



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Јована В. Јованкић

**Аберантни метаболизам масних киселина
као важан прогностички маркер код
карцинома дојке**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2024



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Jovana V. Jovankić

Aberrant fatty acid metabolism as an important prognostic marker in breast cancer

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2024

Аутор
Име и презиме: Јована В. Јованкић
Датум и место рођења: 09.02.1992. године у Аранђеловцу
Садашње запослење: истраживач-сарадник на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Аберантни метаболизам масних киселина као важан прогностички маркер код карцинома дојке
Број страница: 204
Број слика: 50; Графикона: 49; Табела 25.
Број библиографских података: 394
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија (577.2:591.1(043.3) ; 616.348-006.6-073(043.3)).
Ментор: др Данијела Цветковић, доцент, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Хумана генетика
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 10.02.2021. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-01-94/11; 10.02.2021.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. Др Милош Матић, доцент, Природно-математички факултет Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија; 2. Др Александра Николић, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, научна област: Молекуларна биологија; 3. Др Данијела Цветковић, научни сарадник, Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу, научна област: Биологија; 4. Др Ненад Филиповић, редовни професор, Факултет инжењерских наука, Универзитет у Крагујевцу; ужа научна област Примењена механика и примењена информатика и рачунарско инжењерство; 5. Др Александар Караниколић, ванредни професор, Факултет медицинских наука, Универзитет у Нишу; ужа научна област Хирургија.
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: 1. Др Милена Милутиновић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија; 2. Др Милош Матић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија; 3. Др Јелена Кошарић, научни сарадник, Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу, научна област: Биологија; 4. Др Весна Којић, виши научни сарадник, Институт за онкологију Војводине, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, научна област: Медицинске науке – хемија; 5. Др Ненад Филиповић, редовни професор, Факултет инжењерских наука, Универзитет у Крагујевцу; ужа научна област Примењена механика и примењена информатика и рачунарско инжењерство.
Датум одбране докторске дисертације:

*Свако биће расте према
ономе ко га воли. Цвет
према сунцу, дете према
родитељу.*

Тати...

Захвалница

Највећу захвалност дугујем доц. др Данијели Цветковић, ментору, на стручној и пријатељској помоћи, поверењу, несебичном дељењу знања и искуства као и пруженој шанси да се бавим научно-истраживачким радом на најлепши могући начин. Хвала на свакој прихваћеној идеји која је унапређена до савршенства. Хвала за искрену љубав и хвала што ме сваким даном изнова и изнова учиш шта је храброст и доброта.

Захваљујем се члановима Комисије, доц. др Милени Милутиновић, проф. др Милошу Матићу, проф. др Ненаду Филиповићу, др Јелени Кошарић, др Весни Којић на корисним саветима, сугестијама и стручној помоћи током израде ове докторске дисертације.

Посебно, захвалила бих се доц. др Милени Милутиновић без чије љубави, подршке, разумевања, несебичне стручне помоћи и свакодневног дељења знања и искуства ова докторска дисертација не би добила овакав крајњи облик. Хвала за пренету љубав према молекуларној биологији и истраживачком раду.

Министарству науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије се захваљујем на стипендирању током прве две године докторских академских студија и финансирању пројекта „Преклиничка испитивања биоактивних супстанци – ПИБАС” ИИИИ 41010 у оквиру кога је урађена ова докторска дисертација.

Захвалност дугујем драгим колегама из Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију, Александри, Маји, Невени, Сари и Николи на подршци, помоћи и стручним саветима током израде ове докторске дисертације. Посебно хвала Данијели Никодијевић и Стефану Благојевић на стручној и несебичној помоћи, подршци, најискренијем пријатељству и разумевању. На сарадњи и помоћи хвала колеги Марку Николићу, без кога ова докторска дисертација не би могла да буде реализована.

Највећу захвалност дугујем мојој породици тати, мами, баки и деки, за бесконачну љубав, пожртвовање, веру, разумевање и подршку. Хвала Вам што заједно са мном сањате велике снове.

Мојој Нени и Ани, душама моје душе, јер имати сестре највеће је богатство на свету. Софији, Лазару, Луки и Чупки јер су ме научили шта је безусловна и најчистија љубав. Хвала Вам што нам свакодневно доносите радост и мир.

