературних података који би описивали улогу смањења CXCL-12 у ћелијским линијама, након третмана наведеним екстрактима биљака, упркос важној улози CXCL-12 у процесима карциномске инвазије и прогресије.

*Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* показују антиинвазивни ефекат на метастатским ћелијама карцинома дојке MDA-MB-231. Испитивани екстракти супримирају експресију гена кључних у инвазивним, ангиогеним и метастатским процесима карцинома (*MMP-9*, *VEGF-A*, *HIF-1α*, *CXCL-12* и *iNOS*). Наши резултати сугеришу да је одабир ћелијских линија за овакав вид истраживања јако битан, будући да су у контролним нетретираним линијама карцинома дојке квантификовани високи нивои мРНК инвазивних гена, за разлику од здраве ћелијске линије. На основу изванредног антиинвазивног потенцијала *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* могу бити погодне за коришћење као суплементи у антитуморској терапији. Ово истраживање представља добру основу за даље испитивање молекуларних механизма антитуморског потенцијала *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* и проналажење везе између активних супстанци из ових биљака са антитуморском активношћу.

## *Data mining*

Клиничари су данас “затрпани” обиљем података који су доступни у научним радовима, у којима се наводи њихов “огроман значај”, те им је веома тешко да објективно процене утицај сваког појединачног фактора који може бити значајан у настанку и прогресији малигне болести. Да би се извршила објективизација, тј. смањено субјективни утицај лекара клиничара приликом доношења одлуке о оптималном модалитету лечења сваког појединачног пацијента, прибегава се модерним софтверским решењима. Ови софтвери се заснивају на системима вештачке интелигенције и *data mining*-а који су у стању да баратају огромном количином података и издвоје оне факторе који имају највећи значај у патогенези болести, у овом случају, карцинома дојке. Наше истраживање не представља само теоретско разматрање, већ је засновано на реалним базама података у петогодишњем периоду праћења.

Постоји константна тенденција у научним круговима да се пронађе појединачни маркер који ће имати високу специфичност и сензитивност и који ће моћи да укаже на појаву или развој малигне болести (Li и сар., 2015). Наша хипотеза је да одговор вероватно не лежи у појединачном параметру, већ је то одређена комбинација параметара који се рутински истражују. Циљ је био да развијемо предикциони модел за процену дужине преживљавања, појаве рецидива и метастаза код пацијенткиња са карциномом дојке. У ту сврху смо користили базу података од 146 пацијенткиња са карциномом дојке која је садржавала податке који се рутински прикупљају код оваквих пацијената у преоперативном периоду, током операције, као и накнадном патохистолошком обрадом препарата. Користили смо комерцијалне софтвере који су специјално тренирани за ову намену. На тај начин смо за сваку пацијенткињу успели да креирамо биолошки профил тумора, што представља основу за индивидуализацију терапије (Li и сар., 2015).

Пожељно је да се испита више ML (*Machine Learning*) система док се не открије који даје најтачнију прогнозу исхода болести. У доступној литератури се може пронаћи обиље података који описују употребу различитих софтвера овог типа у процени исхода болести код пацијената са карциномом дојке. Park и сарадници су у свом истраживању користили SEER базу података да упореде ANN (AC=0.65±0.02), SVM (AC=0.51±0.01) и *Semi Supervised Learning*–SSL (AC=0.71±0.02) са циљем поуздане предикције 5-огодишњег преживљавања код пацијената са карциномом дојке (Park и сар., 2013), док су Karim и Zand користили исту базу података упоређивали вредност ANN (AC = 0.865), DT (AC = 0.867) и NB (AC = 0.845) (Karim и Zand 2015). Kim и сарадници су развили модел за процену појаве рецидива карцинома дојке коришћењем SVM (AC = 0.846) и ANN (AC = 0.812) коришћењем базе података *Breast Cancer Centre*, Јужна Кореја (Kim и сар., 2012). Maglogiannis и сарадници су развили интелигентни систем за прогнозу



исхода код пацијената са карциномом дојке користећи SVM базирани класификациони модел (Maglogiannis и сар., 2009). Коришћењем *American College of Surgeons' Patient Care Evaluation (PCE)* базе података, као и *National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results Breast Carcinoma* базе података, Burke и сарадници су закључили да ANN постиже статистички значајно прецизније резултате када је у питању предикција 5-огодишњег периода преживљавања у поређењу са стандардно коришћеним TNM класификационим системом ( $ACTNM = 0.720$ ,  $ACANN = 0.770$  и  $ACTNM = 0.692$ ,  $ACANN = 0.730$ , респективно) (Burke и сар., 1997). Такође, Štrumbelj и сарадници су користили *machine learning* системе за предикцију рецидива карцинома дојке и добили су податке који су компатибилни са онима које су добили онколози на основу стандардне дијагностичке обраде и праћења на истим пацијентима (Štrumbelj и сар., 2010).

Ми смо најбоље резултате у предикцији 5-огодишњег преживљавања добили коришћењем *Naive Bayes* алгоритма за класификацију –  $AC = 0.856$ ,  $SENS = 0.731$ ,  $SPEC = 0.918$ ,  $AUC = 0.873$ , док смо најбоље резултате у предикцији појаве рецидива и метастаза добили коришћењем ANN класификационог модела ( $AC = 0.9315$ ,  $SENS = 0.964$ ,  $SPEC = 0.833$ ,  $AUC = 0.952$ ) (Cvetkovic и сар., 2017). Резултати су компатибилни са литературним (Papadopoulos и сар., 2008).

За овакав тип истраживања је неопходна интеграција различитих типова података, некада и из више база (Papadopoulos и сар., 2008). Пројекат DREAM комбинује клиничке параметре са онима добијеним имунохистохемијским анализама, што је доста слично нашем истраживању (Paik и сар., 2004; Parker и сар., 2009; Cuzick и сар., 2011; Vilal и сар., 2013). Веома је битна величина базе података, тј. са повећањем броја испитиваних пацијената расте и тачност предвиђања, али свакако је битан и квалитет базе података, за шта нам могу бити веома корисне разлиците ML технике (Kougo и сар., 2014). Такође, потребно је обезбедити добру калибрацију, поготово када се узме у обзир да доступне базе података потичу из различитих земаља, са различитим здравственим системима и различитим критеријумима за укључивање у студију (Mauguen и сар., 2015).

Коришћењем овакве компјутерске обраде могуће је предвидети вероватноћу петогодишњег преживљавања, рецидива и метастаза са веома високом тачношћу, свега неколико дана након хируршке интервенције, тј. одмах након патохистолошке обраде узорака, са свим импликацијама на онколошки третман, што заиста представља напредан вид индивидуализације онколошке терапије.

Са напретком генетике, молекуларне биологије и протеомике, многе *data mining* студије су се значајно помериле у овом правцу. Иако постижу висок ниво тачности, оваква истраживања

су прилично скупа, захтевају софистицирану опрему и обучен кадар, тако да су доступна само већим центрима (Listgarten и сар., 2004). Ми смо такође желели да сет параметара који смо обрађивали на горе наведени начин обогатимо параметрима који су изабрани на основу анализе литературних података, а који не представљају стандардну палету испитивања која се рутински спроводи на оваквим пацијентима. У ту сврху смо креирали нову базу података од 50 пацијенткиња са карциномом дојке, која је поред стандарних, претходно коришћених параметара садржала и параметре како туморског, тако и перитуморског ткива. У базу података су увршћене протеинска концентрација MMP-9 и експресија *VEGF*, *HIF-1*, *CXCL-12* и *iNOS* гена у туморском и перитуморском ткиву. Најбољи доказ исправног избора додатних параметара из туморског и перитуморског ткива је чињеница да се након аутоматизоване обраде базе података, коришћењем ML система вештачке интелигенције, добио редуковани сет од 9 најважнијих параметара, који имају највећи значај у предикцији појаве метастаза, а који је садржао свих 5 наведених додатних параметара. Најбољи резултати у предикцији појаве метастаза у овом сету података су постигнути коришћењем SVM (*Support Vector Machine*) алгоритма. Према доступним литературним подацима наша студија је прва која користи *data mining* методологију обраде података, а да су *input* параметри молекуларни маркери не само туморског, већ и перитуморског ткива код пацијената са карциномом дојке.

На овај начин, комбинацијом клиничких, патохистолошких и молекуларних параметара туморског и перитуморског ткива као *input* параметара за *data mining* софтвер можемо са великом вероватноћом (око 90%) предвидети да ли ће код сваког појединачног пацијента доћи до појаве метастаза. Све то наравно има огромни значај у избору даљег онколошког третмана, што представља практичну, клиничку примену индивидуализоване терапије, тј. уколико софтвер предвиђа појаву метастаза са великом вероватноћом, код таквих пацијента агресивна онколошка терапија је обавезна. У супротном, пацијенткиња може бити поштеђена бројних нежељених дејстава онколошке терапије, која у овим случајевима не би била оправдана.

Коришћење наведеног софтвера може указати на групу пацијената са повећаним ризиком од појаве метастаза, што је свакако једна од најважнијих информација на основу које се доноси одлука о даљем лечењу, међутим не треба потценити ни групу пацијената која бива прекомерно третирана. Наиме, студије указују да иако агресивна терапија код карцинома дојке има за циљ спречавање прогресије болести, чак око 70% пацијенткиња би преживело и без њега. За сваку пацијенткињу којој овакав третман спашава живот, процењује се да 3 пацијенткиње бивају подвргнуте непотребном, прекомерном лечењу (Lee и сар., 2015).

На крају треба поменути да код неких типова карцинома као што је карцином дебелог црева, није доказана предност коришћења *data mining* система у предикцији исхода болести у односу на стандардну TNM класификацију. Алгоритми који користе вештачку интелигенцију као обавезне параметре свакако треба да садрже параметре TNM класификације (Гао и сар., 2012). Доказано је да додатак клиничких параметара као што је величина тумора и статус лимфних нодуса свакако повећавају предикциону вредност коришћења система заснованих на углавном генетским детерминантама (Martin и сар., 2016). Наша студија је у сагласности са напред наведеним, јер се међу 9 најзначајнијих параметара за предикцију метастаза поред 5 одабраних, нестандартних маркера туморског и перитуморског налазе и величина тумора (T) и лимфонодални статус (N), као и хормонски (ER) и рецепторски статус (HER 2) тумора.

## VI ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата истраживања докторске дисертације могу се издвојити:

### Општи закључци

- Карцином изазива промене у туморском и перитуморском ткиву детектабилне на молекуларном нивоу, које нису евидентирани на патохистолошком налазу. Није довољна само детаљна анализа туморског, већ обавезно и перитуморског ткива, јер се често значајније промене на молекуларном нивоу дешавају у микроокружењу карцинома. Перитуморско ткиво није само пасиван чинилац, већ активно учествује у процесу раста и развоја тумора, као и у процесима рецидивирања и појаве метастаза.
- Маркери неоангиогенезе у туморском и перитуморском ткиву као што су концентрација MMP-9, експресија иРНК *VEGF-A*, *CXCL-12*, *HIF-1* и *iNOS* гена као и протеинска експресија VEGF и CXCR-4 рецептора, могу послужити као поуздани предиктори исхода болести код пацијената са карциномом дојке, што може дати корисне сугестије у избору третмана.
- Електропорација и електрохемиотерапија су на изучаваним ћелијским линијама дале обећавајуће резултате, нарочито у компарацији ефеката између карциномских и здравих ћелија, што као резултат дисертације доприноси томе да ове методе полако улазе у клиничку праксу, али су додатна испитивања неопходна.
- Фитотерапија екстрактима инвазивних врста биљака *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* су показале антиинвазивно дејство на ћелијској линији карцинома дојке.
- *Data-mining* техника обраде података заснована на компјутерским експертским системима вештачке интелигенције може обрадити претходно наведене изучаване параметре, тако да кориснички оријентисан софтвер изврши веома тачну предикцију исхода болести у смислу појаве рецидива тумора и метастаза, што је веома корисно за лекаре при доношењу одлуке о даљим модалитетима лечења.

**Специфични закључци**

- Концентрација MMP-9 је статистички значајно виша у перитуморском него у туморском ткиву пацијената са карциномом дојке. Повишене концентрације MMP-9 у перитуморском ткиву могу указати на групу пацијената са повишеним ризиком од настанка метастаза у аксиларним лимфним нодусима, што овај ензим чини значајним прогностичким маркером у смислу агресивности болести.
- Експресија иРНК *VEGF-A*, *HIF-1*, *CXCL-12*, и *iNOS* гена и протеинска експресија VEGF и CXCR-4 су углавном статистички значајно више у туморском него у перитуморском ткиву
- Експресија иРНК *VEGF-A* гена је висока код дукталних карцинома дојке. Уколико је тумор већих димензија, вишег градуса, са појавом секундарних депозита у аксиларним лимфним нодусима и експресија *VEGF-A* гена је већа. Висока експресија је показана и у групама пацијената са рецепторима PR+ и HER-2-.
- Са повећањем величине и градуса тумора опада експресија иРНК *HIF-1 $\alpha$*  гена у туморском, али значајно расте у перитуморском ткиву, које постаје његов доминантни извор. Експресија *HIF-1 $\alpha$*  гена у туморском ткиву је у корелацији са појавом регионалних аксиларних или удаљених метастаза.
- Повишени нивои иРНК *CXCL-12* гена у перитуморском ткиву се налазе у случајевима T3, N2 и G3 (висока агресивност или узнатредовали тумор), док повишене вредности у туморском ткиву указују на вероватну појаву удаљених метастаза. Туморско ткиво жена старијих од 40 година експримира знатно више *CXCL-12* гена него перитуморско ткиво, док је код млађих жена већа експресија у перитуморском ткиву.
- Експресија иРНК *iNOS* је повећана у туморском ткиву лобуларног карцинома дојке и градијски се повећава са порастом величине тумора, захваћеношћу лимфних нодуса, појавом удаљених метастаза и ниском диференцијацијом тумора.
- HER-2 негативна група пацијента има повећану концентрацију свих испитиваних параметара у односу на HER-2 позитивне пацијенткиње.
- Код узнатредовалих тумора, високе агресивности (T3, N2 и G3) постоји велика разлика у продукцији испитиваних маркера између перитуморског и туморског ткива. Доминантну улогу у продукцији MMP-9, као и експресији иРНК *HIF-1 $\alpha$* , *CXCL-12* има перитуморско ткиво, док туморско ткиво доминира у продукцији иРНК *VEGF-A* и *iNOS*.

- Различите здраве и карциномске ћелијске линије различито реагују на исти електропорацијски третман. За ћелијску линију SW-480 карцинома колоне, пронашли смо електропорацијске услове при којима долази до иреверзибилног оштећења карциномских, али не и контролних здравих MRC-5, hAoSm и HUVEC ћелијских линија, и то у опсегу  $375-437.5 \text{ V cm}^{-1}$ , док на испитиваној метастатској линији карцинома дојке MDA-MB-231 тај ефекат није било могуће постићи.
- Паклитаксел изазива значајну цитотоксичност на ћелијама карцинома дојке, док високу цитотоксичност, чак и у мањим концентрацијама изазива у комбинацији са електропорацијом тј. електрохемиотерапијским третманом.
- Тип ћелијске смрти зависи од услова електропорације, тј. примењене волтаже, дужине експозиције, али и од особина самих третираних ћелија.
- *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* показују антиинвазивни ефекат на метастатским ћелијама карцинома дојке.
- Најбоље резултате у предикцији петогодишњег преживљавања смо добили коришћењем Naive Bayes-NB алгоритма за класификацију, док смо најбоље резултате у предикцији појаве рецидива и метастаза добили коришћењем *Artificial neural networks-ANN* класификационог модела, када је била у питању база података са параметрима који се рутински прикупљају приликом дијагностичке и терапијске обраде оваквих пацијената. Када су накнадно уведена још 5 параметара у туморском и перитуморском ткиву који се рутински не одређују у клиничкој пракси најбољи резултати у предикцији појаве матастаза су постигнути коришћењем SVM *Support Vector Machine-SVM* алгоритма.
- Најбоље рангирани атрибути у предикцији метастаза код пацијената са карциномом дојке су величина тумора, експресија иРНК *CXCL-12* гена у туморском ткиву, статус рецептора за естроген и HER-2, захваћеност лимфних нодуса, концентрација MMP-9 у перитуморском ткиву, експресија иРНК *HIF-1 $\alpha$*  у туморском ткиву, експресија иРНК *iNOS* у перитуморском ткиву и експресија иРНК *VEGF-A* гена у туморском ткиву.

**Коначни закључци**

- Коришћењем описане методологије креира се биолошки и молекуларни профил тумора за сваког појединачног пацијента, што води индивидуализацији онколошке терапије, која неће одговарати само ригидним протоколима, већ биолошким карактеристикама тумора.
- Додатни видови лечења као што је електрохемиотерапија могу значајно повећати дејство примењеног антинеопластичног агенса. На тај начин се постиже локализована хемиотерапија, тј. постиже се веома висока концентрација антинеопластичног агенса у карциномском ткиву, док веома мало лека одлази у слободну циркулацију, чиме се превенирају веома тешка нежељена дејства хемиотерапије која су неизбежна при стандардној апликацији, а са друге стране се повећава утицај лека на карциномско ткиво.
- Фитотерапија екстрактима *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* се може користити као суплемент стандардној онколошкој терапији, али су свакако потребна даља истраживања на том плану.
- *Data mining* методологија је веома корисна, јер аутоматизовано, али свакако уз надзор искусног клиничара може извршити селекцију најзначајнијих параметара који имају утицаја у процесу туморогенезе и метастазирања. Оваква компјутеризована обрада података веома значајна, поготово када се узме у обзир да се интерфејс софтвера може креирати тако да буде веома доступан крајњем кориснику. Креиран софтвер може са великом поузданошћу извршити предикцију исхода болести за сваког појединачног пацијента за кога су претходно експериментално и рутинском клиничком обрадом одређени *input* параметри. *Output* параметри су у овом случају били период 5-огодишњег преживљавања, појава рецидива и метастаза, што је довољно да клиничар на објективан начин одлучи који је оптималан терапијски модалитет за сваког изучаваног пацијента понаособ, што представља индивидуализацију, односно персонализацију онколошке терапије.

## VIII ЛИТЕРАТУРА

1. Allen DD, Caviedes R, Cárdenas AM, Shimahara T, Segura-Aguilar J, Caviedes PA. Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug Dev Ind Pharm.* 2005; 31(8): 757-768.
2. Ambs S, Ogunfusika MO, Merriam WG, Bennett WP, Billiar TR, Harris CC. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95(15): 8823-8828.
3. Angus SD, Piotrowska MJ. A matter of timing: identifying significant multi-dose radiotherapy improvements by numerical simulation and genetic algorithm search. *PLoS One.* 2014; 9(12): 1-28.
4. Armitage P, Doll R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer.* 1954; 8: 1-12.
5. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999; 85: 221-228.
6. Asparuhova MB, Secondini C, Rüegg C, Chiquet-Ehrismann R. Mechanism of irradiation-induced mammary cancer metastasis: A role for SAP-dependent Mkl1 signaling. *Mol Oncol.* 2015; 9(8): 1510-1527.
7. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res.* 2002; 62: 7203-7206.
8. Barth S, Nesper J, Hasgall PA, Wirthner R, Nytko KJ, Edlich F, Katschinski DM, Stiehl DP, Wenger RH, Camenisch G. The peptidyl prolyl cis/trans isomerase FKBP38 determines hypoxia -inducible transcription factor prolyl -4-hydroxylase PHD2 protein stability. *Mol Cell Biol.* 2007; 27: 3758-768.
9. Bartolome RA, Molina-Ortiz I, Samaniego R, Sanchez-Mateos P, Bustelo XR, Teixido J. Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. *Cancer Res.* 2006; 66: 248-258.
10. Baskić, D, Popović S, Ristić P, Arsenijević N. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/ propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int.* 2006; 30: 924-932.
11. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998; 72: 141-196.
12. Beebe SJ, Fox PM, Rec LJ, Somers K, Stark RH, Schoenbach KH. Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: apoptosis induction and tumor growth inhibition, IEEE Trans. *Plasma Sci.* 2002; 30(1): 286-292.
13. Bendall LJ, Baraz R, Juarez J, Shen W, Bradstock KF. Defective p38 mitogen-activated protein kinase signaling impairs chemotactic but not proliferative responses to stromal-derived factor-1alpha in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 2005; 65(8): 3290-3298.
14. Bennett S. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Angiogenesis: Tumor Angiogenesis and Microcirculation. Marcel Dekker, New York, 2001.



15. Bilal E, Dutkowski J, Guinney J, Jang IS, Logsdon BA, Pandey G, et al. Improving breast cancer survival analysis through competition-based multidimensional modeling. *PLoS Comput Biol.* 2013; 9: 1-16.
16. Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochem Biophys Acta.* 1994; 1198: 11-26.
17. Bisht MDC, Bist DSS. Angiogenesis: future of pharmacological modulation. *Indian J Pharmacol.* 2010; 42(1): 2-8.
18. Bjorklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1755(1): 37-69.
19. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckman J. Herbal Medicine: expanded commission E monographs. Lippincott Williams & Wilkins, Newton, MA, 2000.
20. Boice J, Harvey E, Blettner M, Stovall M, Flannery J. Cancer in the contralateral breast after radiotherapy for breast cancer. *N Engl J Med.* 1992; 326(12): 781-785.
21. Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer.* 2003; 97: 1573-1581.
22. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, Abeloff MD, Simons JW, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 309-314.
23. Boskou D. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci Technol.* 2006; 17: 505-512.
24. Botelho MC, Soares R, Alves H. Progesterone in breast cancer angiogenesis. *SM J Reprod Health Infertil.* 2015; 1(1): 1001.
25. Boudot A, Kerdivel G, Habauzit D, Eeckhoutte J, Le Dily F, Flouriot G, Samson M, Pakdel F. Differential estrogen-regulation of CXCL12 chemokine receptors, CXCR-4 and CXCR7, contributes to the growth effect of estrogens in breast cancer cells. *PLoS One.* 2011; 6(6): 1-12.
26. Boue SM, Cleveland TE, Carter-Wientjes C, Shih BY, Bhatnagar D, McLachlan JM, Burow ME. Phytoalexin-enriched functional foods. *J Agric Food Chem.* 2009; 57: 2614-2622.
27. Boyer JC, Umar A, Risinger JI, Lipford JR, Kane M, Yin S, Barrett JC, Kolodner RD, Kunkel TA. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 1995; 55: 6063-6070.
28. Bracke ME, van Roy FM, Mareel MM. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 213: 123-161.
29. Burger AM, Fiebig H. Preclinical screening for new anticancer agents. In: Figg WD, McLeod HL. Eds. Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2004.
30. Burke AJ, Sullivan FJ, Giles FJ, Glynn SA. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis.* 2013; 34: 503-512.
31. Burke HB, Goodman PH, Rosen DB, Henson DE, Weinstein JN, Harrell FE, Marks JR, Winchester DP, Bostwick DG. Artificial neural networks improve the accuracy of cancer survival prediction. *Cancer.* 1997; 79: 857-862.
32. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000; 25: 169-193.
33. Cabula C. Neoadjuvant electrochemotherapy of breast cancer: our experience on first case treated in Italy. *Updat Surg.* 2012; 65: 325-328.

34. Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* 1999; 9: 57-60.
35. Cancer registry of central Serbia. Cancer incidence and mortality in Central Serbia 2012. Institut za Javno Zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut” Izveštaj br. 14 Report no. 14. Beograd, 2014.
36. Canonici A, Gijsen M, Mullooly M, Bennett R, Bouguern N, Pedersen K, O'Brien NA, Roxanis I, Li JL, Bridge E, Finn R, Siamon D, McGowan P, Duffy MJ, O'Donovan N, Crown J, Kong A. Neratinib overcomes trastuzumab resistance in HER2 amplified breast cancer. *Oncotarget.* 2013; 4: 1592-1605.
37. Carretero-Ortega J, Walsh CT, Hernández-García R, Reyes-Cruz G, Brown JH, Vázquez-Prado J. Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (CXCL-12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and in vitro angiogenesis. *Mol Pharmacol.* 2010; 77(3): 435-442.
38. Caruz A, Samsom M, Alonso JM, Alcamí J, Baleux F, Virelizier JL, Parmentier M, Arenzana-Seisdedos F. Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene. *FEBS Lett.* 1998; 426(2): 271-278.
39. Cedar H, Bergman Y. Epigenetic Silencing During Early Lineage Commitment. *Harvard Stem Cell Institute.* 2008; 1-11.
40. Cerci SS, Bozkurt KK, Eroglu HE, Cerci C, Erdemoglu E, Bulbul P, Cetin M, Cetin R, Ciris IM, Bulbul M. Evaluation of the association between HIF-1 $\alpha$  and HER-2 expression, hormone receptor status, Ki-67 expression, histology and tumor FDG uptake in breast cancer. *Oncol Lett.* 2016; 12(5): 3889-3895.
41. Cha HN, Kim YW, Kim JY, Kim YD. Lack of inducible nitric oxide synthase does not prevent aging-associated insulin resistance. *Exp Gerontol.* 2010; 45: 711-718.
42. Chabottaux V, Sounni NE, Pennington CJ, English WR, van den Brule F, Blacher S, Gilles C, Munaut C, Maquoi E, Lopez-Otin C, Murphy G, Edwards DR, Foidart JM, Noel A. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases. *Cancer Res.* 2006; 66(10): 5165-5172.
43. Chang SL, Cavnar SP, Takayama S, Luker GD, Linderman JJ. Cell, isoform, and environment factors shape gradients and modulate chemotaxis. Klein R, ed. *PLoS One.* 2015; 10(4): 1-24.
44. Charous SJ, Stricklin GP, Nanney LB, Netterville JL, Burkey BB. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1997; 106: 271-278.
45. Chatterjee S, Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res.* 2014; 124: 31-82.
46. Chavakis E, Carmona G, Urbich C, Göttig S, Henschler R, Penninger JM, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S. Phosphatidylinositol-3-kinase-gamma is integral to homing functions of progenitor cells. *Circ Res.* 2008; 102: 942-949.
47. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast disease.* 2010; 32(1-2): 35-48.
48. Chen K, Liu J, Zhu L, Su F, Song E, Jacobs LK. Comparative effectiveness study of breast-conserving surgery and mastectomy in the general population: A NCDB analysis. *Oncotarget.* 2015; 6(37): 40127-40140.
49. Cheng H, Wang L, Mollica M, Re AT, Wu S, Zuo L. Nitric oxide in cancer metastasis. *Cancer ett.* 2014; 353(1): 1-7.

50. Chien MH, Liu YF, Hsin CH, Lin CH, Shih CH, Yang S, Cheng C, Lin C. Impact of *VEGF-C* gene polymorphisms and environmental factors on oral cancer susceptibility in Taiwan. *PLOS One*. 2013; 8(4): e60283.
51. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162: 156-159.
52. Chopinet L, Batista-Napotnik T, Montigny A, Rebersek M, Teissié J, Rols MP, Miklavčič D. Nanosecond electric pulse effects on gene expression. *J Membr Biol*. 2013; 246: 851-859.
53. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2006; 66(17): 8319-8326.
54. Cipollini G, Tommasi S, Paradiso A, Aretini P, Bonatti F, Brunetti I, Bruno M, Lombardi G, Schittulli F, Sensi E. Genetic alterations in hereditary breast cancer. *Ann Oncol*. 2004; 15: 17-13.
55. Clark AS, Domchek SM. Clinical management of hereditary breast cancer syndromes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011; 16: 17-25.
56. Clark GM, Hilsenbeck SG, Ravdin PM, De Laurentiis M, Osborne CK. Prognostic factors: rationale and methods of analysis and integration. *Breast Cancer Res Treat*. 1994; 32(1): 105-112.
57. Coradini D, Pellizzaro C, Veneroni S, Ventura L, Daidone MG. Infiltrating ductal and lobular breast carcinomas are characterised by different interrelationships among markers related to angiogenesis and hormone dependence. *Brit J Cancer*. 2002; 87: 1105-1111.
58. Cover TM, Thomas JA. Elements of Information Theory. 2<sup>nd</sup> ed, Wiley, 1991.
59. Cragg GM, Newman DJ. Plants as source of anticancer agents. *J Ethnopharmacol*. 2005; 100: 72-79.
60. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, Zabaglo L, Mallon E, Green AR, Ellis IO, Howell A, Buzdar AU, Forbes JF. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the genomic health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 4273-4278.
61. Cvetković DM, Živanović MN, Milutinović MG, Djukić TR, Radović MD, Cvetković AM, Filipović ND, Zdravković ND. Real-time monitoring of cytotoxic effects of electroporation on breast and colon cancer cell lines. *Bioelectrochemistry*. 2017; 113: 85-94.
62. Ćurčić M. Molekularni mehanizmi apoptoze u ćelijama karcinoma kolona nakon in vitro tretmana ekstraktima lekovitih biljaka. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, 2014.
63. Ćurčić MG, Stanković MS, Cvetković D, Topuzović MD, Marković SD. *Ligustrum vulgare* L.: in vitro free radical scavenging activity and pro-oxidant properties in colon cancer cell lines. *Dig J Nanomater Bios*, 2014, 9 (4): 1689-1697.
64. Dai J, Mumper JR. Plant phenolics: extraction analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010; 15: 7313-7352.
65. Daniel PT, Koert U, Schuppan J. Apoptolidin: induction of apoptosis by a natural product. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2006; 45(6): 872-893.
66. Daniele A, Zito AF, Giannelli G, Divella R, Asselti M, Mazzocca A, Paradiso A, Quaranta M. Expression of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in sentinel lymph node and serum of patients with metastatic and non-metastatic breast cancer. *Anticancer Res*. 2010; 30: 3521-3527.

67. De Francesco EM, Pellegrino M, Santolla MF, Lappano R, Ricchio E, Abonante S, Maggiolini M. GPER mediates activation of HIF1 $\alpha$ /VEGF signaling by estrogens. *Cancer Res.* 2014; 74: 4053-4064.
68. de Miguel D, Lemke J, Anel A, Walczak H, Martinez-Lostao L. Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death Differ.* 2016; 23: 733-747.
69. Dedon PC, Tannenbaum SR. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch Biochem Biophys.* 2004; 423: 12-22.
70. Delli Carpini J, Karam AK, Montgomery L. Vascular endothelial growth factor and its relationship to the prognosis and treatment of breast, ovarian, and cervical cancer. *Angiogenesis.* 2010; 13: 43-58.
71. Demeulle M, Btossard M, Page M, Gingras D, Beliveau R. Matrix methalloproteinases inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1478(1): 51-60.
72. Deshpande N, Pysz MA, Willmann JK. Molecular Ultrasound Assessment of Tumor Angiogenesis. *Angiogenesis.* 2010; 13(2): 175-188.
73. Desroches-Castan A, Quelard D, Demeunynck M, Constant JF, Dong C, Keramidas M, Coll JL, Barette C, Lafanechere L, Feige JJ. A new chemical inhibitor of angiogenesis and tumorigenesis that targets the VEGF signaling pathway upstream of Ras. *Oncotarget.* 2015; 6: 5382-5411.
74. Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer: Principles & Practice of Oncology, 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Wallingford, United Kingdom. 2004.
75. Dholwani KK, Saluja AK, Gupta AR, Shah DR. A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. *Indian J Pharmacol.* 2008; 40(2): 49-58.
76. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82: 45-97.
77. Duda DG, Batchelor TT, Willett CG, Jain RK. VEGF- targeted cancer therapy strategies: Current progress, hurdles and future prospects. *Trends Mol Med.* 2007; 13: 223-230.
78. Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM: Cancerinvasion and metastasis: changing views. *J Pathol.* 2008; 214: 283-293.
79. Duke JA, Wain KK. Medicinal Plants of the World. CRC Press, Florida, Boca Raton, 1981.
80. Džodić R. Anatomija dojke i pazušne jame. Hirurgija raka dojke. Beograd, Dosije, 2005; 7-21.
81. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010; 17(6): 1471-1474.
82. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2002; 277(41): 38079-3886.
83. El-Gendi S, Abdel-Hadi M. Lymphatic vessel density as prognostic factor in breast carcinoma: relation to clinicopathologic parameters. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2009; 21(2): 139-49.
84. Elkin M, Cohen I, Zcharia E, Orgel A, Guatta-Rangini Z, Peretz T, Vlodaysky I, Kleinman H. Regulation of heparanase gene expression by estrogen in breast cancer. *Cancer Res.* 2003; 63: 8821-8826.
85. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopatholog.* 2002; 41(3A): 154-161.
86. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, Bodrogi I, Jagiello-Gruszfeld A, Moore N; AVOREN Trial investigators. Bevacizumab plus interferon alfa2a for

- treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomized, double-blind phase III trial. *Lancet*. 2007; 370: 2103-2111.
87. Etique N, Chardard D, Chesnel A, Merlin JL, Flament S, Grillier-Vuissoz I. Ethanol stimulates proliferation, ER $\alpha$  and aromatase expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2004; 13(1): 149-155.
  88. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect*. 2002; 109(1): 69-75.
  89. Feng Q, Zhang C, Lum D, Druso JE, Blank B, Wilson KF, Welm A, Antonyak MA, Cerione RA. A class of extracellular vesicles from breast cancer cells activates VEGF receptors and tumour angiogenesis. *Nat Commun*. 2017; 8: 14450.
  90. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9: 669-676.
  91. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med*. 1999; 77: 527-543.
  92. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 795-803.
  93. Filipović S, Filipović A, Stojiljković V, Mišić I, Verbić S, Pejčić I, Stanojević Z. Breast cancer – clinical implication. *JMB*. 2007; 26(2): 134-143.
  94. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*. 1987; 235(4787): 442-447.
  95. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*. 2007; 6(4): 273-86.
  96. Foulkes WD, Metcalfe K, Sun P, Hanna WM, Lynch HT, Ghadirian P, Tung N, Olopade OI, Weber BL, McLennan J, Olivetto IA, Bégin LR, Narod SA. Estrogen receptor status in BRCA1- and BRCA2-related breast cancer: the influence of age, grade, and histological type. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 2029-2034.
  97. Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, López-Otín C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem*. 1994; 269(24): 16766-16773.
  98. Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MP. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev*. 2006; 26: 747-766.
  99. Fuckar D, Dekanić A, Stifter S, Mustać E, Krstulja M, Dobrila F, Jonjić N. VEGF expression is associated with negative estrogen receptor status in patients with breast cancer. *Int J Surg Pathol*. 2006; 14(1): 49-55.
  100. Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JA. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes*. 2005; 54: 1340-1348.
  101. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(7): 521-534.
  102. Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4: 177-183.
  103. Gagliato D, Jardim D, Marchesi M, Hortobagyi G. Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2+ breast cancer. *Oncotarget*. 2016; 7(39): 64431-64446.
  104. Gao P, Zhou X, Wang ZN, Song YX, Tong LL, Xu YY, Yue ZY, Xu HM. Which is a more accurate predictor in colorectal survival analysis? Nine data mining algorithms vs. the TNM staging system. *PLoS One*. 2012; 7(7): 1-8.
  105. Garcia PA, Davalos RV, Miklavcic D. A numerical investigation of the electric and thermal cell kill distributions in electroporation-based therapies in tissue. *PLoS One*. 2014; 9(8): 1-12.

106. Gargiulo P, Dad AP, Capasso MM, Cubicciotti E, Parascandolo M. Electrochemotherapy for non-melanoma cancers of the head and neck: clinical results in 25 patients. *Surg.* 2012; 255: 1158-1164.
107. Gee J, Hurrell R, Leth T, Sandberg AS. Food for Health – an Insight into Natural Bioactive Compounds of Plants. In: Frolich W, Dokkum WV, Chesson A. Eds. Cost 916 Action, Office for Official Publications of the European Communities, 2001.
108. Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metast Rev.* 1998; 17: 7-23.
109. Geng JP, Tan KB, Liu GR. Application of finite element analysis in implant dentistry: a review of the literature. *J Prosthet Dent.* 2001; 85(6): 585-598.
110. Genovesi P. Eradications of Invasive Alien Species in Europe: Issues in Bioinvasion Science. Springer Netherlands, 2005.
111. George AL, Rajoria S, Suriano R, Mittleman A, Tiwari RK. Hypoxia and estrogen are functionally equivalent in breast cancer-endothelial cell interdependence. *Mol Cancer.* 2012; 11(80): 2-12.
112. Gilkes DM, Bajpai S, Chaturvedi P, Wirtz D, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. *J Biol Chem.* 2013; 288(15): 10819-10829.
113. Gostuški R: Lečenje lekovitim biljem, Narodna knjiga, Beograd, 1979.
114. Gotzmann J, Mikula M, Eger A, Schulte-Hermann R, Foisner R, Beug H, Milulits W. Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res.* 2004; 566(1): 9-20.
115. Granados-Principal S, Liu Y, Guevara ML, Blanco E, Choi DS, Qian W, Patel T, Rodriguez AA, Cusimano J, Weiss HL, Zhao H, Landis MD, Dave B, Gross SS, Chang JC. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2015; 17(1): 1-16.
116. Grbović F, Stanković M, Curčić M, Djordjević N, Seklić D, Topuzović M, Marković S. In vitro cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on HCT-116 and MDA-MB-231 cell lines. *Plants.* 2013; 2: 371-378.
117. Greenblatt, Shuibik P. Tumour angiogenesis transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natn Cancer Inst.* 1968; 41: 111-124.
118. Gruber G, Richard H, Greiner R, Hlushchuk R, Aebbersold D, Altermatt H, Berclaz G, Djonov V. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? *Breast Cancer Res.* 2004; 6: R191-198.
119. Gueritte F, Fahy J. The Vinca Alkaloids. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. Eds. Anticancer Agents from Natural Products. Brunner-Routledge Psychology Press, Boca Raton, 2005, Chapter 7, pp. 23.
120. Guex N, Crespol I, Bron S, Ifticene-Treboux A, Hull EF, Kharoubi S, Liechti R, Werffeli P, Ibberson M, Majo F, Nicolas M, Laurent J, Garg A, Zaman K, Lehr HA, Stevenson BJ, Rüegg C, Coukos G, Delaloye JF, Xenarios I, Doucey MA. Angiogenic activity of breast cancer patients' monocytes reverted by combined use of systems modeling and experimental approaches. *PLoS Comput Biol.* 2015; 11(3): 1-27.
121. Guo C, Buranych A, Sarkar D, Fisher PB, Wang X-Y. The role of tumor-associated macrophages in tumor vascularization. *Vasc Cell.* 2013; 5:20.
122. Haddad PS, Azar GA, Groom S, Boivin M. Natural health products, modulation of immune function and prevention of chronic diseases. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2005; 2(4): 513-520.

123. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4<sup>th</sup> Ed. Clarendon Press, Oxford, 2006.
124. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996; 86: 353-364.
125. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646-674.
126. Harrison MA, Rae IF. General Techniques of Cell Culture. Cambridge University Press, Cambridge, US, 1997.
127. Heo DS, Choi H, Yeom MY, Song BJ, Oh SJ. Serum levels of matrix metalloproteinase-9 predict lymph node metastasis in breast cancer patients. *Oncol Rep*. 2014; 31(4): 1567-1572.
128. Hernandez L, Magalhaes MA, Coniglio SJ, Condeelis JS, Segall JE. Opposing roles of CXCR-4 and CXCR7 in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res*. 2011; 13(6): 2-17.
129. Heusch P, Aker S, Boengler K, Deindl E. Increased inducible nitric oxide synthase and arginase II expression in heart failure: no net nitrite/nitrate production and protein S-nitrosylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 299: 446-453.
130. Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y, Werneburg N, Takimoto R, El-Deiry W, Gores GJ. The bile acid glycochenodeoxycholate induces TRAIL-Receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *J Biol Chem*. 2001; 276: 38610-38618.
131. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93(4): 266-276.
132. Hofmann UB, Houben R, Brocker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie*. 2005; 87(3): 307-314.
133. Horuk R. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001; (4): 313-335.
134. Hua H, Li M, Luo T, Yin Y, Jiang Y. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68(23): 3853-3868.
135. Hunter ZR, Xu L, Yang G. Transcriptome sequencing reveals a profile that corresponds to genomic variants in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2016; 128(6): 827-838.
136. Hurwitz H. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350: 2335-2342.
137. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999; 34(6): 879-886.
138. Jackson AL, Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res*. 2001; 477(1-2): 7-21.
139. Jakovljević T, Halambek J, Radošević K, Hanousek K, Gradečki-Poštenjak M, Gaurina Srček V, Radojčić Redovniković I, De Marco A. The potential use of Indigobush (*Amorpha fruticosa* L.) as natural resource of biologically active compounds. *SEEFOR*. 2015; 6(2): 171-178.
140. Janke K, Brockmeier U, Kuhlmann K, Eisenacher M, Nolde J, Meyer HE, Mairbäurl H, Metzen E. Factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) modulates protein interactions of apoptosis-stimulating p53 binding protein 2 (ASPP2). *J Cell Sci*. 2013; 126: 2629-2640.
141. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: new insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev*. 2006; 25: 677-694.
142. Jiang T, Yu J-T, Zhu X-C, Zhang QQ, Tan MS, Cao L, Wang HF, Lu J, Gao Q, Zhang YD, Tan L. Angiotensin-(1-7) induces cerebral ischaemic tolerance by promoting brain angiogenesis in a Mas/eNOS-dependent pathway. *Brit J Pharmacol*. 2014; 171(18): 4222-4232.
143. Jin Z, Wang W, Jiang N, Zhang L, Li Y, Xu X, Cai S, Wei L, Liu X, Chen G, Zhou Y, Liu C, Li Y, Jin F, Chen B. Clinical implications of iNOS levels in triple-negative breast cancer

- responding to neoadjuvant chemotherapy clinical implications of iNOS levels in triple-negative breast cancer responding to neoadjuvant chemotherapy. *PLoS One*. 2015; 10(7): 1-13.
144. Jin-no K, Tanimizu M, Hyodo I, Nishikawa Y, Hosokawa Y, Doi T, Endo H, Yamashita T, Okada Y. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) is a possible tumor marker for metastasis in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 1998; 33(3): 376-382.
  145. Johanna M. Pellikainen, Kirsi M. Ropponen, Vesa V. Kataja, Jari K. Kellokoski, Matti J. Eskelinen and Veli-Matti Kosma. Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to Activator Protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(22): 7621-7628.
  146. Joseph A. Cruz, David S. Wishart, applications of machine learning in cancer prediction and prognosis. *Cancer Informatics*. 2007; 2: 59-77.
  147. Jourdeuil D, Jourdeuil F, Kutchukian PS, Musab RA, Wink DA, Grisham MB. Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. *J Biol Chem*. 2001; 276: 28799-28805.
  148. Joy PP, Thomas J, Mathew S, Jose G, Joseph J. Medicinal plants. U: Bose TK, Kabir J, Das P, Joy PP. Eds. *Tropical Horticulture*. 2001, 2(32): 449-632.
  149. Jurišić V, Živančević-Simonović S. U: Živančević-Simonović S, Đukić A, Đurđević P, Jurišić V, Mijatović Lj. Opšta patološka fiziologija. Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, 2002, pp. 463-485.
  150. Karim H and Zand K. A comparative survey on data mining techniques for breast cancer diagnosis and prediction. *JLS*, 2015; 5: 4330-4339.
  151. Katić V, Kutlešić Č, Stojanović D, Petrović S, Dimov D, Tasić D, Gligorijević J, Mihailović D, Živković V, Jovičić-Milentijević M. Opšta patologija, udžbenik za studente medicine i stomatologije. Prosveta, Niš, 1996.
  152. Katschinski DM. *In vivo* functions of the prolyl-4-hydroxylase domain oxygen sensors: direct route to the treatment of anaemia and the protection of ischaemic tissues. *Acta Physiol*. 2009; 195(4): 407-414.
  153. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*. 2008; 358(19): 2039-2049.
  154. Keyhani E, Muhammadnejad A, Behjati F, Sirati F, Khodadadi F, Karimlou M, Moghaddam FA, Pazhoomand R. Angiogenesis markers in breast cancer-potentially useful tools for priority setting of anti-angiogenic agents. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14(12): 7651-7656.
  155. Khan SA, Amnekar R, Khade B, Barreto SG, Ramadwar M, Shrikhande SV, Gupta S. p38-MAPK/MSK1-mediated overexpression of histone H3 serine 10 phosphorylation defines distance-dependent prognostic value of negative resection margin in gastric cancer. *Clin Epigenetics*. 2016; 8(1): 88.
  156. Khan TA, Mazid M, Mohammad F. Status of secondary plant products under abiotic stress: an overview. *J Stress Physiol Biochem*. 2011; 7(2): 75-98.
  157. Khan, U, H Shin, JP Choi, Kim M. wFDT-weighted fuzzy decision trees for prognosis of breast cancer survivability. *In AusDM*. 2008; 141-152.
  158. Kho D, MacDonald C, Johnson R, Unsworth C, Carroll S, Mez E, Angel C, Graham E. Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. *Biosensors*. 2015; 5: 199-222.
  159. Kim W, Kim KS, Lee JE, Noh DY, Kim SW, Jung YS, Park MY, Park RW. Development of novel breast cancer recurrence prediction model using support vector machine. *J Breast Cancer*. 2012; 15(2): 230-238.