Ђорђу и Илији на разумевању и подршци.

Данијели, Милени и Данијели јер су моје три доказ да породицу стичеш кроз најискренију љубав и пријатељство. Хвала Вам за све што се речима не да исказати.

Тијани за љубав, разумевање, најискренију подршку и пружену руку пријатељста у најтежим животним тренуцима.

Срђану, Наталији и Сузани на бескрајној љубави, разумевању и подршци.

Велико хвала Михаилу, за све што је било и за све што долази.

Јакову, јер је мој смисао живота.

Јована В. Јованкић

Садржај

I УВОД.....	1
1. Ембрионални развој и анатомија дојке	1
1.1. Анатомија дојке.....	1
1.2. Ембрионални развој млечне жлезде и дојке.....	2
2. Епидемиологија и фактори ризика за настанак карцинома дојке.....	5
2.1. Генетичка основа за настанак карцинома дојке.....	5
2.2. Бихејвиорални фактори ризика за настанак карцинома дојке.....	6
3. Класификација карцинома дојке.....	9
3.1. Хисто-патолошка класификација	9
3.2. Молекуларна класификација.....	10
4. Улога рецептора за хормоне и факторе раста у настанку карцинома дојке.....	13
5. Улога реактивних врста кисеоника у настанку, прогресији и терапији карцинома дојке.....	16
5.1. Улога ROS-а у настанку карцинома	18
5.2. Улога ROS-а у прогресији карцинома	19
5.3. Улога ROS-а у терапији карцинома.....	21
6. Ангиогенеза	22
6.1. Регулаторни фактори ангиогенезе.....	25
6.1.1. Васкуларни ендотелни фактор раста	25
6.1.2. Фактор индукован хипоксијом	26
6.1.3. Матрикс металопротеиназа 9	28
6.1.4. Хемокини CXCL-12/CXCR-4	29
7. Биосинтеза масних киселина.....	31
7.1. Процес биосинтезе масних киселина	32
7.2. Регулаторни фактори процеса биосинтезе масних киселина	34
7.2.1. АТФ-цитрат лиаза.....	34
7.2.2. Ацетил-коензим А карбоксилаза	36
7.2.3. Синтетаза масних киселина	37
8. Пренамена лекова за антитуморску терапију	40
8.1. Нестандардни медикаменти као потенцијални антитуморски агенси.....	41
8.1.1. Орлистат	42
8.1.2. Симвастатин.....	45
9. Медицинске биљке у антитуморској терапији	47
9.1. <i>Ocimum minimum</i> L.	48
10. Машинско учење у биомедицинским наукама: иновативни приступи и перспективе	50
II ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	53
III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	55
1. Узорковање, идентификација и припрема биљног материјала	56
1.1. Одређивање концентрације фенола, флавоноида и танина	56
1.2. HPLC анализа биљног материјала	56
2. Припрема третмана	57
3. Ћелијско-молекуларне анализе.....	58
3.1. Имортализоване ћелијске културе у <i>in vitro</i> истраживањима.....	58
3.2. Манипулација ћелијским културама.....	60
3.3. Култивација ћелија и припрема за третман	61
4. Испитивање биолошких ефекта третмана.....	63
4.1. Испитивање цитотоксичности	63

4.2.	Одређивање типа ћелијске смрти.....	63
4.3.	Одређивање параметара редокс статуса	64
4.3.1.	Одређивање концентрације супероксид анјон радикала	64
4.3.2.	Одређивање концентрације водоник пероксида.....	64
4.3.3.	Одређивање концентрације малонилдиалдехида	65
4.3.4.	Одређивање концентрације глутатиона.....	65
5.	Изолација укупних липида	67
5.1.	Одређивање концентрације укупних липида	67
6.	Одређивање протеинске експресије у ћелијама	68
7.	Критеријуми за укључивање пацијената у истраживање	69
7.1.	Припрема узорка ткива	69
7.2.	Одређивање релативне генске експресије	69
7.2.1.	Изолација РНК из ћелијских линија и ткива	69
7.2.2.	Реверзна транскрипција	70
7.2.3.	Ланчана реакција полимеразе у реалном времену	70
7.3.	Депарафинизација ткивних узорака и имунохистохемија	71
8.	Статистичка обрада података	72
9.	Машинско учење.....	73
IV	РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА	76
1.	Концентрација фенола и флавоноида у екстракту биљке <i>O. minimum</i>	76
1.1.	Течна хроматографија високих перформанси.....	77
2.	Цитотоксичност испитиваних супстанци	79
2.1.	Цитотоксичност Орлистата.....	79
2.2.	Цитотоксичност Симвастатина	81
2.3.	Цитотоксичност <i>Ocimum minimum</i>	83
3.	Одређивање типа ћелијске смрти.....	85
4.	Испитивање параметра редокс статуса након примене третмана	88
4.1.	Концентрација супероксид анјон радикала.....	88
4.2.	Одређивање концентрације водоник пероксида	90
4.3.	Одређивање концентрације малондиалдехида	92
4.4.	Одређивање концентрације укупног глутатиона	94
5.	Концентрација укупних липида.....	96
6.	Релативна експресија информационе РНК.....	98
6.1.	Релативна експресија информационе РНК за гене процеса биосинтезе масних киселина.....	98
6.2.	Релативна експресија информационе РНК за гене процеса ангиогенезе.....	100
7.	Експресија протеина	102
7.1.	Експресија протеина укључених у биосинтезу масних киселина	102
7.2.	Експресија протеина укључених у процес ангиогенезе.....	114
8.	Молекуларни параметри биосинтезе масних киселина код пацијената са карциномом дојке.....	126
8.1.	Релативна експресија иРНК <i>ACLY</i> гена	127
8.2.	Релативна експресија иРНК <i>FASN</i> гена.....	130
8.3.	Протеинска експресија <i>FASN</i> -а.....	133
9.	Машинско учење: побољшање TNM класификационог модела карцинома дојке.....	138
9.1.	Повезаност молекуларних маркера у карциномском ткиву и микроокружењу карцинома са величином тумора	138
9.2.	Повезаност молекуларних маркера у карциномском ткиву и микроокружењу карцинома са регионалном лимфонодалном инвазијом	139

9.3. Повезаност молекуларних маркера у карциномском ткиву и микроокружењу карцинома са појавом удаљених метастаза	141
V ДИСКУСИЈА.....	143
VI ЗАКЉУЧАК.....	162
VII ЛИТЕРАТУРА.....	165

АПСТРАКТ

Пренамена лекова је процес испитивања и развоја већ одобрених лекова зарад идентификације нових терапијских индикација. Овај процес последњих година има значајно место у развоју нових антитуморских агенаса у борби против карцинома дојке. У оквиру ове докторске дисертације испитиван је антитуморски ефекат Орлистата и Симвастатина, лекова који се користе за лечење хиперхолестеролемије и гојазности као и биљке *Ocimum minimum* L. која се у народној медицини користи за лечење истих стања. Тестирани третмани значајно смањују вијабилност и индукују проапоптопски ефекат код MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке, док у здравим MRC-5 показују знатно слабији ефекат. Тестирани третмани су нарушили редокс хомеостазу карциномских ћелија што је довело до модулације експресије гена и протеина који су укључени у процес биосинтезе масних киселина и ангиогенезе. На основу резултата може се закључити да ови третмани имају значајан потенцијал као антитуморски агенси. Друга фаза истраживања заснива се на праћењу генске и протеинске експресије кључних параметра биосинтезе масних киселина (ACLY, FASN) на узорцима ткива пацијената са карциномом дојке. Експресија ACLY и FASN на транскрипционом односно протеинском нивоу је повишена у узорцима карцинома и микроокружења у зависности од клиничко-патолошке класификације што указује на агресиван фенотип карцинома дојке. Испитивани параметри се могу користити као потенцијални тумор маркери и захтевају додатна испитивања. Применом различитих алгоритама машинског учења, у трећој фази истраживања, показано је да FASN значајно доприноси побољшању TNM класификационог модела карцинома дојке. Овај резултат је од посебног значаја за прецизније постављање дијагнозе и одређивање терапијског протокола.