160. Kingston DG. Taxol and its Analogs. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. Eds. *Anticancer Agents from Natural Products*. Brunner-Routledge Psychology Press, Boca Raton, 2005, Chapter 6, pp. 89.
161. Klencke BJ, Bhattacharya S, Samant MK, Gralow JR, Dickler MN, Cobleigh MA, Perez EA, Shenkier TN, Davidson NE, Miller KD. Independent review of E2100 progression-free survival (PFS) with the addition of bevacizumab (B) to paclitaxel (P) as initial chemotherapy for metastatic breast cancer (MBC). *J Clin Oncol*. 2008; 26: 1036.
162. Koepke J, Dresel M, Schmid S, Greulich T, Beutel B, Schmeck B, Koczulla AR. Therapy with plasma purified alpha1-antitrypsin (ProLactin®) induces time-dependent changes in plasma levels of MMP-9 and MPO. *PloS One*. 2015; 10(1): 1-14.
163. Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer*. 2009; 9(188): (1-20).
164. Kostourou V, Cartwright JE, Johnstone AP, Boulton JK, Cullis ER, Whitley G, Robinson SP. The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. *British J Cancer*. 2011; 104(1): 83-90.
165. Kourou K, Exarchos TP, Exarchos KP, Karamouzis MV, Fotiadis DI. Machine learning applications in cancer prognosis and prediction. *Comput Struct Biotechnol J*. 2014; 13: 8-17.
166. Kousidou OC, Berdiaki A, Kletsas D, Zafiroopoulos A, Theocharis AD, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Estradiol-estrogen receptor: a key interplay of the expression of syndecan-2 and metalloproteinase-9 in breast cancer cells. *Mol Oncol*. 2008; 2(3): 223-232.
167. Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, Rainey K, Okuyama H, Baek JH, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B. *Cancer Res*. 2006; 66(5): 2725-2731.
168. Krishnendu M, Twyman RM, Vilcinskis A. Insects as models to study the epigenetic basis of disease. *PBMB*. 2015; 118, 1: 69-78.
169. Krivokapić V. Karcinom rektuma. Izdavač: Zavod za udžbenike Beograd, 2012. ISBN: 978-17-17967-8.
170. Kruger NJ, Hill SA, Retcliffe RG. Regulation of Primary Metabolic Pathways in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, 1999, pp. 173-193.
171. Kryczek I, Lange A, Mottram P, Alvarez X, Cheng P, Hogan M, Moons L, Wei S, Zou L, Machelon V, Emilie D, Terrassa M, Lackner A, Curiel TJ, Carmeliet P. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res*. 2005; 65: 465-472.
172. Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: Pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells*. 2005; 23(7): 879-894.
173. Kuonen F, Secondini C, Rüegg C. Molecular pathways: emerging pathways mediating growth, invasion, and metastasis of tumors progressing in an irradiated microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2012; 18(19): 5196-5202.
174. Kwong J, Kulbe H, Wong D, Chakravarty P, Balkwill F. An antagonist of the chemokine receptor CXCR4 induces mitotic catastrophe in ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2009; 8(7): 1893-905.

175. Lai Q, Wang T, Guo Q, Zhang Y, Wang Y, Yuan L, Ling R, He Y, Wang W. Positive correlation between the expression of hEag1 and HIF-1 $\alpha$  in breast cancers: an observational study. *BMJ Open*. 2014; 4(5): 1-7.
176. Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol*. 2001; 2(3): 149-156.
177. Lala PK, Orucevic A. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer Metast Rev*. 1998; 17(1): 91-106.
178. Lamy S, Gingras D and Béliveau R. Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. *Cancer Res J*. 2002; 62(2): 381-385
179. Land C. Radiation and breast cancer risk. *Prog Clin Biol Res*. 1997; 396: 115-124.
180. Laufs S, Schumacher J, Allgayer H. Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle*. 2006; 16: 1760-1771.
181. Lee CP, Choi H, Soo KC, Tan MH, Chay WY, Chia KS, Liu J, Li J, Hartman M. Mammographic breast density and common genetic variants in breast cancer risk prediction. *PLoS One*. 2015; 10(9): 1-16.
182. Levenson AS and Jordan VC. MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research*, 1997; 57(15): 3071-3078.
183. Li C, Yang X, Chen C, Cai S, Hu J. Isorhamnetin suppresses colon cancer cell growth through the PI3K Akt mTOR pathway. *Mol Med Rep*. 2014a; 9(3): 935-940.
184. Li J, Fan R, Zhao S, Liu L, Guo S, Wu N, Zhang W, Chen P. Reactive oxygen species released from hypoxic hepatocytes regulates MMP-2 expression in hepatic stellate cells. *Int Jour Mol Sci*. 2011; 12(4): 2434-2447.
185. Li W, Liu M, Xu YF, Feng Y, Che JP, Wang GC, Zheng JH. Combination of quercetin and hyperoside has anticancer effects on renal cancer cells through inhibition of oncogenic microRNA-27a. *Oncol Rep*. 2014b; 31: 117-124.
186. Li Y, Melnikov AA, Levenson V, Guerra E, Simeone P, Alberti S, Deng Z. A seven-gene CpG-island methylation panel predicts breast cancer progression. *BMC Cancer*. 2015; 15(417): 1-12.
187. Liang Z, Brooks J, Willard M, Liang K, Yoon Y, Kang S, Shim H. CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 359: 716-722.
188. Liersch R, Hirakawa S, Berdel W, Mesters R, Detmar M. Induced lymphatic sinus hyperplasia in sentinel lymph nodes by VEGF-C as the earliest premetastatic indicator. *Int J Oncol*. 2012; 41(6): 2073-2078.
189. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Mol Cell*. 2010; 38(6): 864-878.
190. Lin CW, Hou WC, Shen SC, Juan SH, Ko CH, Wang LM, Chen YC. Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKC delta/ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2008; 29 (9):1807-15.
191. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med*. 2001; 193: 727-740.
192. Lin L, Baehrecke EH. Autophagy, cell death, and cancer. *Mol Cell Oncol*. 2015; 2: 1-8.

193. Listgarten J, Damaraju S, Poulin B, Cook L, Dufour J, Driga A, Mackey J, Wishart D, Greiner R, Zanke B. Predictive models for breast cancer susceptibility from multiple single nucleotide polymorphisms. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(8): 2725-2737.
194. Liu Z, Li L, Yang Z, Luo W, Li X, Yang H, Yao K, Wu B, Fang W. Increased expression of MMP9 is correlated with poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer.* 2010; 10(270): 1-7.
195. Liu Z, Semenza GL, Zhang H. Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2015; 16(1): 32-43.
196. Lochter A. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that lead to stable-epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol.* 1997; 139: 1861-1872.
197. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100: 776-781.
198. Loeb LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 3230-3239.
199. Los M, Roodhart JML, Voest EE. Target practice: lessons from phase III trials with Bevacizumab and Vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer. *Oncologist.* 2007; 12 (4): 443-450.
200. Losordo DW, Isner JM. Estrogen and angiogenesis: A review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 6-12.
201. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-275.
202. Lu, X, Kang Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(24): 5928-5935.
203. Maglogiannis I, Zafiroopoulos E, Anagnostopoulos I. An intelligent system for automated breast cancer diagnosis and prognosis using SVM based classifiers. *Appl Intell.* 2009; 30: 24-36.
204. Maor E, Ivorra A, Rubinsky B. Non thermal irreversible electroporation: novel technology for vascular smoothmuscle cells ablation. *PLoS One.* 2009; 4: 1-9.
205. Margan MM, Jitariu AA, Cimpean AM, Nica C, Raica M. Molecular portrait of the normal human breast tissue and its influence on breast carcinogenesis. *J Breast Cancer.* 2016; 19(2): 99-111.
206. Margonis GA, Buettner S, Amini N, Kim Y, Merath K, Buettner S, Pikoulis E, Andreatos N, Wagner D, Antoniou E, Pawlik TM. The role of liver-directed surgery in patients with hepatic metastasis from primary breast cancer: a multi-institutional analysis. *HPB: J Int Hep Panc Bil Assoc.* 2016; 18(8): 700-705.
207. Marinas I, Oprea E, Geana E, Chifiriuc C and Lazar V. Antimicrobial and antioxidant activity of the vegetative and reproductive organs of Robinia pseudoacacia. *J. Serb. Chem. Soc.* 2014; 79 (11): 1363–1378.
208. Marković SD, Đorđević NZ, Čurčić MG, Štajn AŠ, Spasić MB. Biotransformation and nitroglycerin-induced effects on antioxidative defense system in rat erythrocytes and reticulocytes. *Gen Physiol Biophys.* 2014; 33(4): 393-401.
209. Marković SD, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS, Radojičić RM, Spasić MB. The effects of nitroglycerine on the redox status of rat erythrocytes and reticulocytes. *Physiol Res.* 2006; 55: 389-396.
210. Marković SD, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS, Radojičić RM, Spasić MB. The effects of nitroglycerine on the redox status of rat erythrocytes and reticulocytes. *Physiol Res.* 2006; 55: 389-396.

211. Marković SD, Vukajlović MD, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS, Radojičić RM, Jones DR, Spasić MB. A comparative study of the effects of molsidomine and 3-morpholinopyridone on redox status of rat erythrocytes and reticulocytes. *Cell Biochem Funct.* 2007; 25: 251-258.
212. Martin JH, Begum S, Alalami O, Harrison A, Scott KW. Endothelial nitric oxide synthase: correlation with histologic grade, lymph node status and estrogen receptor expression in human breast cancer. *Tumour Biol.* 2000; 21: 90-97.
213. Martin M, Brase JC, Ruiz A, Prat A, Kronenwett R, Calvo L, Petry C, Bernard PS, Ruiz-Borrego M, Weber KE, Rodriguez CA, Alvarez IM, Segui MA, Perou P, Casas M, Carrasco E, Caballero R, Rodriguez-Lescure A. Prognostic ability of EndoPredict compared to research-based versions of the PAM50 risk of recurrence (ROR) scores in node-positive, estrogen receptor-positive, and HER2-negative breast cancer. A GEICAM/9906 sub-study. *Breast Cancer Res Treat.* 2016; 156: 81-89.
214. Matouk IJ, Raveh E, Abu-Lail R, Mezana S, Gilona M, Gershtaina E, Birmana T, Gallulaa J, Schneidera T, Barkalia M, Richlera C, Fellig Y. Oncofetal H19 RNA promotes tumor metastasis. *BBA Mol Cell Res.* 2014; 1843(7): 1414-1426.
215. Matrone C, Pignataro G, Molinaro P, Irace C, Scorziello A, Di Renzo GF, Annunziato L. HIF-1 $\alpha$  reveals a binding activity to the promoter of iNOS gene after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Neurochem.* 2004; 90: 368-378.
216. Mauguen A, Ratchet B, Mathoulin-Pélissier S, Lawrence GM, Siesling S, MacGrogan G, Laurent A, Rondeau V. Validation of death prediction after breast cancer relapses using joint models. *BMC Med Res Meth.* 2015; 15: 27-41.
217. May CD, Sphyris N, Evans KW, Werden SJ, Guo W, Mani SA. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2011; 13(1): 202-214.
218. Mecollari V, Nieuwenhuis B, Verhaagen J. A perspective on the role of class III semaphorin signaling in central nervous system trauma. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8: 328.
219. Medicinska enciklopedija: Jugoslavenski leksikografski zavod Zagreb, 1967.
220. Meeran SM, Ahmed A, Tollefsbol TO. Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy. *Clin Epigenetics.* 2010; 1: 101-116.
221. Mees G, Dierckx R, Vangestel C, van de Wiele C. Molecular imaging of hypoxia with radiolabelled agents. *Eur J Nucl Med Mol Imag.* 2009; 36(10): 1674-1686.
222. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Manes S, Martinez AC. Chemokine signaling and functional responses: The role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Ann Rev Immunol.* 2001; 19: 397-421.
223. Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol.* 2000; 281:150-162.
224. Michel JB, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *Eur Heart J.* 2011; 32: 1977-1985.
225. Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 1993; 73: 161-195.
226. Miklavčič D, Davalos RV. Electrochemotherapy (ECT) and irreversible electroporation (IRE) -advanced techniques for treating deep-seated tumors based on electroporation. *BioMed Eng OnLine.* 2015; 14(3): 1-7.
227. Miljuš D, Živković S, Božić Z. Incidencija i mortalitet raka u centralnoj Srbiji. Registar za rak u centralnoj Srbiji. Institut za zaštitu zdravlja Srbije „Dr. Milan Jovanović - Batut“, Beograd, 2014.

228. Mo W, Chen J, Patel A, Zhang L, Chau V, Li Y, Cho W, Lim K, Xu J, Lazar AJ, Creighton CJ, Bolshakov S, McKay RM, Lev D, Le LQ, Parada LF. CXCR4/CXCL12 mediate autocrine cell-cycle progression in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors. *Cell*. 2013; 152(5): 1077-1090.
229. Momeny M, Saunus JM, Marturana F, McCart Reed AE, Black D, Sala G, Iacobelli S, Holland JD, Yu D, Da Silva L, Simpson PT, Khanna KK, Chenevix-Trench G, Lakhani SR. Heregulin-HER3-HER2 signaling promotes matrix metalloproteinase-dependent blood-brain-barrier transendothelial migration of human breast cancer cell lines. *Oncotarget*. 2015; 6(6): 3932-3946.
230. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
231. Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 176: 213-254.
232. Motalleb G. Artificial neural network analysis in preclinical breast cancer. *Cell J*. 2014; 15(4): 324-331.
233. Mozzillo N, Caraco C, Mori S, Di Monta G, Botti G, Ascierio PA, Caraco C, Scarlet L. Use of neoadjuvant Electrochemotherapy for the treatment of metastatic lesions big face in patients with melanoma. *J Transl Med*. 2012; 10: 131.
234. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001; 410: 50-56.
235. Munoz-Pinedo C. Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 738: 124-143.
236. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*. 2004; 104(8): 2224-2234.
237. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yoshidome K, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Kakudo K. Nitric oxide in breast cancer: induction of vascular endothelial growth factor-C and correlation with metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(4): 1201-1207.
238. Napotnik B, Rebersek M, Vernier PT, Mali B, Miklavcic D. Effects of high voltage nanosecond electric pulses on eukaryotic cells (in vitro): a systematic review. *Bioelectrochemistry*. 2016; 110: 1-12.
239. Neal RE, Singh R, Hatcher HC, Kock ND, Torti SV, Davalos RV. Treatment of breast cancer through the application of irreversible electroporation using a novel minimally invasive single needle electrode. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 123: 295-301.
240. Netter FH. Thorax. Mammary Gland. Atlas of Human Anatomy. 6nd ed. Philadelphia, Saunders-Elsevier, 2014, pp. 283.
241. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*. 2005; 85(1): 1-31.
242. Newman S, Miller A, Howe R. A study of the effect of weight and dietary fat on breast cancer survival time am. *J. Epidemiol*. 1986; 123 (5): 767-774.
243. Nilsson U, Garvin S, Dabrosin C. MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2007; 102: 253-261.
244. Nocera N, Lee C, De La Cruz L, Rosembli C, Czerniecki B. Restoring lost anti-HER-2 Th1 immunity in breast cancer: A crucial role for Th1 cytokines in therapy and prevention. *Front Pharmacol*. 2016; 7: 356.

245. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976; 194: 23-28.
246. O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001; 127(7):813-20.
247. Ohyama M, Tanaka T, Inuma M. A prenylated flavanone from roots of *Amorpha fruticosa*. *Phytochemistry*. 1998; 48/5: 907-909.
248. Omoto I, Matsumoto M, Okumura H, Uchikado Y, Setoyama T, Kita, Y, Natsugoe S. Expression of vascular endothelial growth factor-C and vascular endothelial growth factor receptor-3 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2014; 7: 1027-1032.
249. Oronsky B, Fanger G, Oronsky N, Knox S, Scicinski J. The implications of hyponitroxia in cancer. *Transl Oncol*. 2014; 7(2): 167-173.
250. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Edwin HTR, Fisher MD, Wickerham LD, Bryant J, Wolmark NMD. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2817-2826.
251. Palazon A, Goldrath A, Nizet V, Johnson RS. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity*. 2014; 41(4): 518-528.
252. Palmer, Biff F, Clegg, Deborah J. Oxygen sensing and metabolic homeostasis. *Mol Cell Endocrinol*. 2014; 397: 51-57.
253. Papadopoulos A, Fotiadis DI, Costaridou L. Improvement of microcalcification cluster detection in mammography utilizing image enhancement techniques. *Comput Biol Med*. 2008; 38: 1045-1055.
254. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*. 2006; 3:187-197.
255. Park H, Zhang Y, Georgescu S, Johnson K, Kong D, Galper J. Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. *Stem Cell Rev*. 2006; 2: 93–102.
256. Park K, Ali A, Kim D, An Y, Kim M, Shin H. Robust predictive model for evaluating breast cancer survivability. *Engl Appl Artif Intell*. 2013; 26: 2194-2205.
257. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 1160-1167.
258. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res*. 2004; 117: 3-32.
259. Pehlivanova VN, Tsoneva IH, Tzoneva RD. Multiple effects of electroporation on the adhesive behaviour of breast cancer cells and fibroblasts. *Cancer Cell Int*. 2012; 12(1): 9.
260. Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(22): 7621-7628.
261. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406: 747-752.
262. Pešić I, Krstić M, Pavlović M, Ilić D, Dimitrios K. Hormone sensitivity of tumor in women with breast cancer. *Acta Medica Medianae*. 2007; 46: 25-30.
263. Peto H, Roe F, Lee P, L. Levy L, Clack J. Cancer and aging in mice and men. *Brit J Cancer*. 1975; 32(4):411-426.

264. Pharoah PD, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BA. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet.* 2002; 31: 33-36.
265. Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M, Burdick MD, Sica A, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 2005; 280(23): 22473-22481.
266. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(9): 639-650.
267. Polyak K, Hahn WC. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med.* 2006; 12(3): 296-300.
268. Prakash O, Kumar A, Kumar P, Ajeet. Anticancer potential of plants and natural products: A review. *Am J Pharmacol Sci.* 2013; 1(6): 104-115.
269. Putra AC, Tanimoto K, Arifin M, Hiyama K. Hypoxia-inducible factor -1 $\alpha$  polymorphisms are associated with genetic aberrations in lung cancer. *Respirology.* 2011; 16(5): 796-802.
270. Pyšek P, Richardson D. Invasive species, environmental change and management, and health invasive species, environmental change and management, and health. *Annu Rev Envir Resour.* 2010; 35: 25-55.
271. Rabinowitz MH. Inhibition of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase domain oxygen sensors: tricking the body into mounting orchestrated survival and repair responses. *J Med Chem.* 2013; 56(23): 9369-9402.
272. Radak Đ, Maravić-Stojković V, Kolar J. Angioneogeneza. U: Radak Đ, Maravić-Stojković V, urednici. Imunologija u genezi i terapiji ateroskleroze. DC Grafički centar, Beograd, 2004; 75–80.
273. Radojević S. Sistematska topografska anatomija, grudni koš. Naučna knjiga, Beograd 1970, pp. 236-241.
274. Rafe V, Farhoud SH, Rasoolzadeh S. Breast cancer prediction by using C5.0 Algorithm and BOOSTING Method. *J Med Imaging Health Inf.* 2014; 4(4): 600-604.
275. Rahier NJ, Thomas CJ, Hecht SM. Camptothecin and its analogs. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. Eds. Anticancer Agents from Natural Products. Brunner-Routledge Psychology Press, Boca Raton, 2005, Chapter 2, pp. 5-22.
276. Rajendra Prasad N, Karthikeyan A, Karthikeyan S, Reddy BV. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Mol Cell Biochem.* 2011; 349: 11-19.
277. Ramos ES, Grochoski M, Braun-Prado K, Seniski GG, Cavalli IJ, Ribeiro E, Camargo A, Costa F, Klassen G. Epigenetic Changes of CXCR-4 and its ligand CXCL12 as prognostic factors for sporadic breast cancer. *PLoS One.* 2011; 6(12): 1-9.
278. Ramus SJ, Gayther SA. The Contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer. *Mol Oncol.* 2009; 3(2): 138-150.
279. Rantanen K, Pursiheimo J, Hogel H, Himanen V, Metzen E, Jaakkola PM. Prolyl hydroxylase PHD3 activates oxygen-dependent protein aggregation. *Mol Biol Cell.* 2008; 19: 2231-2240.
280. Rashad YA, Elkhodary TR, El-Gayar AM, Eissa LA. Evaluation of serum levels of HER2, MMP-9, nitric oxide, and total antioxidant capacity in Egyptian breast cancer patients: correlation with clinico-pathological parameters. *Sci Pharm.* 2014; 82(1): 129-145.
281. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay L, Madan A, Semenza L, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev.* 2000; 14: 34-44.

282. Ren W, Mi D, Yang K, Cao N, Tian J, Li Z, Ma B. The expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and its clinical significance in lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Swiss Med Wkly*. 2011; 143: 128-155.
283. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414: 105-111.
284. Ridnour LA, Thomas DD, Switzer C, Flores-Santana W, Isenberg JS, Ambs S, Roberts DD, Wink DA. Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. *Nitric Oxide*. 2008; 19(2): 73-76.
285. Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995; 376(6): 345-355.
286. Robnik-Sikonja M, Kononenko I. An adaptation of Relief for attribute estimation in regression. In: Fourteenth International Conference on Machine Learning. 1997; 296-304.
287. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr LB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 1990; 87: 7555-7559.
288. Rols MP, Teissie J. Ionic-strength modulation of electrically induced permeabilization and associated fusion of mammalian cells. *Eur J Biochem*. 1989; 179(1): 109-115.
289. Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke*. 1998; 29: 1020-1030.
290. Rutkowski P, Kaminska J, Kowalska M, Ruka W, Steffen J. Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: correlations with local tumor extent and prognosis. *J Surg Oncol*. 2003; 84: 151-159.
291. Sakarkar DM, Deshmukh VN. Ethnopharmacological review of traditional medicinal plants for anticancer activity. *Int J Pharm Tech Res*. 2011; 3(1): 298-308.
292. Sakurai T, Kudo M. Signaling pathways governing tumor angiogenesis. *Oncology*. 2011; 1: 24-29.
293. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: *in vivo* neovascularization induced by stromal-derived factor-1 $\alpha$ . *Am J Pathol*. 1999; 154(4): 1125-1135.
294. Samimi G, Fink D, Varki NM, Husain A, Hoskins WJ, Alberts DS, Howell SB. Analysis of MLH1 and MSH2 expression in ovarian cancer before and after platinum drug-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 1415-1421.
295. Sanchez-Martin L, Estechea A, Samaniego R, Sanchez-Ramon S, Vega MA, Sanchez-Mateos P. The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression. *Blood*. 2011; 117: 88-97.
296. Sandler A. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006; 255: 2542-2550.
297. Savil J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000; 407: 784-788.
298. Scarff R, Torloni H. Histological typing of breast tumours. World Health Organization, Geneva, 1968.
299. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008; 3/6: 1101-1108.
300. Schummer M, Green A, Beatty JD, Karlan BY, Karlan S, Gross J, Thornton S, McIntosh M, Urban N. Comparison of breast cancer to healthy control tissue discovers novel markers with potential for prognosis and early detection. *PLoS One*. 2010; 5: 1-9.