Кључне речи: ангиогенеза, биосинтеза масних киселина, карцином дојке, машинско учење, Орлистат, *Ocimum minimum*, пренамена лекова, Симвастатин.

ABSTRACT

Drug repurposing is process of testing and developing already approved drugs to identify new therapeutic indications. In recent years, this process has played a significant role in the development of new antitumor agents for breast cancer therapy. In this doctoral dissertation, the antitumor effect of Orlistat and Simvastatin, drugs used to treat hypercholesteremia and obesity was investigated, as well as herb *Ocimum minimum* L., which is used in tradicional medicine for same conditions. These treatments significantly reduce the viability and induce proapoptotic effect in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 breast cancer cells, while in normal MRC-5 show non-significant effect. These treatments disrupted redox homeostasis of cancer cells, which led modulation in expression of genes and proteins involved in fatty acid biosynthesis and angiogenesis. It can be concluded that these treatments have significant potential as antitumor agents and deserve further investigation. The second part of research is based on monitoring of gene and protein expression of key parameters of fatty acid biosynthesis on tissue samples from patients with breast cancer. The expression of ACLY and FASN at transcriptional and protein levels is elevated in cancer and/or microenvironment samples, depending on clinical-pathological classification, which indicates an aggressive phenotype of this cancer. The investigated parameters can be used as potential tumor markers and require further *in vitro* and *in vivo* testing. By applying different machine learning algorithms, it was shown that FASN significantly contributes to improvement TNM clasification model of breast cancer. This result is of particular importance for making a more precise diagnosis at these patients.

Key words: angiogenesis, fatty acid biosynthesis, breast cancer, machine learning, Orlistat, *Ocimum minimum*, drug repurposing, Simvastatin.

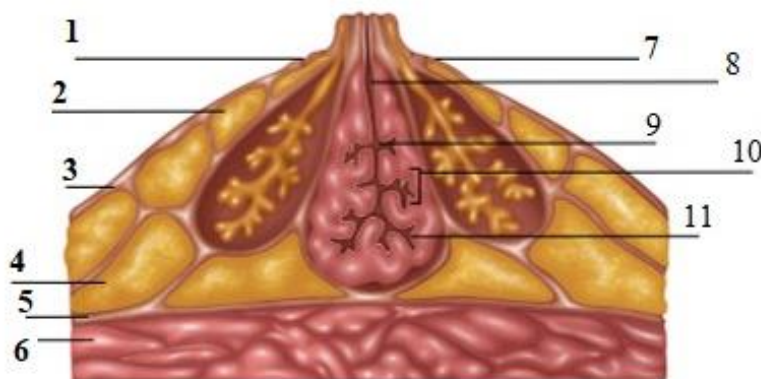
I УВОД

1. Ембрионални развој и анатомија дојке

1.1. Анатомија дојке

Дојка представља модификовану знојну жлезду и налази се на предњој страни торакалног зида у региону од другог до шестог ребра медијално од грудне кости и латерално од средње пазушне линије. Део дојке који захвата пазушну јаму назива се Спенсеров режањ (Geddes, 2007). Око две трећине дојке је прекривено пекторалним мишићем. Анатомски дојку чине тело, брадавица и колут дојке. Тело дојке чине млечна жлезда, млечни канал, везивно и масно ткиво. Брадавицу чини стратификован епител, знојне и лојне жлезде и нерви, а простире се преко четвртог међуребарног простора и окружена је пигментисаном ареолом. На периферној регији ареоле се налазе Морганијеви туберкули који луче супстанцу сличну млеку па се сматрају помоћним млечним жлездама (Слика 1). Пигментација ареоле потиче од меланина, а током трудноће и пубертета пигмент постаје тамнији, и брадавица се подиже изнад површине (Pandya и Moore, 2011).