301. Seandel M, Butler J, Lyden D, Rafii S. A catalytic role for proangiogenic marrow-derived cells in tumor neovascularization. *Cancer Cell*. 2008; 13: 181-183.
302. Seinen JM, Styring E, Verstappen V, von Steyern FV, Rydholm A, Suurmeijer A, Hoekstra HJ. Radiation-associated angiosarcoma after breast cancer: high recurrence rate and poor survival despite surgical treatment with R0 resection. *Ann Surg Oncol*. 2012; 19(8): 2700-2706.
303. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 2001; 7: 345-350.
304. Semenza GL. Mechanisms of disease: oxygen sensing, homeostasis and disease. *N Engl J Med*. 2011; 365: 537-547.
305. Semenza, GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012; 148(3): 399-408.
306. Senger DR, Davis GE. Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011; 3(8): 1-20.
307. Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet*. 2001; 7: 677-685.
308. Sheikh AY, Rollins MD, Hopf HW, Hunt TK. Hyperoxia improves microvascular perfusion in a murine wound model. *Wound Repair Regen*. 2005; 13: 303-308.
309. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signaling and specific ligand, VEGF-E. *Cancer Sci*. 2003; 94(9): 751-756.
310. Shin YJ, Choi JS, Choi JY, Hou Y, Cha JH, Chun MH, Lee MY. Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 mRNA in glial cells following focal cerebral ischemia in rats. *J Neuroimmunol*. 2010; 229(1-2): 81-90.
311. Shoeb M. Anticancer agents from medicinal plants. Bangladesh. *J Pharmacol*. 2006; 1: 35-41.
312. Silve A, Mir LM. Part II: electrochemotherapy cell electropermeabilization and cellular uptake of small molecules: the electrochemotherapy concept. In: KT Stephen, G Julie, LW Edward (Eds.). *Clinical Aspects of Electroporation*. 2011; pp.75-76.
313. Simons M, Bonow RO, Chronos NA, Cohen DJ, Giordano FJ, Hammond HK, Laham RJ, Li W, Pike M, Sellke FW, Stegmann TJ, Udelson JE & Rosengart TK. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation*. 2000; 102(11): 73-86.
314. Sirkisoon SR, Carpenter RL, Rimkus T, Miller L, Metheny-Barlow L, Lo H-W. EGFR and HER2 signaling in breast cancer brain metastasis. *Front Biosci*. 2016; 8: 245-263.
315. Sluimer JC, Daemen MJ. Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis. *J Pathol*. 2009; 218: 7-29.
316. Smith A, Guerinot ML. Physiology and metabolism. Primary metabolism and nutrient assimilation: achieving a balanced diet. *Curr Opin Plant Biol*. 2003; 6: 205-207.
317. Snell CE, Turley H, McIntyre A, Li D, Masiero M, Schofield CJ, Gatter KC, Harris AL, Pezzella F. Proline-hydroxylated hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) upregulation in human tumours. *PLoS One*. 2014; 9(2): 1-9.
318. Solis P, Nuñez M, González C, Olivares A, Rojas A. Effects of the lifestyle habits in breast cancer transcriptional regulation. *Cancer Cell Int*. 2016; 16: 7-24.
319. Song ZB, Ni JS, Wu P, Bao YL, Liu T, Li M, Fan C, Zhang WJ, Sun LG, Huang YX, Li YX. Testes-specific protease 50 promotes cell invasion and metastasis by increasing NF- $\kappa$ B-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Cell Death Dis*. 2015; 6: 1-12.
320. Srabovic N, Mujagic Z, Mujanovic-Mustedanagic J, Softic A, Muminovic Z, Rifatbegovic A, Begic L. Vascular endothelial growth factor receptor-1 expression in breast cancer and its correlation to vascular endothelial growth factor a. *Int J Breast Cancer*. 2013; 2013: 1-6.

321. Stark AM, Anuszkiewicz B, Mentlein R, Yoneda T, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Differential expression of matrix metalloproteinases in brain- and bone-seeking clones of metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Neurooncol.* 2007; 81(1): 39-48.
322. Stojnev S, Ristić-Petrović A, Janković-Veličković L. Reactive oxygen species, apoptosis and cancer. *Vojnosanit Pregl.* 2013; 70(7): 675-658.
323. Sudar E. Regulacija ekspresije i aktivnosti endotelne i inducibilne azot-monoksid-sintaze u srcu gojaznih pacova tretiranih grelinom. Doktorka disertacija. Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu, 2011.
324. Sudhagar S, Sathya S, Lakshmi BS. Rapid non-genomic signalling by 17 $\beta$ -oestradiol through c-Src involves mTOR-dependent expression of HIF-1 $\alpha$  in breast cancer cells. *Br J Cancer.* 2011; 105: 953-960.
325. Sun Q, Zhou H, Binmadi NO, Basile JR. Hypoxia-inducible factor -1-mediated regulation of semaphoring 4D affects tumor growth and vascularity. *J Biol Chem* 2009; 284(46): 32066-32074.
326. Sun X, Charbonneau C, Wei L, Yang W, Chen Q, Terek RM. CXCR4-targeted therapy inhibits VEGF expression and chondrosarcoma angiogenesis and metastasis. *Mol Cancer Ther.* 2013; 12(7): 1163-1170.
327. Sun X, Wei L, Chen Q, Terek RM. CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression. *Mol Cancer.* 2010; 9(17): 1-11.
328. Sun Y, Goodison S, Li J, Liu L, Farmerie W. Improved breast cancer prognosis through the combination of clinical and genetic markers. *Bioinformatics.* 2007; 23: 30-37.
329. Štrumbelj E, Bosnić Z, Kononenko I, Zakontnik B, Grašič-Kuhar C. Explanation and reliability of prediction models: the case of breast cancer recurrence. *Knowl Inf Syst.* 2010; 24(2): 305-324.
330. Teicher B, Fricker S. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(11): 2927-2931.
331. Thielemann A, Baszczuk A, Kopczyński Z, Kopczyński P, Grodecka-Gazdecka S. Clinical usefulness of assessing VEGF and soluble receptors sVEGFR-1 and sVEGFR-2 in women with breast cancer. *Ann Agric Env Med.* 2013; 20(2): 293-297.
332. Thijssen VL, Poirier F, Baum LG, Griffioen AW. Galectins in the tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy. *Blood.* 2007; 110(8): 2819-2827.
333. Tomlinson, I, Sasieni P, Bodmer W. How many mutations in a cancer? *Am J Pathol.* 2002; 160: 755-758.
334. Townson JL, Chambers AF. Dormancy of solitary metastatic cells. *Cell Cycle.* 2006; 5(16): 1744-1750.
335. Tyan SW, Kuo WH, Huang CK, Pan CC, Shew JY, Chang KJ, Lee EY, Lee WH. Breast cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to secrete hepatocyte growth factor to enhance breast tumorigenesis. *PLoS One.* 2011; 6 (1): e0015313.
336. Uggeri F, Ronchi PA, Goffredo P, Garancini M, Degrate L, Nespoli L, Gianotti L, Romano F. Metastatic liver disease from non-colorectal, non-neuroendocrine, non-sarcoma cancers: a systematic review. *World J Surg Oncol.* 2015; 13(191): 1-8.
337. Vakkala M, Kahlos K, Lakari E, Paakko P, Kinnula V, Soini Y. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in in situ and invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 2408-2416.
338. van den Bos W, Scheffer HJ, Vogel JA, Wagstaff PG, de Bruin DM, de Jong MC, van Gemert MJ, de la Rosette JJ, Meijerink MR, Klaessens JH, Verdaasdonk RM. Thermal

- energy during irreversible electroporation and the influence of different ablation parameters. *J Vasc Interv Radiol*. 2016; 27(3): 433-443.
339. van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res*. 2008; 78(2): 203-212.
340. Vanini F, Kashfi K, Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol*. 2015; 6: 334-343.
341. Vaupel P, Hockel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography. *Antioxid Redox Sign*. 2007; 9(8): 1221-1235.
342. Veeck J, Esteller M. Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010; 15: 5-17.
343. Venkatesan RN, Bielas JH, Loeb LA. Generation of mutator mutants during carcinogenesis. *DNA Repair (Amst)*. 2006; 5: 294-302.
344. Vo AT, Millis RM. Epigenetics and breast cancers. *Obstet Gynecol Int*. 2012: 1-11.
345. Vogel JA, van Veldhuisen E, Agnass P, Crezee J, Dijk F. Time-dependent impact of irreversible electroporation on pancreas, liver, blood vessels and nerves: a systematic review of experimental studies. *Plos One*. 2016; 11(11): 1-18.
346. Volate SR, Davenport DM, Muga SJ, Wargovich MJ. Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *Carcinogenesis*. 2005; 26: 1450-1456.
347. Wagstaff DM, de Bruin PJ, Zondervan CD, Savci Heijink MR, Engelbrecht OM, van Delden TG, van Leeuwen H, Wijkstra JJ, de la Rosette MP. The efficacy and safety of irreversible electroporation for the ablation of renal masses: a prospective, human, in-vivo study protocol. *BMC Cancer*. 2015; 15 (165): 1-7.
348. Wagstaff PGK, Buijs W, van den Bos DM, de Bruin PJ, Zondervan JJ, de la Rosette MP. Irreversible electroporation: state of the art. *Onco Targets Ther*. 2016; 9: 2437-2446.
349. Wang J, Li G, Wang Y, Tang S, Sun X, Feng X, Li Y, Bao G, Li P, Mao X, Wang M, Liu P. Suppression of tumor angiogenesis by metformin treatment via a mechanism linked to targeting of HER2/HIF-1 $\alpha$ /VEGF secretion axis. *Oncotarget*. 2015; 6(42): 44579-44592.
350. Wang L. Mining causal relationships among clinical variables for cancer diagnosis based on Bayesian analysis. *Biodata Mining*. 2015; 8(13): 1-15.
351. Wang Q, Zhang H, Fishel R, Greene MI. *BRCA1* and cell signaling. *Oncogene*. 2000; 19: 6152-6158.
352. Warburg O. The Prime Cause and Prevention of Cancer. Lindau, Lake Constance, Germany, 1966.
353. Wegner SA, Ehrenberg PK, Chang G, Dayhoff DE, Sleeker AL, Michael NL. Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem*. 1998; 273(8): 4754-4760.
354. Weinberg RA. The Biology of Cancer. 2nd ed., Garland Science, New York and London, 2014.
355. Weissman BA, Jones CL, Liu Q and Gross SS. Activation and inactivation of neuronal nitric oxide synthase: characterization of Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>-dependent Calmodulin binding. *Eur J Pharmacol* 2002; 435: 9-18.
356. Wiater K, Zdzienicki M, Morysiński T, Kosęła H, Klimczak A, Obrębski M, Ptaszyński K, Rutkowski P. Effective treatment of recurrent, advanced dermatofibrosarcoma protuberans by electrochemotherapy. *Eur J Dermatol*. 2013; 23: 260-261.
357. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 1998; 25: 434-456.

358. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991; 5(8): 2145-2154.
359. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011; 30: 87.
360. Wu QW, Yang QM, Huang YF, She HQ, Liang J, Yang QL, Zhang ZM. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-9 in lymphatic invasiveness and metastasis of breast cancer. *PLoS One.* 2014; 9(5): 1-6.
361. Wu W, Qian L, Chen X, Ding B. Prognostic significance of CXCL12, CXCR-4, and CXCR7 in patients with breast cancer. *Int J Clin Exp Path.* 2015; 8(10): 13217-13224.
362. Xu C, Zhao H, Chen H, Yao Q. CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Drug Des Dev Ther.* 2015; 9: 4953-4964.
363. Xu L, Duda DG, di TE, Ancukiewicz M, Chung DC, Lauwers GY, Samuel R, Shellito P, Czito BG, Lin PC, Poleski M, Bentley R, Clark JW, Willett CG, Jain RK. Direct evidence that bevacizumab, an anti-VEGF antibody, up-regulates SDF1alpha, CXCR4, CXCL6, and neuropilin 1 in tumors from patients with rectal cancer. *Cancer Res.* 2009; 69: 7905-7910.
364. Xu W, Liu L, Loizidou M, Ahmed M, Ian C. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Research.* 2002; 12: 311-320.
365. Yang J, Altahan A, Jones DT, Buffa FM, Bridges E, Interiano RB, Qu C, Vogt N, Li JL, Baban D, Ragoussis J, Nicholson R, Davidoff AM, Harris AL. Estrogen receptor- $\alpha$  directly regulates the hypoxia-inducible factor 1 pathway associated with antiestrogen response in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2015; 112: 15172-15177.
366. Yang WT, Lam WW, Cheung H, Suen M, King WW, Metreweli C. Sonographic, magnetic resonance imaging, and mammographic assessments of preoperative size of breast cancer. *J Ultrasound Med.* 1997; 16(12): 791-797.
367. Yarmush ML, Golberg A, Sersa G, Kotnik T, Miklavcic D. Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014; 16: 295-320.
368. Yasuoka H, Tsujimoto M, Yoshidome K, Nakahara M, Kodama R, Sanke T, Nakamura Y. Cytoplasmic CXCR4 expression in breast cancer: induction by nitric oxide and correlation with lymph node metastasis and poor prognosis. *BMC Cancer.* 2008; 8(340): 1-10.
369. Yehia L, Boulos F, Jabbour M, Mahfoud Z, Fakhruddin N, El-Sabban M. Expression of HIF-1 $\alpha$  and markers of angiogenesis are not significantly different in triple negative breast cancer compared to other breast cancer molecular subtypes: implications for future therapy. *PLoS One.* 2015; 10(6): 1-14.
370. Yousef EM, Tahir MR, St-Pierre Y, Gaboury LA. MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. *BMC Cancer.* 2014; 14(609): 1-12.
371. Zagzag D, Esencay M, Mendez O, Yee H, Smirnova I, Huang Y, Chiriboga L, Lukyanov E, Liu M, Newcomb E. Hypoxia- and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 expression in glioblastomas: one plausible explanation of Scherer's structures. *Am J Pathol.* 2008; 173: 545-560.
372. Zhai W, Jeong H, Cui L, Krainc D, Tjian R. *In vitro* analysis of huntingtin-mediated transcriptional repression reveals multiple transcription factor targets. *Cell.* 2005; 7: 1241-1253.
373. Zhang B, Cao X, Liu Y, Cao W, Zhang F, Zhang S, Hongtao Li, Ning L, Fu L, Niu Y, Niu R, Sun B and Hao X. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. *BMC Cancer.* 2008; 8(83): 1-10.
374. Zhang H, Wong CCL, Wei H, Korangath P, Chaturvedi P, Schito L, Chen J, Krishnamachary B, Winnard PT Jr, Raman V, Zhen L, Mitzner WA, Sukumar S, Semenza

- GL. HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. *Oncogene*. 2012; 31(14): 1757-1770.
375. Zhang HN, He JH, Yuan L, Lin ZB. In vitro and in vivo protective effects of Ganoderma lucidum polysaccharides on alloxan-induced pancreatic islets damage. *Life Sci*. 2003; 73(18): 2307-2319.
376. Zhang Q, Yang H. The roles of VHL-dependent ubiquitination in signaling and cancer. *Front Oncol*. 2012; 2(35): 1-7.
377. Zhang S, Yi S, Zhang D, Gong M, Cai Y, Zou L. Intratumoral and peritumoral lymphatic vessel density both correlate with lymph node metastasis in breast cancer. *Sci Rep*. 2017; 7: 1-7.
378. Zhang ZQ, Han YZ, Nian Q, Chen G, Cui SQ, Wang XY. Tumor invasiveness, not lymphangiogenesis, is correlated with lymph node metastasis and unfavorable prognosis in young breast cancer patients ( $\leq 35$  Years). *PLoS One*. 2015; 10(12): 1-15.
379. Zhao S, Ma W, Zhang M, Tang D, Shi Q, Xu S, Zhang X, Liu Y, Song Y, Liu L, Zhao YC, Ni XJ, Li Y, Dai M, Yuan ZX, Zhu YY, Luo CY. Peritumoral lymphangiogenesis induced by vascular endothelial growth factor C and D promotes lymph node metastasis in breast cancer patients. *World J Surg Oncol*. 2012; 10: 165.
380. Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ /CXCR-4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007; 50: 274-280.
381. Zhuang PY, Shen J, Zhu XD, Lu L, Wang L, Tang ZY, Sun HC. Prognostic roles of cross-talk between peritumoral hepatocytes and stromal cells in hepatocellular carcinoma involving peritumoral VEGF-C, VEGFR-1 and VEGFR-3. *PLoS One*. 2013; 8(5): 1-11.
382. Zibara K, Awada ZDib L, El-Saghir J, Al-Ghadban S, Ibrik A, El-Zein N, El-Sabbanb, M. Anti-angiogenesis therapy and gap junction inhibition reduce MDA-MB-231 breast cancer cell invasion and metastasis *in vitro* and *in vivo*. *Sci Rep*. 2015; 5(12598).
383. Zinamosca L, Laudisi A, Petramala L, Marinelli C, Roselli M, Vitolo D, Montesani C, Letizia C. von Hippel Lindau disease with colon adenocarcinoma, renal cell carcinoma and adrenal pheochromocytoma. *Intern Med*. 2013; 52(14): 1599-1603.
384. Zubor P, Hatok J, Moricova P, Kajo K, Kapustova I, Mendelova A, Racay P, Danko J. Gene expression abnormalities in histologically normal breast epithelium from patients with luminal type of breast cancer. *Mol Biol Rep*. 2015; 42: 977-988.
385. Žižić JB, Vuković NL, Jadranin MB, Anđelković BD, Tešević VV, Kacaniova MM, Sukdolak SB, Marković SD. Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line. *J Sci Food Agric*. 2013; 93(12): 3001-3009.

## КОРИШЋЕНЕ ИНТЕРНЕТ СТРАНИЦЕ

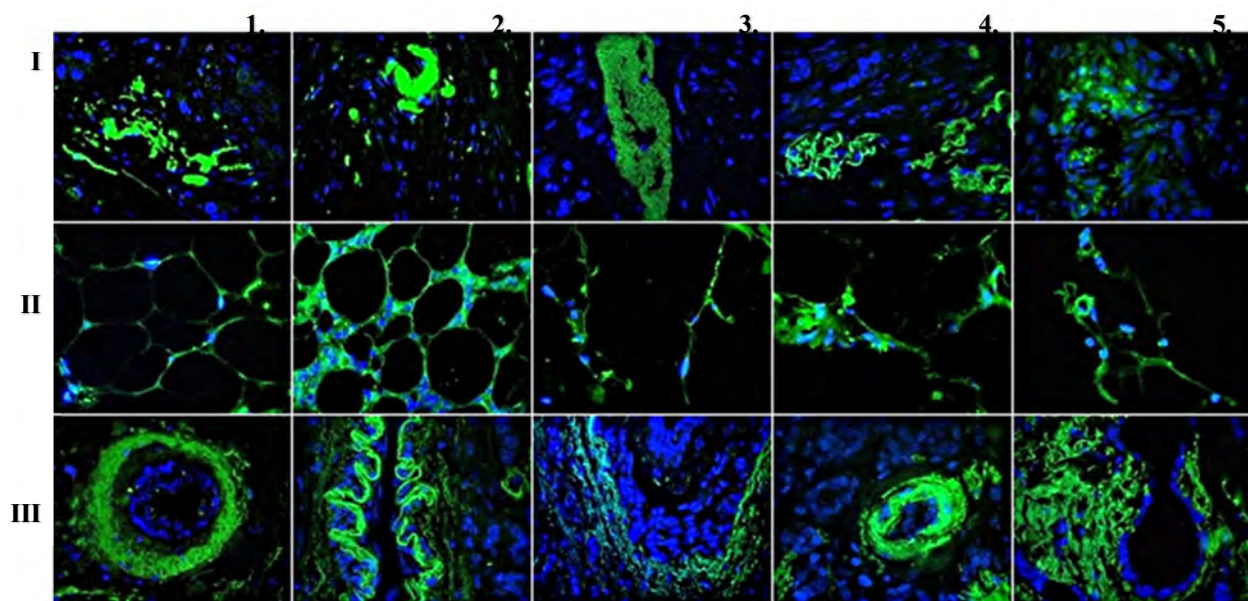
1. [ACEA Biosciences, Inc. \(ACEA\), xCELLigence RTCA DP Instrument Flexible Real-time Cell Monitoring. San Diego, USA, 2014.](#)
2. <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=2493>
3. [http://www.thebestoncologist.com/breast\\_cancer.html#Pathology](http://www.thebestoncologist.com/breast_cancer.html#Pathology)
4. <http://www.whathealth.com/breastcancer/her2receptor.html>
5. <http://flipper.diff.org/app/items/info/7263>
6. <https://www.geneyouin.ca/brca-mutation-testing-can-classify-type-and-severity-of-cancer/>
7. <https://www.biooncology.com/pathways/vegf/vegf-tumor-angiogenesis.html>
8. [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/sr/e/ee/Formiranje\\_krvnih\\_sudova.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/sr/e/ee/Formiranje_krvnih_sudova.jpg)
9. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=21883723>
10. [http://www.whatayear.org/10\\_13.php](http://www.whatayear.org/10_13.php)
11. <http://www.nature.com/nm/journal/v17/n11/full/nm.2537.html?message-global=remove>
12. <http://www.intechopen.com/books/evolution-of-the-molecular-biology-of-brain-tumors-and-the-therapeutic-implications/hypoxia-angiogenesis-and-mechanisms-for-invasion-of-malignant-gliomas>
13. <https://www.dovepress.com/cxcr4-in-breast-cancer-oncogenic-role-and-therapeutic-targeting-peer-reviewed-fulltext-article-DDDT#>
14. <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/18/19/5196>