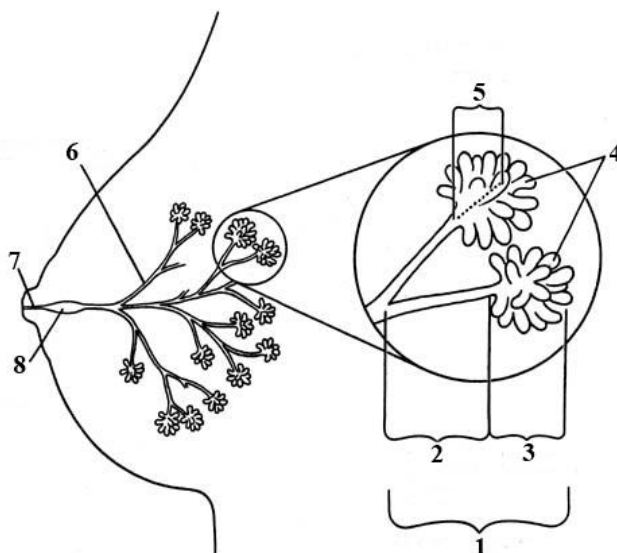
Према хистолошкој класификацији епител дојке је ектодермалног порекла а састоји се од спољашњег епителног и унутрашњег миоепителног слоја ћелија који раздваја епителне ћелије од базалне мембране. С обзиром на ектодермално порекло дојке може се разликовати површинска и дубока фасција. Површинска фасција се налази испод коже и причвршћена је за њу Куперовим лигаментима. Дубока фасција прекрива горњу површину великог грудног мишића, а испод њега се налази ретромамарни простор који омогућава померање дојки ка предњем зиду грудног коша (Слика 1) (Ellis и Mahadevan, 2013).



Слика 1. Анатомија дојке (1 – Монтгомеријева жлезда; 2 – Поткожно масни ткиво; 3 – Куперови лигаменти; 4 – Масно ткиво дојке; 5 – Површинска фасција; 6 – Pectoralis major; 7 – Суперфицијална фасција; 8 – Ампула; 9 – Млечни канал; 10 – Ацинус; 11 – Интралобуларно везивно ткиво) (Слика је преузета и модификована из: <https://www.sciencephoto.com/media/1137051/view/breast-anatomy-illustration>).

Са првим менструалним циклусом развија се дуктални систем и формира се терминално дуктално – лобуларна јединица (енгл. *Terminal Ductal Lobular Units - TDLU*)

(Слика 2). Овај процес се наставља током трудноће када долази до повећања броја дуктуса, да би се у касној трудноћи дуктуси диференцирали и отпочели секрецију млека. Овај процес стимулишу стероидни хормони – естроген и прогестерон. Дуктални систем млечних жлезда је обложен луминалним епителијалним ћелијама који је окружен слојем миоепителијалних ћелија. Дуктално – лобуларна јединица је ограничена специјалном интралобуларном стромом и фибробластима (Geddes, 2007).