## ПРИЛОЗИ

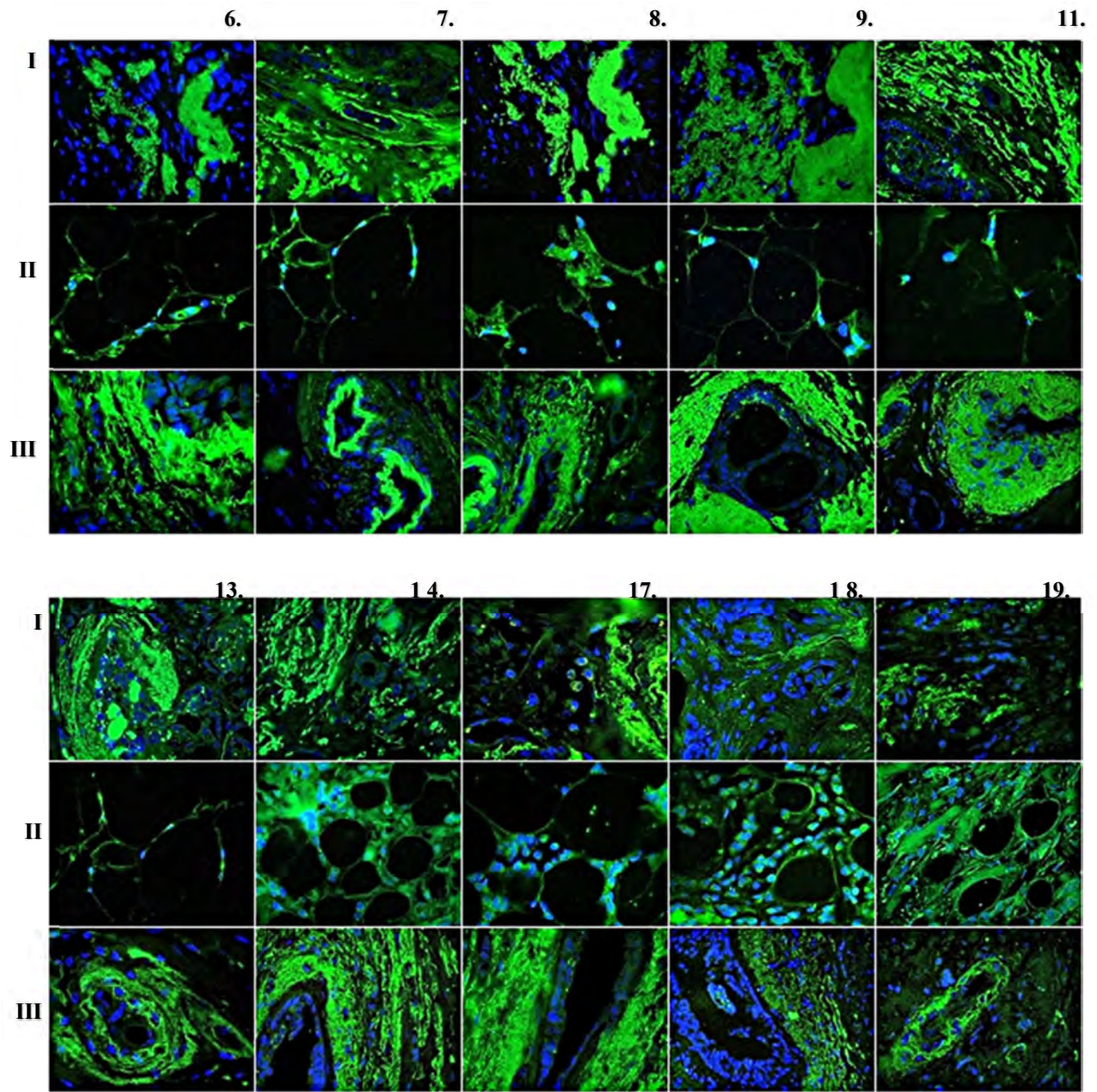
### Прилог 1

#### Протеинска експресија CXCR-4

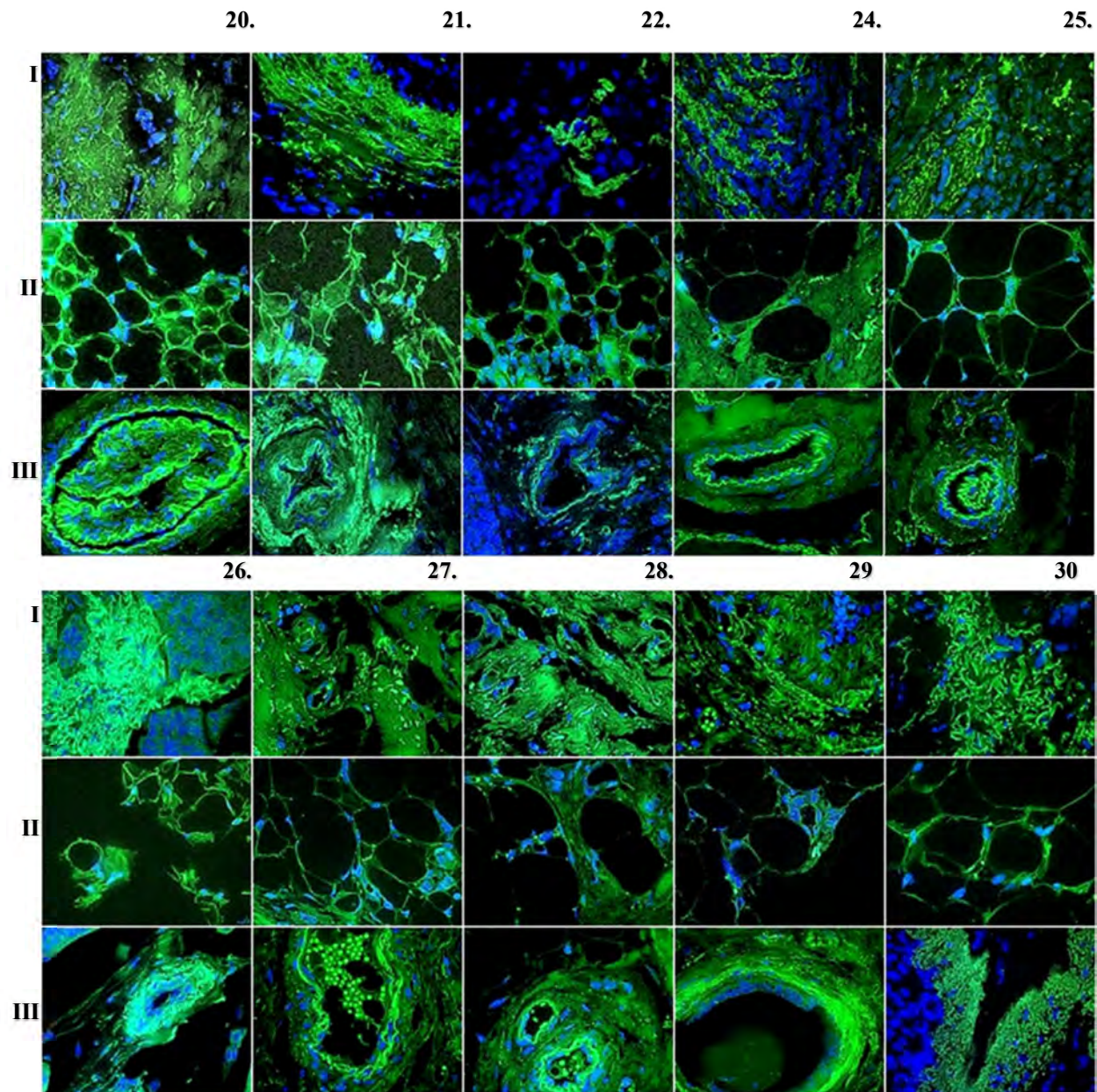
На *Слици 24* је представљена протеинска експресија CXCR-4 рецептора на попречним пресецима кроз карциномско и перитуморско ткиво код 45 пацијената са карциномом дојке (обележени редним бројевима у колонама). Примећује се разлика у протеинској експресији CXCR-4 рецептора између попречних пресека кроз карциномско ткиво представљено у првом реду (I) у односу на перитуморско ткиво у другом реду (II). Протеинска експресија CXCR-4 рецептора на попречном пресеку кроз крвни суд, представља унутрашњу позитивну контролу (ред III).



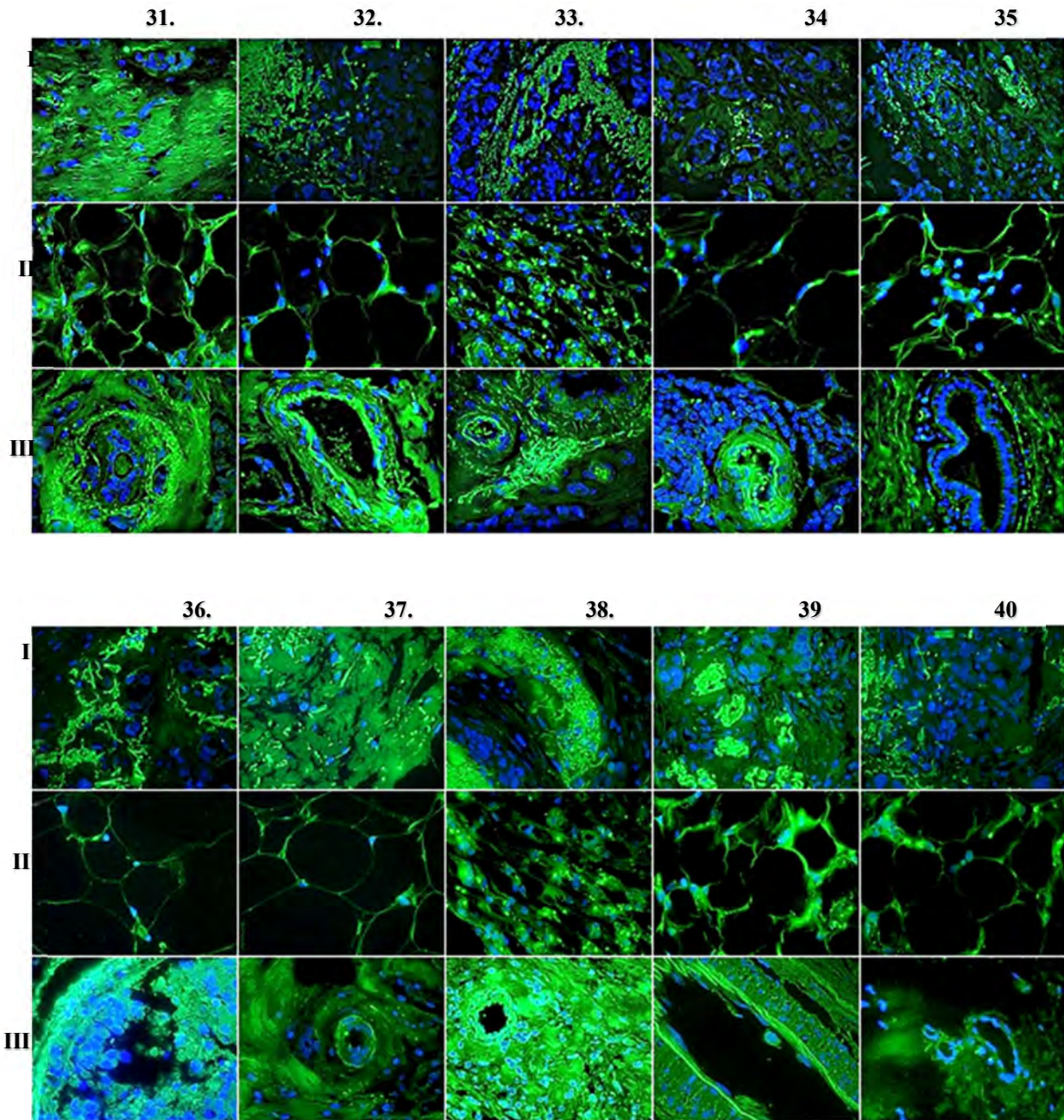




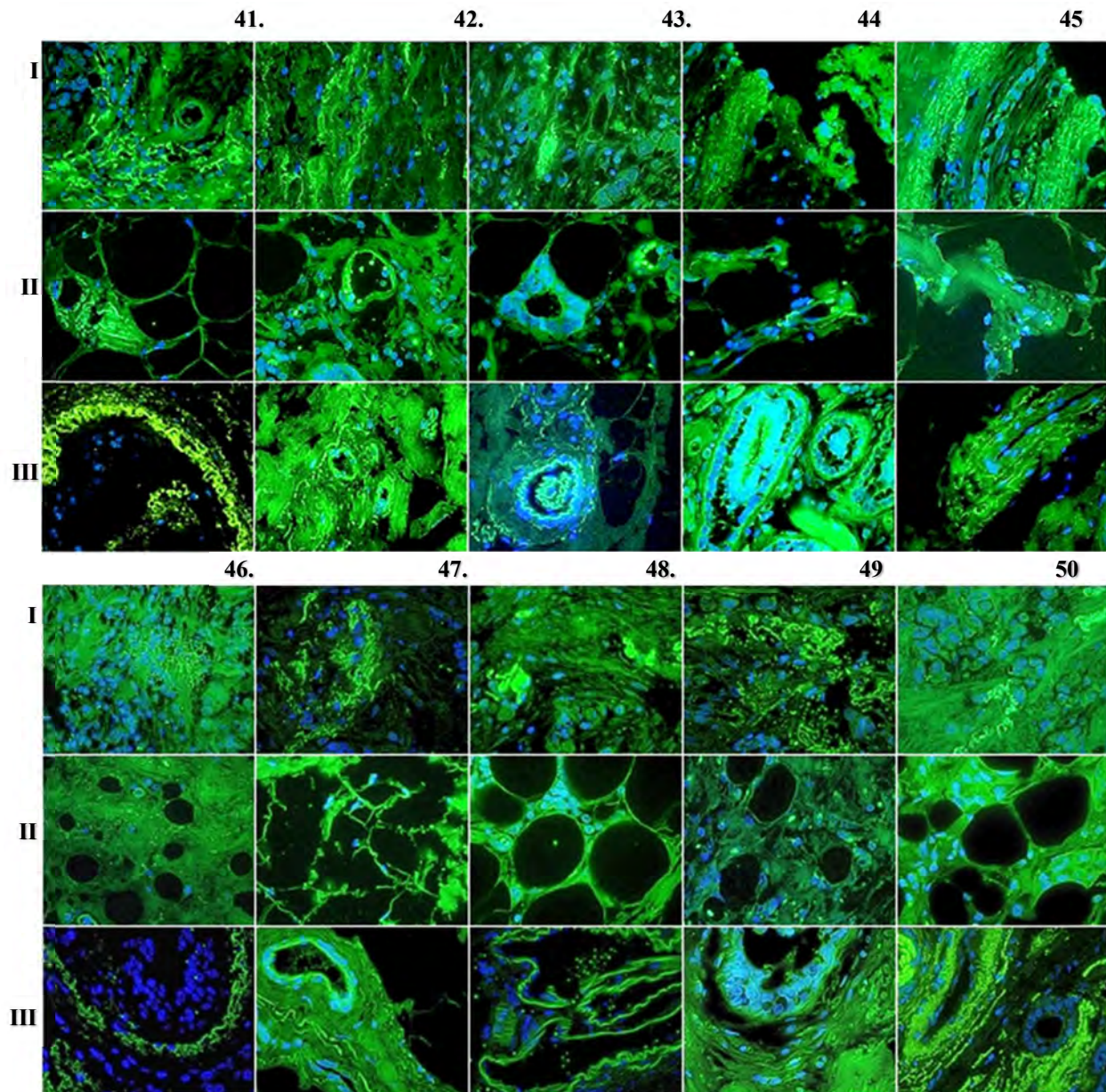








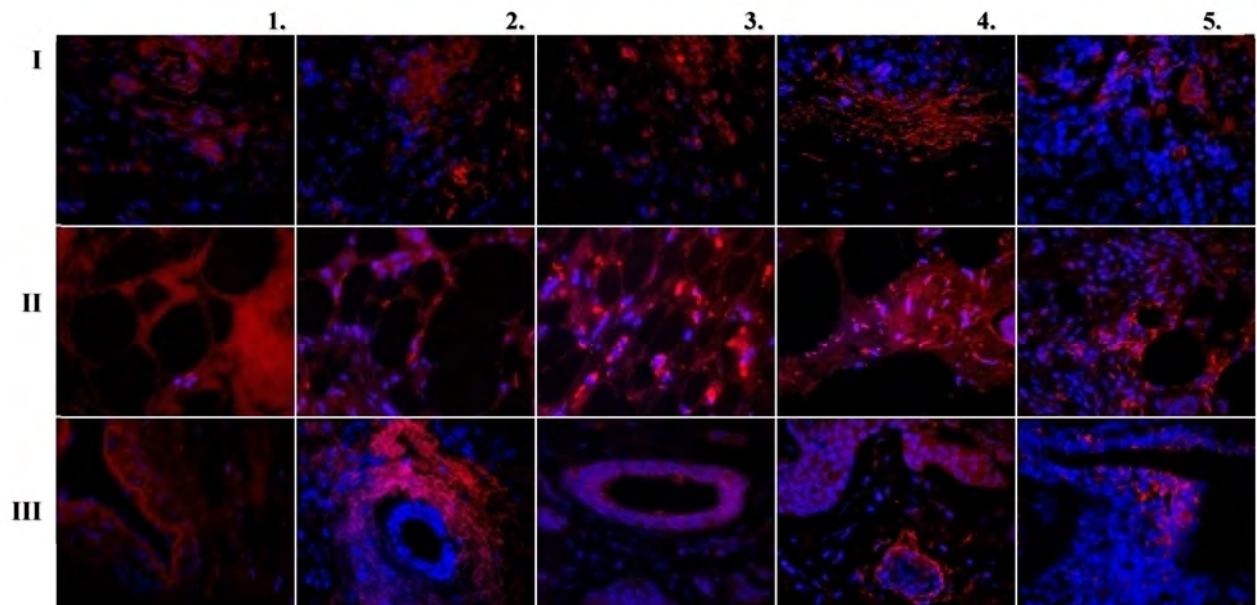




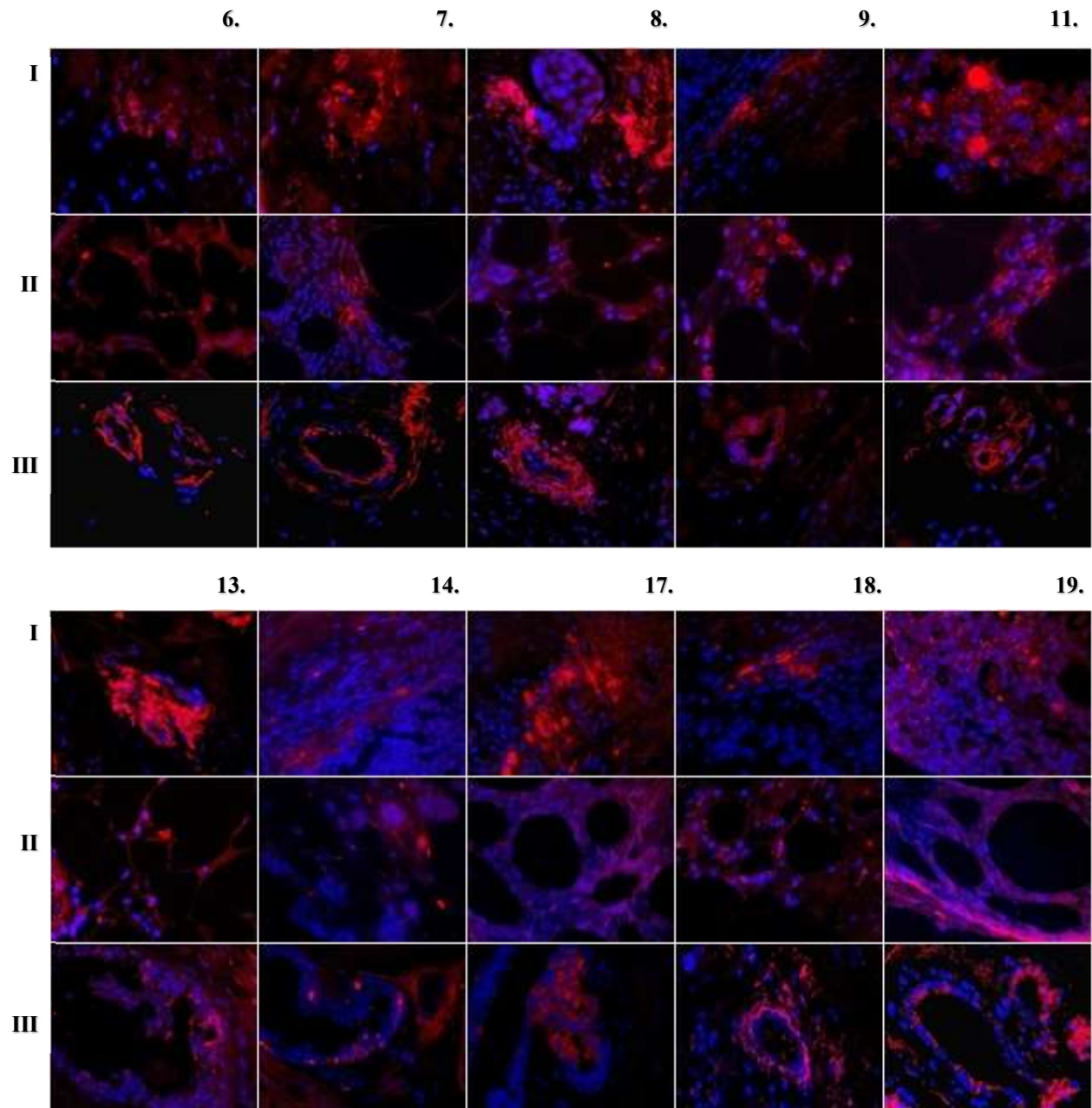
**Слика 24.** Протеинска експресија CXCR-4 рецептора у перитуморском (II колона) и ткиву карцинома (I колона) код пацијената са карциномом дојке. Унутрашња позитивна контрола представљена у је у колони III. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а рецептори CXCR-4 зелено (секундарно антитело *Goat Anti-Rabbit IgG FITC*)

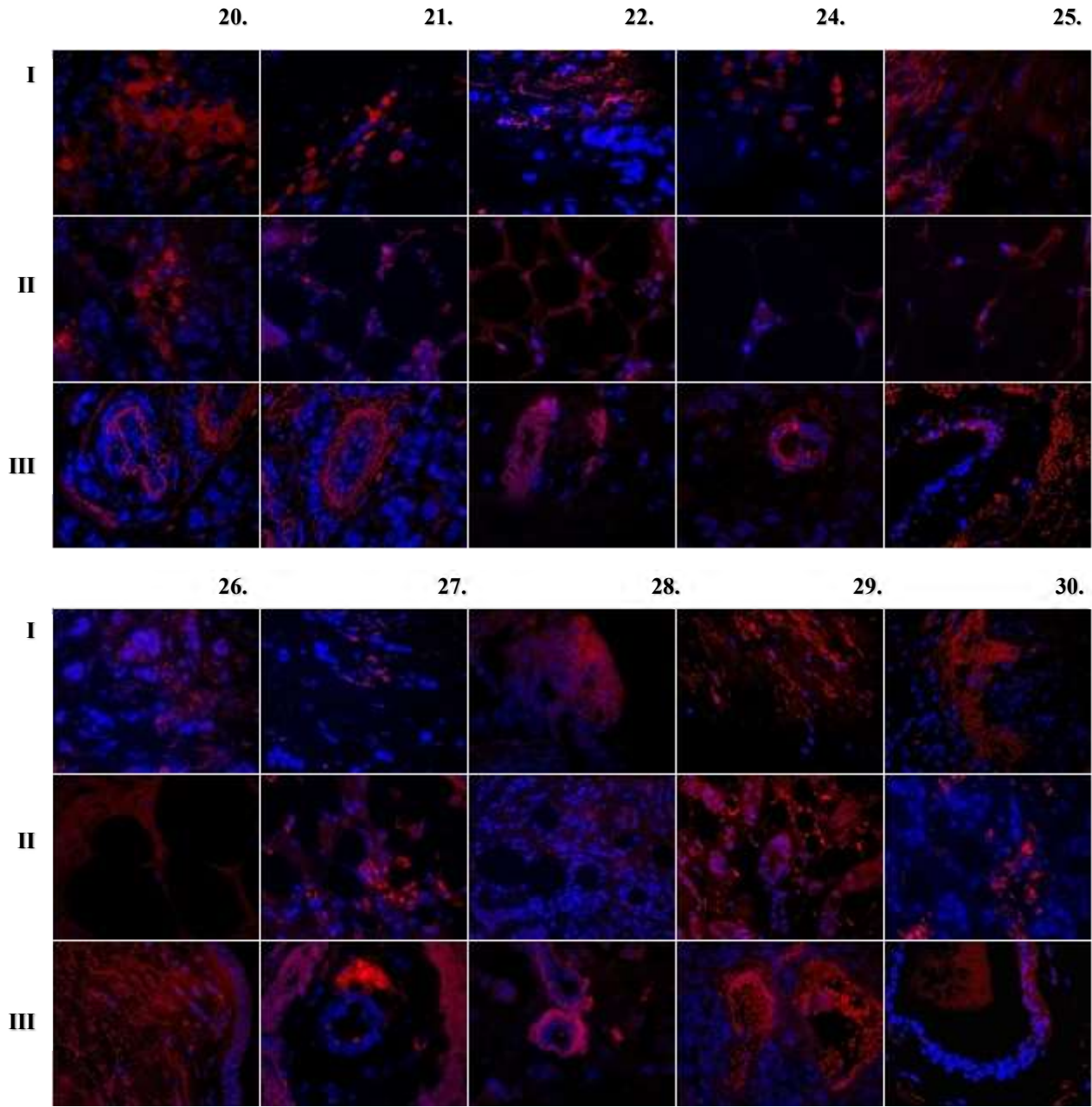
**Протеинска експресија VEGF**

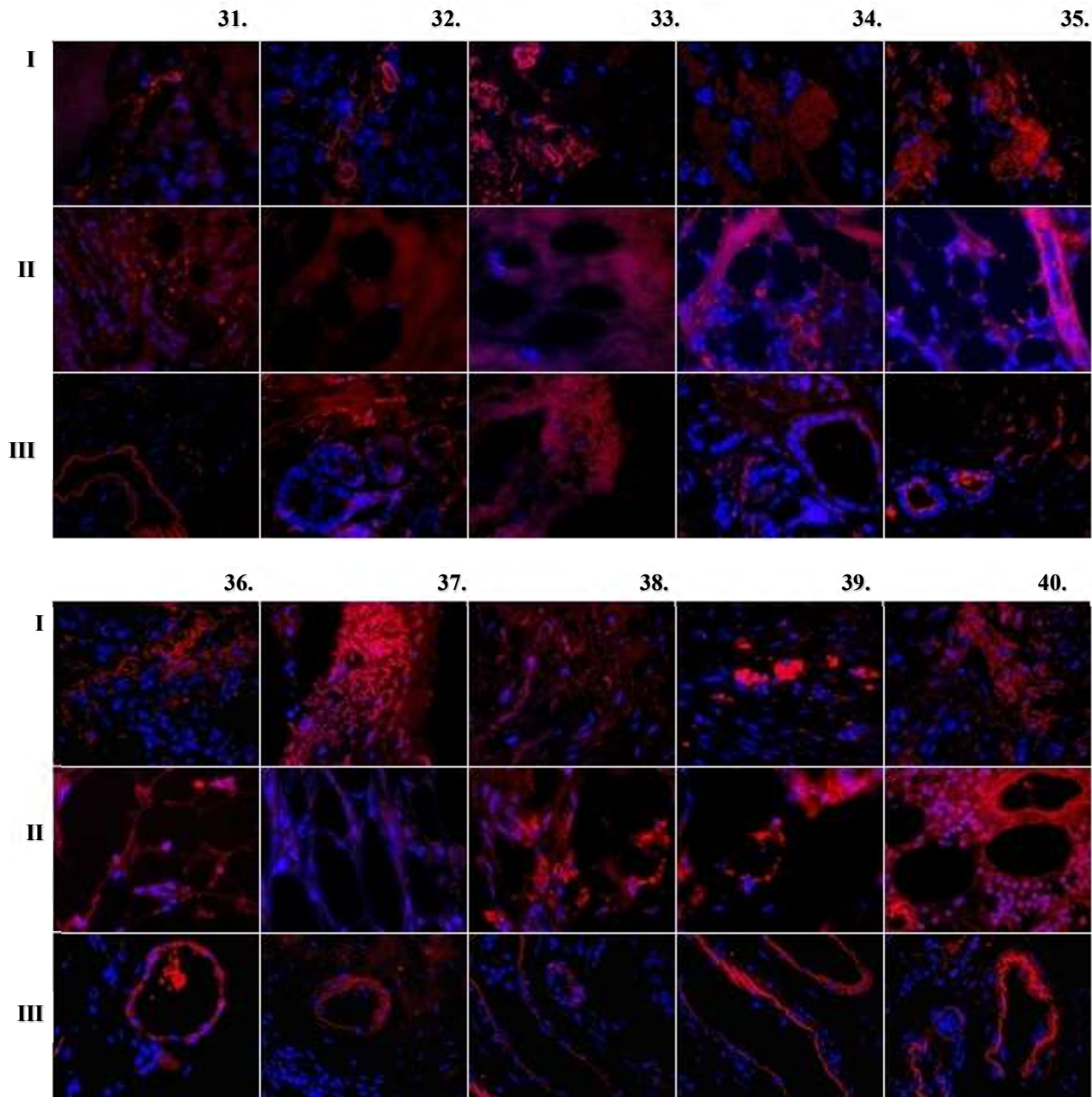
На *Слици 25* је представљена протеинска експресија VEGF рецептора на попречним пресецима кроз карциномско и перитуморско ткиво код 45 пацијената са карциномом дојке (обележени редним бројевима у колонама). Примећује се разлика у протеинској експресији VEGF рецептора између попречних пресека кроз карциномско ткиво представљено у првом реду (I) у односу на перитуморско ткиво у другом реду (II). Протеинска експресија VEGF рецептора на попречном пресеку кроз крвни суд, представља унутрашњу позитивну контролу (ред III).



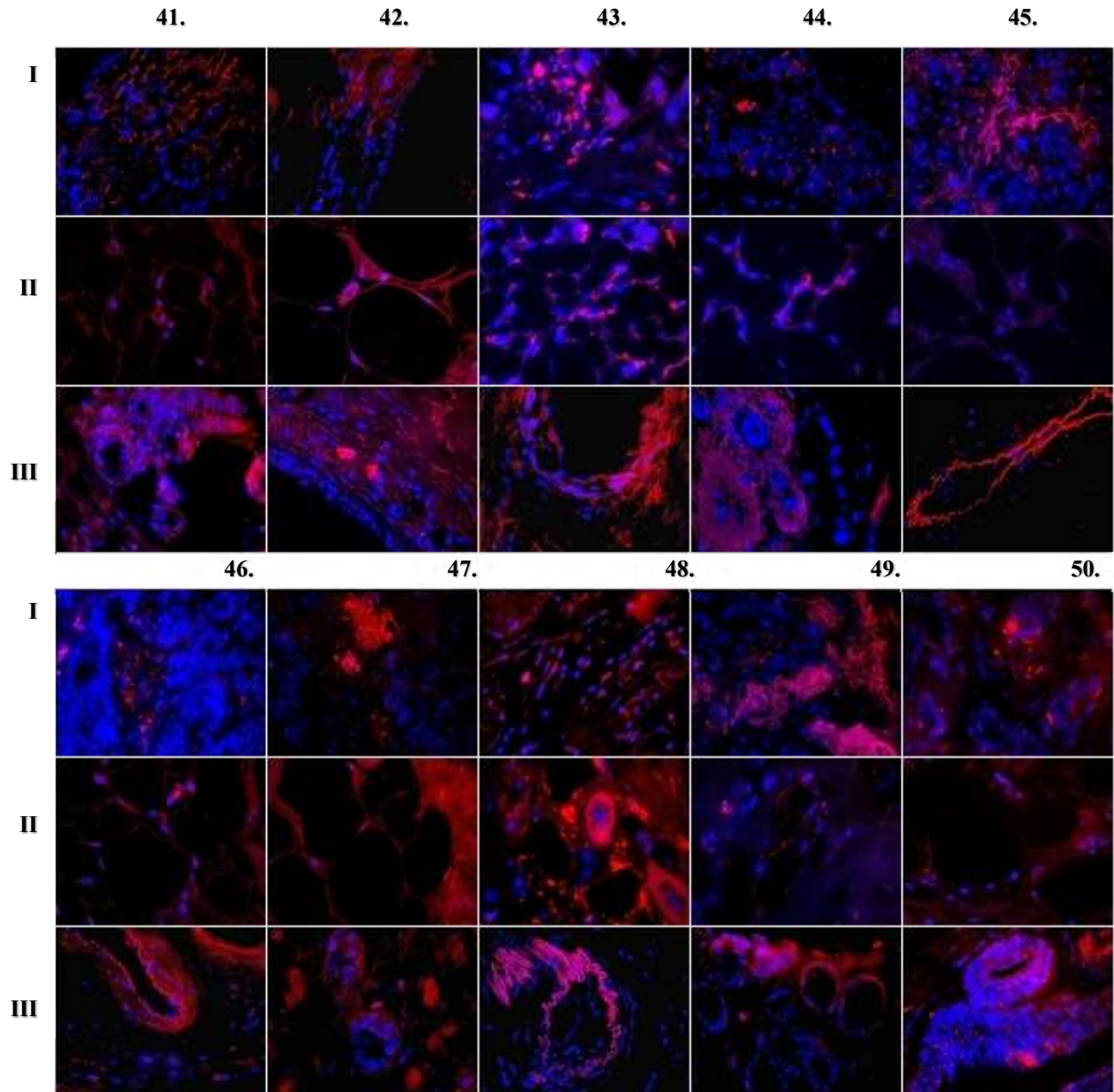












**Слика 25.** Протеинска експресија VEGF рецептора у перитуморском (II колона) и ткиву карцинома (I колона) код пацијената са карциномом дојке. Унутрашња позитивна контрола представљена у је у колони III. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећачању 600×. Једра су обојена плаво (*DAPI боја*), а рецептори VEGF црвено (секундарно антитело *Dnk pAb* у *Ms IgG PE*).



## Прилог 2

Креирање и обрађивање резултата *data mining* модела у овом истраживању остварено је у сарадњи са Бојаном Анђелковић-Ћирковић са Факултета инжењерских наука у Крагујевцу која је део тима под ингеренцијом проф др Ненада Филиповића.

Користили смо 3 алгоритма за филтрирање—mRMR, ReliefF и Information Gain (Robnik-Sikonja и сар., 1997; Cover и сар., 1991). Атрибути су ранжирани према једначини (1) где  $n$ , представља број атрибута а  $rank(i)$ ,  $rank_{mRMR}(i)$ ,  $rank_{reliefF}(i)$  и  $rank_{IG}(i)$  представљају укупан ранг атрибута и рангова атрибута и у односу на mRMR, reliefF и IG алгоритме, респективно. Атрибути највишег ранга су селектовани за креирање редукованог сета података.

$$rank(i) = (n - rank_{mRMR}(i)) + (n - rank_{reliefF}(i)) + (n - rank_{IG}(i)) \quad (1)$$

Тачност (*Accuracy-AC*) представља пропорцију укупног броја предвиђања која су била тачна. Према једначини (2), где TP и TN представљају број позитивних и негативних инстанци које су исправно класификоване, док FN и FP представљају број лажно позитивних и лажно негативних налаза, респективно. Сензитивност (*Sensitivity-SENS*) је дефинисана као пропорција позитивних налаза који су исправно класификовани према једначини (3). Представља способност да се исправно детектује појединачни пацијент који поседује особину од интереса. Специфичност (*Specificity*) је мера тачности теста у односу на лажно позитивне резултате (4).

$$AC = \frac{TP+TN}{TP+FN+FP+T} \quad (2)$$

$$SENS = \frac{TP}{TP+F} \quad (3)$$

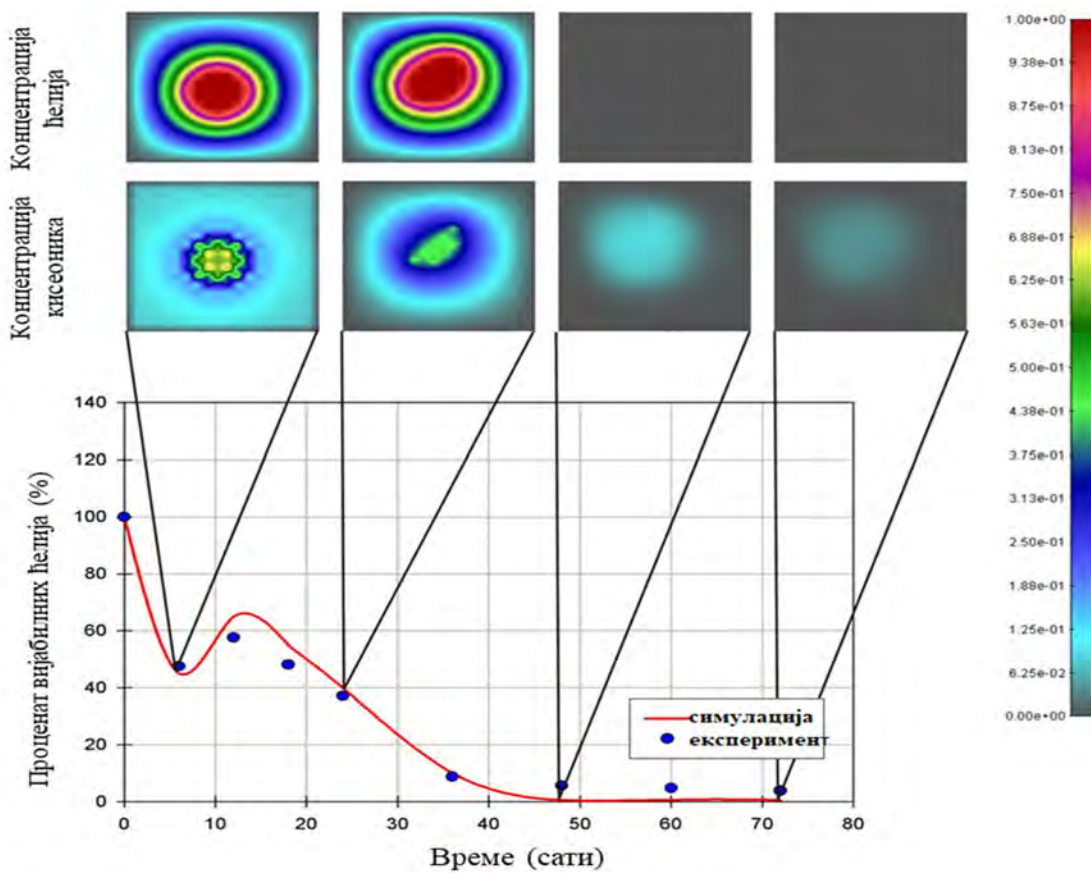
$$SPEC = \frac{TN}{TN+FP} \quad (4)$$

### **Прилог 3**

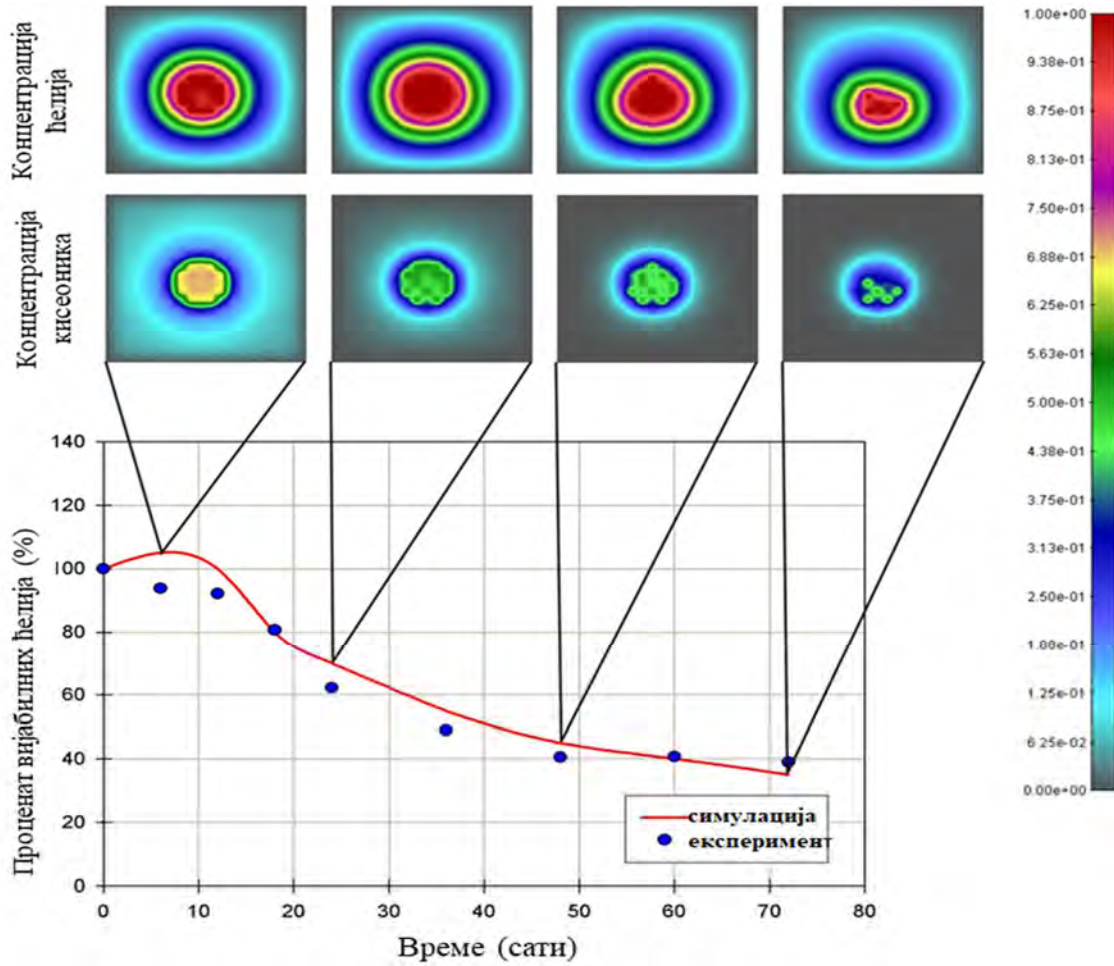
Креирање и обрађивање резултата *нумеричког модела* модела у истраживању ефеката електропорације на ћелијским линијама је остварено је у сарадњи са Тијаном Ђукић и Милошем Радовићем са Факултета инжењерских наука у Крагујевцу, који су део тима под ингеренцијом проф др Ненада Филиповића.

На бази експеримената у којима смо испитивали утицај електропорације на одређену ћелијску линију од сакупљених података добијених у експерименту формирали смо базу података. Коришћењем представљеног нумеричког модела могуће је нумерички проценити проценат вијабилних ћелија у сваком моменту након ЕП третмана (Cvetković и сар., 2017). Презентовани модел разматра неколико биолошких аспеката – агресивност тумора, интеракцију између карциномских ћелија, ефекат утрошка кисеоника, итд. Добро слагање експерименталних и резултата добијених компјутерском симулацијом показује да модел може бити успешно коришћен за предикцију понашања ћелија под условима електропорације какви нису конкретно коришћени у експерименту, тј. можемо испитивати шта би се вероватно дешавало под условима експозиције (дужина, број пулсева, интензитет поља, итд.) које нисмо користили у конкретном експерименту. Улазни параметри добијени конкретним експерименталним испитивањима се користе за израду базе података, коју користи поменути софтвер (*Графикони 35, 36, 37, 38 и 39*).

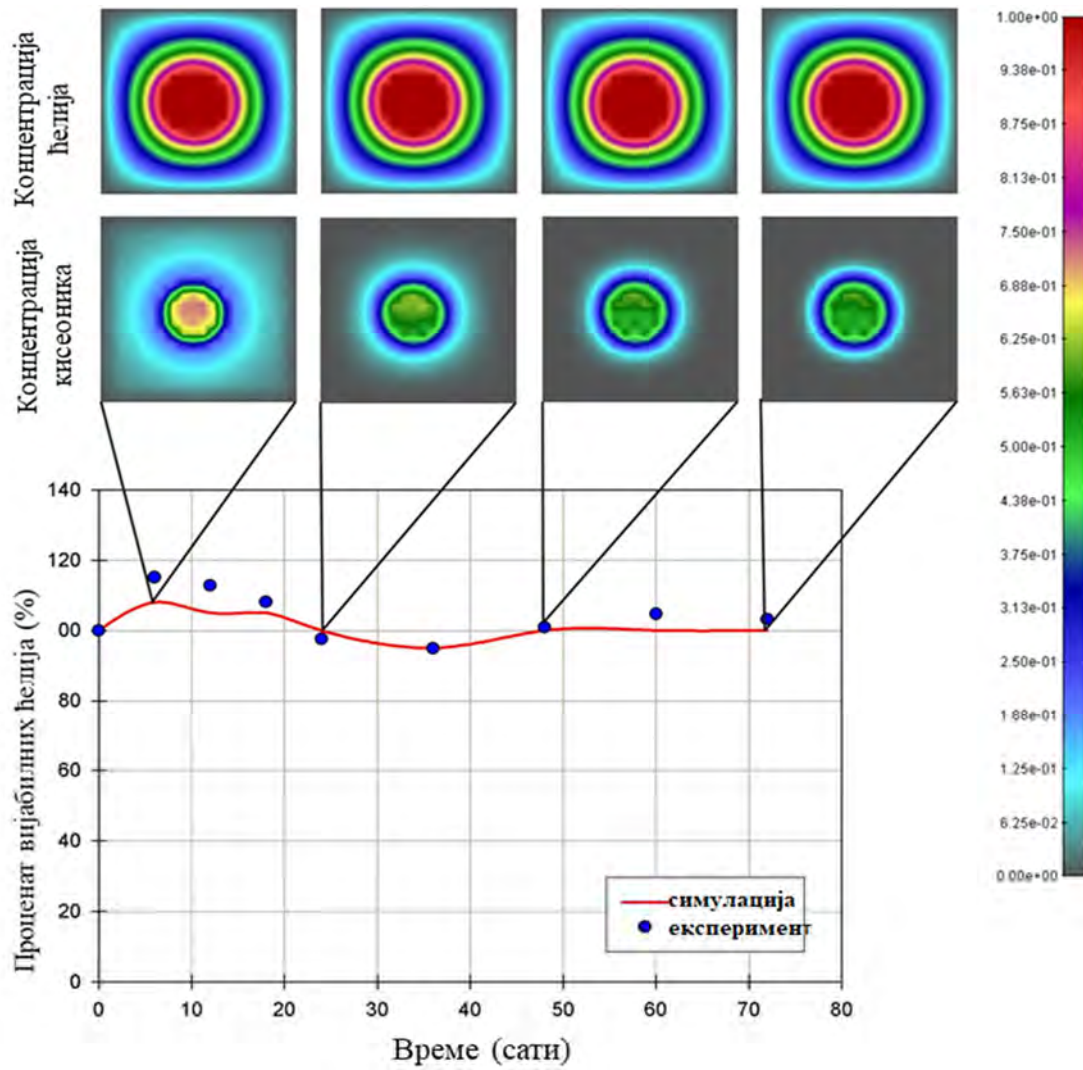
**Графикон 35.** Нумеричка симулација дистрибуције вијабилних ћелија и концентрације кисеоника на ћелијској линији карцинома колона SW-480. Анализирање нетретираних ћелија након 6, 24, 48 и 72 сата.



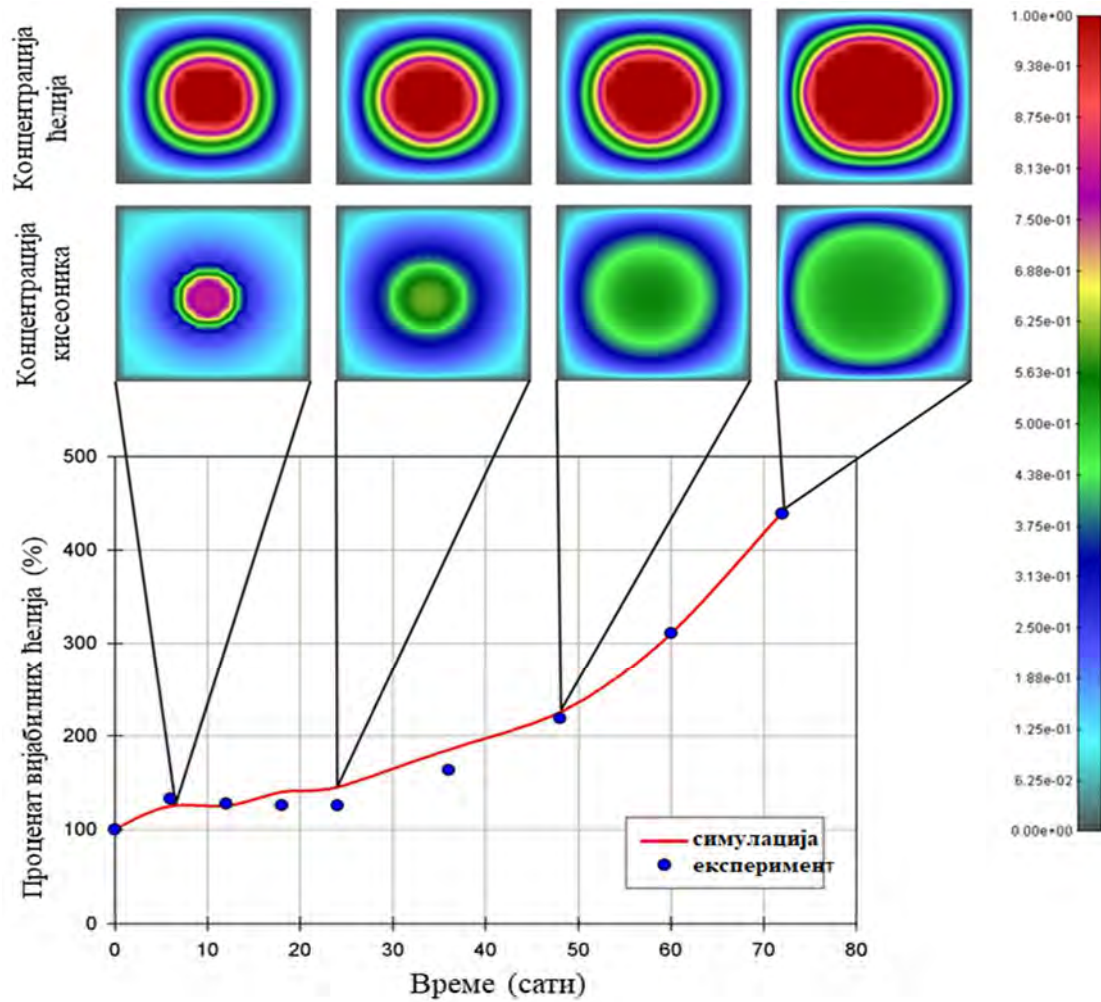
Графикон 36. Нумеричка симулација ефекта електропорације на ћелијској линији карцинома колона SW-480. Анализирање ефеката електропорације ( $250 \text{ Vcm}^{-1}$ ) након 6, 24, 48 и 72 сата.



Графикон 37. Нумеричка симулација ефекта електропорације на ћелијској линији карцинома колона SW-480. Анализирање ефеката електропорације ( $375 \text{ V cm}^{-1}$ ) након 6, 24, 48 и 72 сата.

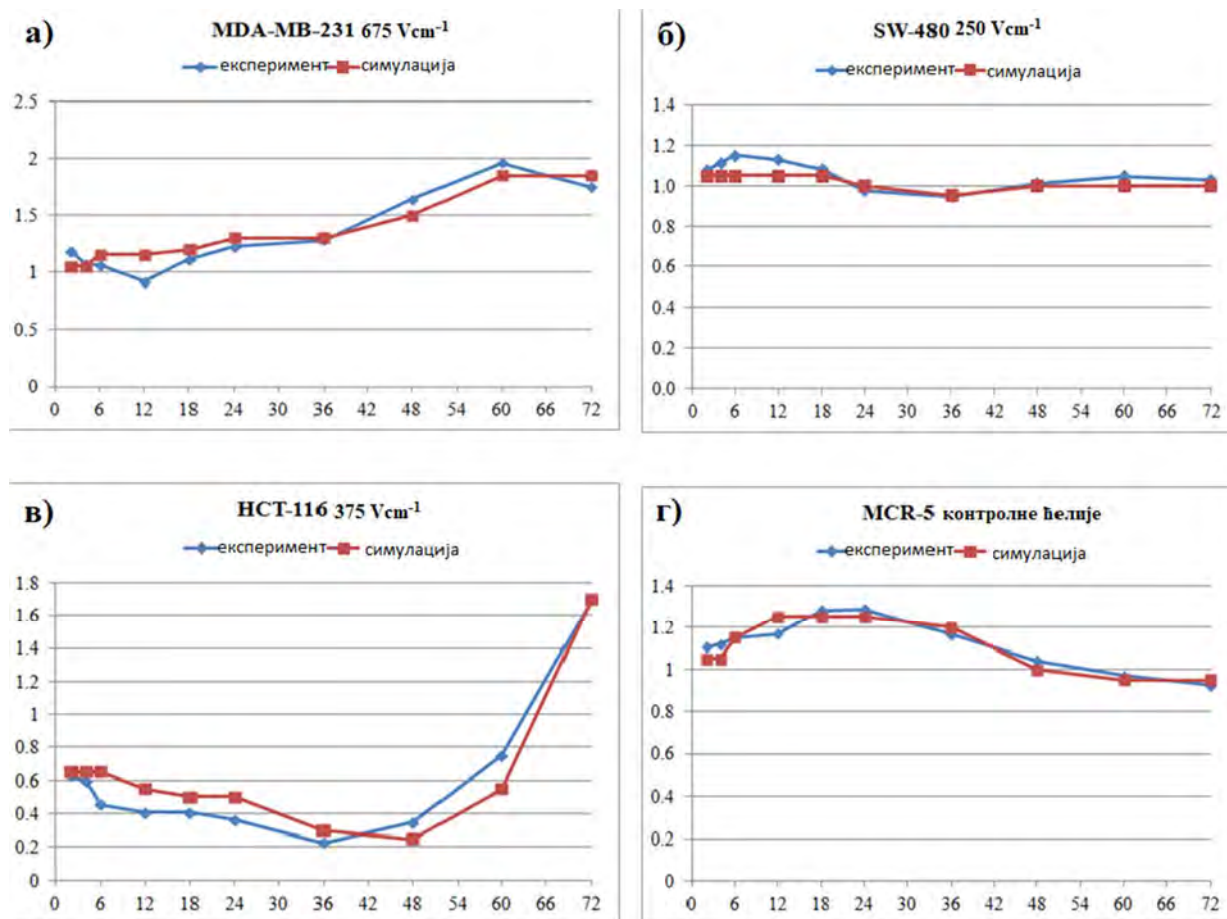


Графикон 38. Нумеричка симулација ефекта електропорације на ћелијској линији карцинома колона SW-480. Анализирање ефеката електропорације ( $500 \text{ Vcm}^{-1}$ ) након 6, 24, 48 и 72 сата.





Графикон 39. Нумеричка симулација ефекта електропорације на ћелијским линијама MDA-MB-231, SW-480, HCT-116 и MCR-5. Анализирање ефеката електропорације у току 72 сата.



## БИОГРАФИЈА

**Данијела М. Цветковић**, истраживач-сарадник у Лабораторији за молекуларну и ћелијску биологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, рођена је 07.03.1982. године у Руми (Република Србија). Основну и средњу Прехрамбену школу са одличним успехом завршила је у Руми. Уписала је студије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, студијска група биологија, школске 2001/02. године. Завршила је студије 2008. године, са просечном оценом 8,14 и одбранила дипломски рад под називом "Реактивне врсте кисеоника и азота у крви пацова третираних цисплатином, селеном и витамином Ц" са оценом 10, чиме је стекла звање дипломирани биолог.

Последиломске - докторске академске студије Биологије уписала је школске 2008/09. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу на смеру Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија.

Од Јануара 2011. године ангажована је на пројектима финансираним од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (2011-2017. године) под називом „Преклиничка испитивања биоактивних супстанци“ (41010) на Институту за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу и „Примена биоинжењеринга у преклиничкој и клиничкој пракси“ (41007), Факултет инжењерских наука, Крагујевац.

У периоду од августа 2012. до септембра 2013. је била на породилском одсуству.

Данијела Цветковић, се успешно бави научно-истраживачким радом у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Института за биологију и екологију ПМФ-а у Крагујевцу. Овладала је савременим техникама и методама које за циљ имају испитивање значаја физиолошких, генетичких, молекуларно-биолошких и туморских маркера у процени ефеката активних супстанци и предвиђању патолошких стања код људи. Способна је да самостално планира и изводи експерименте, обрађује и презентује резултате. Део метода истраживања у оквиру своје дисертације увела је у редовну лабораторијску праксу.

Током протеклих година Данијела Цветковић је била ангажована у извођењу практичног дела наставе на предметима: Основи биотехнологије, Биологија човека и Хематологија на основним академским и мастер студијама. Активно учествује у реализацији бројних Мастер радова са студентима. Од 2011-2014. године ангажована је за потребе акредитације Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију (SRPS ISO/IEC 17025:2006, акредитациони број 01-367) на ПМФ-у у Крагујевцу.

У периоду од 11/04/2011 до 20/04/2011 била је на стручном усавршавању у Институту Curie, у Паризу. Учествовала у реализацији послова при акредитовању Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију (стандард SRPS ISO/IEC 17025:2006).

Учествује у организацији и презентацији матичног факултета на разним фестивалима.



# БИБЛИОГРАФИЈА

## Библиографски подаци кандидата Данијеле М. Цветковић (девојачко Ђуричић)

Кандидат **Данијела М. Цветковић**, истраживач-сарадник и студент докторских академских студија биологије у Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија, тема докторске дисертације је прихваћена од стране надлежних Већа Универзитета, те тиме испуњава све формалне услове да приступи процедури одбране докторске дисертације.

Резултати научно-истраживачког рада кандидата **Данијеле М. Цветковић** објављени су у оквиру **31 библиографске јединице**, од чега **12 радова у међународним научним часописима** (у врхунским М21–3 рада, водећим М22–1 рад, међународним М23–8 радова), 3 рада објављена у научним часописима националног значаја (М52-3 рада), 9 саопштења на међународним научним скуповима (штампана у целини М33–2, и штампана у изводу М34-7), 7 саопштења на националним научним скуповима (М64–7).

### А. Научни радови објављени у научним часописима међународног значаја (SCI, M20):

#### Врхунски међународни часописи - M21 (8 бодова)

1. **Cvetković DM**, Živanović MN, Milutinović MG, Djukić TR, Radović MD, Cvetković AM, Filipović ND, Zdravković ND. Real-time monitoring of cytotoxic effects of electroporation on breast and colon cancer cell lines. *Bioelectrochemistry* 2017; 113: 85-94. ISSN: 1567-5394. IF<sub>2016</sub> 3.346. **M21**
2. Cvetkovic AM, **Cvetkovic DM**, Stojic VV, Zdravkovic ND. Length of hospital stay and bed occupancy rates in former Yugoslav Republics 1989 – 2015. *Frontiers in Pharmacology* 2016; 7: 417. ISSN 1663-9812. IF<sub>2016</sub> 4.400. **M21**
3. Ćurčić MG, Stanković MS, Mrkalić EM, Matović ZD, Banković DD, **Cvetković DM**, Đačić DS, Marković SD. Antiproliferative and proapoptotic activities of methanolic extracts from *Ligustrum vulgare* L. as an individual treatment and in combination with palladium complex. *International Journal of Molecular Sciences* 2012; 13: 2521-2534. ISSN:1661-6596. IF<sub>2011</sub> 2.598, IF<sub>2012</sub> 2.464. **M21**

#### Истакнути међународни часописи - M22 (5 бодова)

4. Filipovic ND, Djukic TR, Radovic MD, **Cvetkovic DM**, Curcic MG, Markovic SD, Peulic AS, Jeremic BM. Electromagnetic field investigation on different cancer cell lines. *Cancer Cell International* 2014; 14: 84. ISSN: 1475-2867. IF<sub>2014</sub> 2.766. **M22**

#### Међународни часописи -M23 (3 бода)

5. Milutinovic MG, Stanković MS, **Cvetković DM**, Maksimović V, Šmit B, Pavlović R, Marković S. The molecular mechanisms of apoptosis induced by *Allium flavum* L. and synergistic effects with new-synthesized Pd(II) complex on colon cancer cells. *Journal of Food Biochemistry* 2015; 39(3): 238-250. ISSN: 0145-8884. IF<sub>2015</sub> 0.832. **M23**

6. Milutinović MG, Stanković MS, **Cvetković DM**, Šeklić DS, Topuzović MD, Mihailović VB, Marković SD. Antioxidant and Anticancer Properties of Leaves and Seed Cones from European Yew (*Taxus baccata* L.) *Archives of Biological Sciences* 2015; 67(2): 525-534. ISSN: 0354-4664. IF<sub>2015</sub> 0.367. **M23**
7. Ćurčić MG, Stanković MS, **Cvetković DM**, Topuzović MD, Marković SD. *Ligustrum vulgare* l.: *in vitro* free radical scavenging activity and prooxidant properties in human colon cancer cell lines. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 2014; 9(4): 1689-1697. ISSN: 1842-3582. IF<sub>2014</sub> 0.945. **M23**
8. Kosaric JV, Zivanovic MN, **Cvetkovic DM**, Curcic MG, Seklic DS, Bugarcic ZM, Marković SD. Antioxidative and antiproliferative evaluation of 2-(phenylselenomethyl) tetrahydrofuran and 2(phenylselenomethyl)tetrahydropyran. *Journal of BUON / Journal of the Balkan Oncology* 2014; 19(1): 283-290. ISSN: 1107-0625. IF<sub>2014</sub> 0.741. **M23**
9. Stolic RS, Mijailovic MZ, Cvetkovic AM, Stanojevic MS, Stolic DZ, **Cvetkovic DM**: Distal ischemia induced by vascular access for hemodialysis - a case report. *Hippokratia* 2012; 16(4): 375-377. ISSN: 1108-4189 IF<sub>2012</sub> 0.589. **M23**
10. Ninkovic SM, Ninkovic VM, Cvetkovic AM, **Cvetkovic DM**, Nedovic JR, Milosevic BZ. Multifocal and multicentric breast cancer: is breast conserving surgery acceptable? *Journal of BUON / Journal of the Balkan Oncology* 2012; 17: 38-45. ISSN: 1107-0625. IF<sub>2012</sub> 0,761. **M23**
11. Marković SD, Žižić JB, Djačić DS, Obradović AD, Ćurčić MG, **Cvetković DM**, Đorđević NZ, Ognjanović BŠ, Štajn ŠA. Alteration of oxidative stress parameters in red blood cells of rats after chronic *in vivo* treatment with cisplatin and selenium. *Archives of Biological Sciences* 2011; 63(4): 991-999. ISSN: 0354-4664. IF<sub>2011</sub> 0.360. **M23**
12. Marković SD, Đačić DS, **Cvetković DM**, Obradović AD, Žižić JB, Ognjanović BI, Štajn AŠ. Effects of acute *in vivo* cisplatin and selenium treatment on hematological and oxidative stress parameters in red blood cells of rats. *Biological Trace Element Research* 2011; 142(3): 660-670. ISSN: 0163-4984. IF<sub>2011</sub> 1.923. **M23**

#### **Радови на рецензији:**

**Cvetkovic DM**, Andjelkovic-Cirkovic BR, Ninkovic SM, Cvetkovic AM, Milosevic BZ, Filipovic ND. Intelligent system for estimation of survival rate, relapse and metastasis - a role in individualization of breast cancer therapy. *BMC Medical Informatics and Decision Making*. (Paper Accepted). ISSN: 1472-6947. IF<sub>2015</sub> 2.042. **M22**

**Cvetković DM**, Milošević BZ, Cvetković AM, Ninković SM, Jovankić JV, Dalibor V Jovanovic DV, Marković SD. The concentration of matrix metalloproteinase 9 in the tumor and peritumoral tissue as prognostic marker in breast cancer patients. *Vojnosanitetski Pregled* ISSN: 0042-8450. IF<sub>2016</sub> 0.367. **M23 (Under Review)**

#### **Б. Научни радови објављени у научним часописима националног значаја (M50):**

13. Nikodijević DD, Milutinović MG, **Cvetković DM**, Stanković MS, Živanović MN, Marković SD. Effects of *Teucrium polium* L. and *Teucrium montanum* L. extracts on mechanisms of apoptosis in breast and colon cancer cells. *Kragujevac Journal of Science* 2016; (38): 147-159. ISSN: 1450-9636. **M52**
14. Marković SD, Djačić DS, **Cvetković DM**, Obradović AD, Žižić JB, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Saičić ZS, Spasić MB. Effects of acute treatment of vitamin C on redox and antioxidative metabolism in plasma and red blood cells of rats. *Kragujevac Journal of Science* 2010; 32: 109-116. ISSN: 1450-9636. **M53**
15. Cvetković AM, Spasić MM, Pavlović MD, **Cvetković D**, Stojanović D, Ninković SM, Jevdjić JD, Čanović DS and Milošević BZ. The use of proton pump inhibitors in intensive care units. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. doi10.1515/sjecr-2017-0011. ISSN: 1820-8665 (*In press*). **M52**

#### **V. Saopšteња na naučnim konferencijama međunarodnog značaja (M30)**

##### **Saopšteња štampana u celini (M33)**

16. Filipović ND, Djukić TR, Radović MD, **Cvetković DM**, Marković SD, Jeremić BM. Experimental and numerical investigation of electromagnetic field at different cancer cell lines. 2013 *IEEE 13TH International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE)*, M.2.2.4: 85-86, 2013. ISBN: 978-1-4799-3162-0. **M33**
17. Đukić TR, **Cvetković DC**, Radović MD, Živanović MN, Filipović ND. Numerical modeling of behavior of cancer cells after electroporation. *IEEE International Conference on Bioinformatics & Bioengineering (BIBE)*. 2015; p.-57, Belgrade, Serbia. ISBN 978-1-4673-7983-0. **M33**

##### **Saopšteња štampana u izvodima (M34)**

18. Jovankić JV, **Cvetković DM**, Milutinović MG, Nikodijević DD, Živanović MN, Grbović FJ, Marković MD. Molecular mechanisms of redox status and antitumor activity of extracts of invasive plant species (*Robinia pseudoacacia* and *Amorpha fruticosa*) in MRC-5 and MDA-MB-231 cell lines. Serbian Biochemical Society Sixth Conference "Biochemistry and Interdisciplinarity: Transcending the Limits of field". November 18, 2016, Belgrade; 123-125. ISBN: 978-86-7220-081-2. **M34**
19. **Cvetković DM**, Živanović MN, Milutinović MG, Đukić T, Radović M, Cvetković A, Gadjanski I, Filipović N, Marković S. Real-time monitoring of cytotoxic effects of electroporation on breast and colon cancer cell lines. Second Congress of the Serbian Association for Cancer Research "Cancer research: perspectives and application", Belgrade, 2015. pp. 24. ISBN:978-86-919183-0-9 (Meeting Abstract). **M34**
20. Živanović MN, **Cvetković DM**, Kosarić JV, Curčić MG, Seklić DS, Bugarcic ZM, Marković SD. Antioxidative effects of novel selenium compounds (Meeting Abstract). *FEBS journal*. 2012; 279: 197-197. ISSN: 1742-464X. **M34**

21. Curcic MG, Stankovic MS, Seklic DS, Zivanovic MN, **Cvetkovic DM**, Markovic SD. Total phenolic content and in vitro antioxidant/prooxidant properties of leaves and fruits from *Ligustrum vulgare* L (Meeting Abstract). FEBS journal. 2012; 279:216-216. ISSN: 1742-464-X. **M34**
22. Đačić DS, **Cvetković DM**, Glođović VV, Radić GP, Trifunović SR, Marković SD. The Antiproliferative effects of cisplatin and butyl and pentyl esters of (S, S)-ethylenediamine-N, N'-di-2-propanoic and corresponding platinum(IV) complexes on human colon cancer cell lines. Scientific Conference with International Participation "Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research", Kragujevac 2011, p12. ISBN 978-86-7760-064-8. **M34**
23. **Đuričić DM**, Đačić DS, Obradović AD, Đorđević NZ, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS, Marković SD. Redox status in plasma and red blood cells of cisplatin, vitamin C and selenium co-treated rats. X Congress of Romanian Society of Physiological Sciences, June, 2008, Cluj-Napoca, Romanian, Oxidative Stress in Medicine 18, PP. **M34**
24. Đačić DD, **Đuričić DM**, Žižić JB, Milošević MM, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić R, Saičić ZS, Marković SD. Effects of cisplatin, vitamin c and selenium co-treatment on hematological parameters in rats. Oxidative Stress in Medicine. X Congress of Romanian Society of Physiological Sciences, Cluj-Napoca, Jun 2008.p. **M34**

#### **Г. Саопштења на научним конференцијама националног значаја (M60)**

25. Ćurčić MG, Stanković MS, Mrkalić EM, Matović ZD, Đačić DD, **Cvetković DM**, Živanović MN, Marković SD. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti metanolnih ekstrakata biljke *Ligustrum vulgare* L. na HCT-116 ćelijskoj liniji u zavisnosti od vremena izlaganja i u tretmanu sa kompleksom paladijuma. Kongres "Mitohondrije i slobodni radikali", Beograd, 2011, knjiga sažetaka. **M64**
26. **Cvetković DM**, Ćurčić MG, Đačić DD, Stanković MS, Marković SD. Ispitivanje antiproliferativnih i antioksidacionih svojstava metanolnih ekstrakata dobijenih iz listova i plodova biljke *Ligustrum vulgare* L. na HCT-116 ćelijskoj liniji. Kongres "Mitohondrije i slobodni radikali", Beograd, 2011, knjiga sažetaka. **M64**
27. Đačić DD, Stanković MS, Glođović VV, Radić GP, Trifunović SR, Ćurčić GM, **Cvetković DM**, Živanović MN, Marković SD. Sinergistička aktivnost gljive *Fellinus luteus* i kompleksa platine (IV) [Pt (dp-(S, S)-eddp)] na ćelijsku liniju humanog kolon kancera (HCT-116). Kongres "Mitohondrije i slobodni radikali", Beograd, 2011, knjiga sažetaka. **M64**
28. Šeklić DD, Mitrović T, Stamenković SM, Cvetković V, Radenković J, Ćurčić MG, Živanović MN, **Cvetković DM**, Marković SD. Citotoksični i prooksidacioni efekti ekstrakata lišajeva (*Pseudevernia furfuracea* i *Platismatia glauca*) na ćelijskim linijama humanog kolon kancera (HCT-116 i SW-480). Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013., knjiga sažetaka, strana 53. **M64**
29. Šeklić DD, Stanković MS, Topuzović DM, Ćurčić MG, Živanović MN, **Cvetković DM**, Marković S. Prooksidativni i antimigratorni efekti ekstrakata medicinski značajnih gljiva u tretmanu ćelijskih linija humanog kolon kancera. Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013., knjiga sažetaka, strana 54. **M64**

30. Ćurčić MG, Stanković MS, **Cvetković DM**, Živanović MN, Marković SD. Prooksidacioni efekat i citotoksičnost ekstrakata biljke *Ligustrum vulgare* L. na ćelije karcinoma kolona. Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013., knjiga sažetaka, strana 71. **M64**
31. Ćurčić MG, Stanković MS, **Cvetković DM**, Šeklić DD i Marković SD. Efekti ekstrakata biljke *Teucrium chamaedrys* L. na apoptotski signalni put i redoks status ćelija karcinoma kolona. Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013., knjiga sažetaka, strana 64. **M64**

---

## БИБЛИОТЕЧКА ДОКУМЕНТАЦИЈА



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ПРИРОДНО-  
МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ ИНСТИТУТ ЗА  
БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ

Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија



## КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈА

---

Редни број	
Тип записа	Текстуални штампани материјал
Врста рада	Докторска дисертација
Аутор	Данијела М Цветковић
Ментор	Др Снежана Марковић, доцент Природно-математички факултет у Крагујевцу
Наслов рада	Улога молекуларних механизма неоангиогенезе као тумор маркера у индивидуализацији терапије пацијената са карциномом дојке
Језик публикација	Српски (ћирилица)
Језик извода	Српски
Земља публикавања	Србија
Година публикације	2017.
Издавач	Ауторски репринт
Место и адреса	34 000 Крагујевац, Радоја Домановића 12
Научна област	Биологија
Научна дисциплина	Физиологија животиња и молекуларна биологија
Предметна одредница/кључне речи	Биологија, Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија, Карцином дојке, Србија

Чува се	У библиотеци Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Р. Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија
---------	---

***Улога молекуларних механизма неоангиогенезе као тумор маркера у индивидуализацији терапије пацијената са карциномом дојке***

**РЕЗИМЕ**

Карцином дојке је водећи узрок смртности жена широм света када су у питању малигне болести. Светска здравствена организација је проценила да ће у овом веку свака 8. жена на планети оболети од ове болести. Упркос оствареном напретку у дијагностици и лечењу, очигледан је висок морбидитет и морталитет од карцинома дојке, тако да су неопходни нови приступи у лечењу ове болести. Чињеница је да су данашњи онколошки протоколи превише крути и апроксимативни и донекле занемарују особености пацијента и биологију тумора сваког пацијента. Стога се тежи индивидуализацији/персонализацији терапије, која ће одговарати биолошком профилу сваког пацијента понаособ, што би водило увођењу нових и побољшању постојећих онколошких протокола лечења. За то је неопходан мултидисциплинарни приступ, у коме ће сарађивати експерти из различитих области, а који укључује *data mining* системе за обраду података и обећавајуће, али недовољно истражене модалитете лечења, као што су електропорација, електрохемиотерапија и фитотерапија.

Први део истраживања представља проспективну студију која укључује пацијенте са дијагнозом карцинома дојке КЦ Крагујевац у петогодишњем периоду праћења. Током операције која се рутински изводи на Клиници за општу и грудну хирургију у КЦ Крагујевац узимани су узорци карцинома дојке и перитуморског ткива, а потом су поред стандардних патохистолошких прегледа спроведене и додатне анализе: одређивање концентрације металопротеиназе 9 (MMP-9); испитивање генске експресије параметара неоангиогенезе *VEGF-A*, *HIF-1*, *CXCL-12* и *iNOS* (*Quantitative/Real Time PCR*) и протеинске експресије имунофлуоресцентном методом (*VEGF<sub>165b</sub>* и *CXCR-4*). Други део истраживања, представља *in vitro* испитивање нових видова терапије-електропорације и електрохемиотерапије на карциномским (MDA-MB-231, MCF-7, SW-480, HCT-116) и здравим (MRC-5, HUVEC и hAoSm) имортализованим ћелијским линијама. Цитотоксични ефекти електропорације и електрохемиотерапије на испитиваним ћелијским линијама, праћени су у реалном времену, применом *xCELLigence* система (*Real Time Cell Analysis-RTCA*), као и на основу анализирања типа ћелијске смрти акридин оранж/етидијум бромид микроскопском методом. У циљу проналажења нових антинеопластичних третмана карцинома дојке, испитивано је антиинвазивно дејство екстраката листова инвазивних биљака *Robinia pseudoacacia* (L) и *Amorpha fruticosa* (L) на MRC-5 и MDA-MB-231 ћелијама, праћењем релативне експресије *MMP-9*, *VEGF-A*, *HIF-1 $\alpha$* , *CXCL-12* и *iNOS* гена (*Quantitative/Real Time PCR* методом). За *data mining* обраду података су коришћени софтвери (*Machine Learning Techniques*) који су тренирани за конкретан проблем предикције рецидива и метастаза, као најзначајније прогностичке параметре исхода болести.

Наша студија јасно указује да карцином изазива промене у туморском и перитуморском ткиву детектабилне на молекуларном, али не и на патохистолошком нивоу. Није довољна само детаљна анализа туморског, већ обавезно и перитуморског ткива, јер се често значајније промене на молекуларном нивоу дешавају у микроокружењу карцинома. Перитуморско ткиво није само пасиван чинилац, већ активно учествује у процесу раста и развоја тумора, као и у процесима рецидивирања и појаве метастаза. Маркери неоангиогенезе у туморском и перитуморском ткиву као што су концентрација MMP-9, експресија *VEGF-A*, *CXCL-12*, *HIF-1* и *iNOS* гена као и протеинска експресија VEGF и CXCR-4 рецептора, могу послужити као поуздани предиктори исхода болести код пацијената са карциномом дојке, што може дати корисне сугестије у избору третмана. Електропорација и електрохемиотерапија су на изучаваним ћелијским линијама дале

обећавајуће резултате, нарочито у компарацији ефеката између карциномских и здравих ћелија, што као резултат ове дисертације доприноси увођењу ових метода у клиничку праксу. Третман екстрактима инвазивних врста биљака *Robinia pseudoacacia* и *Amorpha fruticosa* су показале антиинвазивно дејство на карциномске ћелијске линије. *Data-mining* техника обраде података заснована на компјутерским експертским системима вештачке интелигенције може обрадити претходно наведене изучаване параметре, тако да кориснички оријентисан софтвер изврши веома тачну предикцију исхода болести у смислу појаве рецидива тумора и метастаза, што је веома корисно за лекаре при доношењу одлуке о даљим модалитетима лечења. На овај начин, комбинацијом клиничких, патохистолошких и молекуларних параметара туморског и перитуморског ткива као *input* параметара за *data mining* софтвер можемо са великом вероватноћом (око 90%) предвидети да ли ће код сваког појединачног пацијента доћи до појаве метастаза или рецидива болести, са свим импликацијама на избор оптималног онколошког третмана.

Коришћењем описане методологије креира се биолошки и молекуларни профил тумора за сваког појединачног пацијента, што води индивидуализацији онколошке терапије, која неће одговарати само ригидним протоколима, већ биолошким карактеристикама тумора. Додатни видови лечења као што су електропорација, електрохемиотерапија и фитотерапија могу значајно повећати квалитет онколошког третмана. *Data mining* методологија је веома корисна, јер аутоматизовано, али свакако уз надзор искусног клиничара може извршити селекцију најзначајнијих параметара, који имају утицаја у процесу туморогенезе и метастазирања.

Датум прихватања теме од стране ННВ факултета	09.09. 2015.
Датум одбране	
Чланови комисије	<p><b>Др Оливера Милошевић-Ђорђевић, редовни професор</b>, председник Комисије Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу ужа област: Генетика и еволуција;</p> <p><b>Др Милена Милутиновић, научни сарадник</b> Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу научна област: Биологија;</p> <p><b>Др Ненад Филиповић, редовни професор</b> Факултет инжењерских наука, Универзитет у Крагујевцу ужа научна област: Примењена механика и примењена информатика и рачунарско инжењерство;</p> <p><b>Др Срђан Нинковић, доцент</b> Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу ужа научна област: Хирургија;</p> <p><b>Др Ивана Гађански, доцент</b> BioSense Институт, Универзитет у Новом Саду, Метрополитан универзитет, Београд, ужа научна област: Ткивно инжењерство;</p>





UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY SCIENCE  
INSTITUTE OF BIOLOGY AND ECOLOGY  
Radoja Domanovica 12, 34000 Kragujevac,  
Serbia



## KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number	
Type of record	Textual material, printed
Contents code	PhD thesis
Author	Danijela M Cvetković
Mentor	Dr Snežana Marković, assistant professor
Title	The role of molecular mechanisms of neoangiogenesis as tumor markers in the treatment individualization of breast cancer patients
Language of text	Serbian (Roman)
Language of abstract	Serbian (Roman) / English
Country of publication	Serbia
Publication year	2017.
Publisher	Copyright reprint
Publisher place	Radoja Domanovica 12 34000 Kragujevac, Serbia
Scientific field	Biology
Scientific discipline	Animal Physiology and Molecular Biology
Key words	Biology, Animal physiology and Molecular Biology Breast Cancer, Serbia
Holding data	In library of Faculty of Science, 34 000 Kragujevac, Serbia, R. Domanovica 12

## **The role of molecular mechanisms of neoangiogenesis as tumor markers in the treatment individualization of breast cancer patients**

### **SUMMARY**

Breast cancer is the leading cause of mortality related to cancer among women around the world. The World Health Organization estimated that in this century, every eighth woman on the planet will be affected by this disease. Despite the progress made in diagnosis and treatment, high morbidity and mortality from breast cancer is evident, so new approaches are needed in the treatment of this disease. The fact is that today's oncology protocols are too rigid and approximate and somewhat neglect the patient's specificity and biology of the tumor of each patient. It therefore seeks individualization / personalization of therapy, corresponding to the biological profile of each patient individually, which would lead to the introduction of the new and improvement of the existing oncological protocols. This requires a multidisciplinary approach, with collaboration of experts from different fields, which will include *data mining* systems for data processing as well as promising, but so far insufficiently investigated treatment modalities, such as electroporation, electrochemotherapy and phytotherapy.

The first part of the study is a prospective study involving patients with breast cancer diagnosis at CC Kragujevac in a five-year follow-up period. During the surgery performed routinely at the Clinic for General and Chest Surgery in CC Kragujevac, samples of breast and peritumor tissue were taken, followed by the analyzes in addition to standard pathohistological examinations: determining the concentration of metalloproteinase 9 (MMP-9); gene expression of neoangiogenesis parameters of *VEGF-A*, *HIF-1*, *CXCL-12* and *iNOS* (Quantitative / Real Time PCR) and protein expression using the immunofluorescence method (VEGF165b and CXCR-4). The second part of the study is an in vitro examination of new forms of therapy-electroporation and electrochemotherapy in cancer (MDA-MB-231, MCF-7, SW-480, HCT-116) and healthy (MRC-5, HUVEC and hAoSm) immortalized cell lines. The cytotoxic effects of electroporation and electrochemotherapy on the examined cell lines were monitored in real time by using the xCELLigence system (*Real Time Cell Analysis-RTCA*) as well as by analyzing the cell-death by acridine orange/ethidium bromide microscopic method. In order to find new antineoplastic breast cancer treatments, the anti-invasive effects of leaf extracts of *Robinia pseudoacacia* (L) and *Amorpha fruticosa* (L) invading plants on MRC-5 and MDA-MB-231 cells were studied, followed by gene expression of *MMP-9*, *VEGF-A*, *HIF-1 $\alpha$* , *CXCL-12*, and *iNOS* (Quantitative / Real Time PCR method). For *data mining*, data processing was used (Machine Learning Techniques) trained for the specific problem of recurrence and metastasis prediction as the most important prognostic parameters of the disease outcome.

Our study clearly indicates that cancer causes changes in the tumor and peritumor tissue detectable on the molecular but not at the pathohistological level. Therefore, detailed analysis not only of tumor but also of the peritumor tissue should be obligatory because often significant changes at the molecular level occur in the microenvironment of the carcinoma. Peritumor tissue is not only a passive factor, but actively participates in the process of tumor growth and development, as well as in relapse and metastasis processes. Markers of neoangiogenesis in tumor and peritumor tissue such as MMP-9 concentration, expression of *VEGF-A*, *CXCL-12*, *HIF-1* and *iNOS* gene as well as protein expression of VEGF and CXCR-4 receptors can serve as reliable predictors of disease outcome in patients with breast cancer, which can give useful suggestions in the choice of treatment. Electroporation and electrochemotherapy have yielded promising results on the studied cell lines, especially comparing the effects between cancer and healthy cells,

contributing this way to the introduction of these methods into clinical practice. Treatments with extracts of invasive plant species *Robinia pseudoacacia* and *Amorpha fruticosa* have shown anti-invasive effects on cancer cell lines. *The data mining* processing technique based on computer artificial intelligence systems can process the previously mentioned parameters so that user-oriented software performs a very accurate prediction of the disease outcome in terms of tumor recurrence and metastases, which is very useful for doctors when deciding on further treatment modalities. In this way, by combining the clinical, pathohistological and molecular parameters of tumor and peritumor tissue as input parameters for *data mining* software, we can predict with high probability (about 90%) whether there will be a metastasis or recurrence of the disease in each individual patient with all implications on the choice of optimal oncological treatment.

Using the described methodology, the biological and molecular profile of the tumor is created for each individual patient, leading to individualization of oncology therapy, which will not only correspond to rigid protocols but biological characteristics of the tumor as well. Additional treatments such as electroporation, electrochemotherapy and phytotherapy can significantly increase the quality of oncological treatment. *Data mining* methodology is very useful because in an automated fashion, but certainly with the supervision of an experienced clinician, it can perform the selection of the most important parameters, which have an influence on the tumor growth and metastasis process.

Accepted by scientific board on	09.09. 2015.
Defended on	
Commission	Dr Olivera Milošević-Đorđević, full professor Dr Milena Milutinović, Research associate Dr Nenad Filipović, full professor Dr Srđan Ninković, assistant professor Dr Ivana Gađanski, assistant professor

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Данијела М Цветковић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Улога молекуларних механизма неоангиогенезе као тумор маркера у индивидуализацији терапије пацијената са карциномом дојке

која је одбрањена на \_\_\_\_\_  
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 2017. године,

Данијела Цветковић  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Данијела М Цветковић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Улога молекуларних механизма неоангиогенезе као тумор маркера у индивидуализацији терапије пацијената са карциномом дојке

која је одбрањена на \_\_\_\_\_

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ 2012 \_\_\_\_\_ године,

  
попис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org/rs/>





## Real-time monitoring of cytotoxic effects of electroporation on breast and colon cancer cell lines<sup>☆</sup>



Danijela M Cvetković<sup>a,\*</sup>, Marko N Živanović<sup>a</sup>, Milena G Milutinović<sup>a</sup>, Tijana R Djukić<sup>b,d</sup>, Miloš D Radović<sup>b,d</sup>, Aleksandar M Cvetković<sup>e</sup>, Nenad D Filipović<sup>b,c,d</sup>, Nebojša D Zdravković<sup>e</sup>

<sup>a</sup> University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute of Biology and Ecology, Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup> University of Kragujevac, Faculty of Engineering, Kragujevac, Serbia

<sup>c</sup> University of Harvard, Boston, USA

<sup>d</sup> BioIRC Bioengineering R&D Center, Kragujevac, Serbia

<sup>e</sup> University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Kragujevac, Serbia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 May 2016

Received in revised form 11 October 2016

Accepted 19 October 2016

Available online 22 October 2016

#### Keywords:

Apoptosis  
Breast cancer  
Colon cancer  
Cytotoxicity  
Electroporation  
Numerical model

### ABSTRACT

**Purpose:** To study the effects of electroporation on different cell lines.

**Material:** The effects of electroporation on human breast cancer (MDA-MB-231), human colon cancer (SW-480 and HCT-116), human fibroblast cell line (MRC-5), primary human aortic smooth muscle cells (hAoSMC) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were studied. Real-time technology was used for cell viability monitoring. Acridine orange/ethidium bromide assay was applied for cell death type determination. A numerical model of electroporation has been proposed.

**Results:** Electroporation induced inhibition of cell viability on dose (voltage) dependent way. The electroporation treatment 375–437.5 V cm<sup>-1</sup> caused irreversible electroporation of cancer cells and reversible electroporation of healthy cells. The application of lower voltage rating (250 V cm<sup>-1</sup>) led to apoptosis as the predominant type of cell death, whereas the use of higher voltage (500 V cm<sup>-1</sup>) mainly caused necrosis.

**Conclusion:** Electroporation represents a promising method in cancer treatment. Different cancer cell lines had different response to the identical electroporation treatment. Electroporation 375–437.5 V cm<sup>-1</sup> selectively caused permanent damage of cancer cells (SW-480), while healthy cells (MRC-5, hAoSM and HUVEC) recovered after 72 h. The type of cell death is dependent of electroporation conditions. The proposed numerical model is useful for the analysis of phenomena related to electroporation treatment.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Breast and colon cancers are the most frequent causes of cancer morbidity and mortality worldwide [1]. Death rates from breast and colon cancers have been steadily decreasing due to a combination of early detection and improved treatment which have led to improvement in relapse-free and overall survival [2]. Despite the progress in treatment, cancer is still one of the leading causes of death and it is obvious that new approaches are needed. Exposing a biological cell to a sufficiently high electric field results in an increase of permeability of the cell membrane. This increase in permeability allows transfer of molecules which

normally lack membrane transport mechanism into the cell. The described effect of the electric field on the cell is called *electroporation (EP)* [3]. Electroporation can be reversible or irreversible depending on the cell possibility to recover membrane integrity and function. Combination of reversible electroporation with chemotherapy has evolved into a new method for solid tumor treatment named electrochemotherapy [4]. Electrochemotherapy uses electroporation to allow increased uptake of chemotherapeutic drugs into tumor cells. This is a local treatment of solid cancer which involves short high-intensity pulsed electric fields to cells, in response to which, plasma membrane's permeability transiently increases. In this way, cellular uptake of antineoplastic agents can be facilitated, thus increasing their cytotoxicity. Consequently, the total dose of antineoplastic agents can be significantly decreased and numerous side effects that are inevitably linked to antineoplastic therapy could be avoided [5].

Using real-time technology, better insight into the continuous changes in cell viability can be achieved. These sophisticated changes cannot be observed using standard techniques for cell viability monitoring. With real-time technology, the accurate moment when the

<sup>☆</sup> Electroporation effects on cancer cells.

\* Corresponding author at: Laboratory for Cell and Molecular Biology, Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovica 12, 34000 Kragujevac, Serbia.

E-mail addresses: [c\\_danijela@yahoo.com](mailto:c_danijela@yahoo.com) (D.M. Cvetković), [zivanovicmkg@gmail.com](mailto:zivanovicmkg@gmail.com) (M.N. Živanović), [milenagen@gmail.com](mailto:milenagen@gmail.com) (M.G. Milutinović), [tijana@kg.ac.rs](mailto:tijana@kg.ac.rs) (T.R. Djukić), [mradovic@kg.ac.rs](mailto:mradovic@kg.ac.rs) (M.D. Radović), [dr AleksandarCvetkovic@gmail.com](mailto:dr AleksandarCvetkovic@gmail.com) (A.M. Cvetković), [fica@kg.ac.rs](mailto:fica@kg.ac.rs) (N.D. Filipović), [nzdravkovic@medf.kg.ac.rs](mailto:nzdravkovic@medf.kg.ac.rs) (N.D. Zdravković).