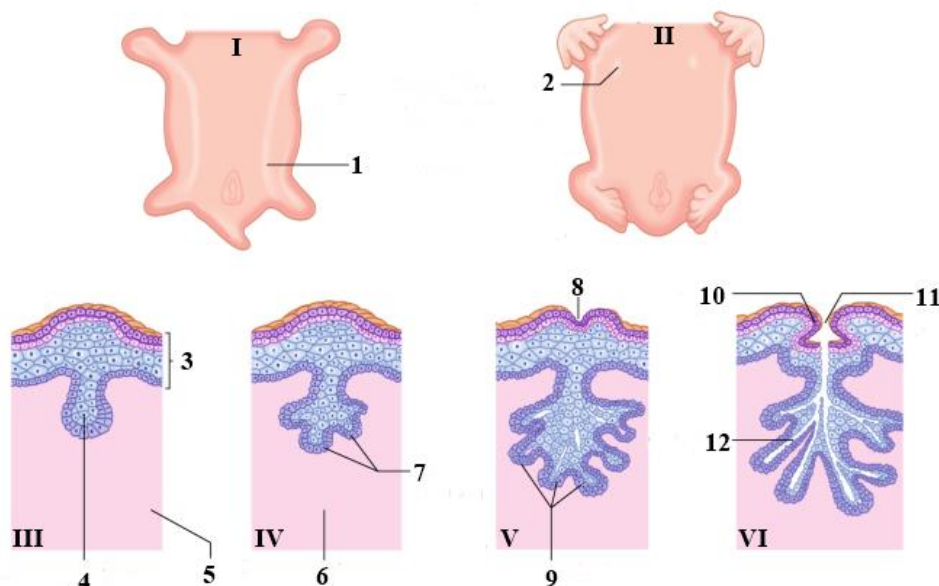


Слика 2. Структура TDLU јединице (1 – Терминално дуктално – лобуларна јединица; 2 – Екстралобуларни терминални канал; 3 – лобул; 4 – дуктуси; 5 – интралобуларни терминални канал; 6 – сегментни канал; 7 – сабирни канал; 8 – млечни канал) (Слика преузета и модификована из: DOI: 10.3843/GLOWM.10017).

Дојка је састављена од 15 – 20 режњева (лобуса) који су радијално постављени и пружају се до брадавице. Сваки режањ се састоји од 20 – 40 режњића (лобулуса), а они се даље гранају на 10 – 100 алвеола које престављају секреторне јединице дојке. Сваки режањ се улива у главни млечни канал који се простире ка млечном синусу испод алвеола а затим се отвара кроз сужени простор на брадавици. Простор између режњева је испуњен масним ткивом. Сваки лобус се састоји од једног терминалног екстериорног дуктуса просечне величине до 2 mm (Love и Barsky, 2004).

1.2. Ембрионални развој млечне жлезде и дојке

Млечне жлезде се сматрају модификованим апокриним жлездама. Морфогенеза млечне жлезде може се поделити на различите развојне фазе (Слика 3). Први догађај је формирање билатералне млечне линије, након чега следи инвагинација примарног млечног пупољка из ектодерма у околни мезодерм, што доводи до пролиферације и гранања пупољака и формирања дукталног стабла. Између пете и шесте недеље гестацијског развоја, два бочна задебљана гребена ектодерма настају дуж вентралног зида (Russo и сар., 1994). Ово билатерално задебљање је познато као гребен млечне жлезде или „млечна линија“, која се током развоја локализује само на грудни кош где се и анатомски налазе млечне жлезде (Слика 3-I). У овом региону током 12 недеље гестације, пролиферација ћелија млечног гребена ектодерма је интензивна у циљу формирања примарног млечног пупољка.



Слика 3. Фазе ембрионалног развоја млечне жлезде. **(I)** Пренатални развој дојке (4 – 6 недеља гестације); 1 – гребен дојке који приказује ћелије прогенитора дојке ектодермалног порекла. **(II)** 2 – Атрофија грба дојке од које настају примарни млечни пупољци. **(III)** Хистолошки попречни пресек примарног млечног пупољка (крај првог триместра); 3 – епидермис; 4 – примарни млечни пупољак; 5 – мезенхим. **(IV)** Секундарни обрасци гранања који формирају секундарне млечне пупољке (други триместар трудноће); 6 – дермис; 7 – секундарни млечни пупољци. **(V)** Развој млечне јаме (трећи триместар трудноће); 8 – млечна јама; 9 – млечна жлезда. **(VI)** Развој млечних канала, ареоле и структура брадавице (формирање по рођењу); 10 – ћелије ареоле брадавице; 11 – место формирања брадавице; 12 – млечни канали. (Слика презуета и модификована из: https://doi.org/10.1007/978-3-030-57121-4_1).

У овој фази се могу уочити суптилне разлике између полова, женска дојка је јајоликог облика и знатно мање површине у односу на мушку чији је пупољак сферичног облика (Слика 3-II). Примарни млечни пупољак инвагинира у мезодерм од кога настају око 20 секундарних пупољака. Овај процес формирања пупољака праћен је кондензацијом и диференцијацијом околног мезодерма у густ мезенхим дојке распоређен радијално око епитела пупољака (Hens и Wysolmerski, 2005). Секундарни пупољци се тада издужују и гранају до осмог месеца гестације формирајући млечне канале, који су смештени у млечне јаме обложене епидермисом у 32 недељи гестације (Слика 3-IV). При рођењу долази до пролиферације основних мезенхимских елемената и формирања брадавице. Формирање васкуларног система дојке почиње када се мезенхимске ћелије диференцирају у 7. недељи у еритробласте и примитивне крвне судове. Прво настају мали капилари између 9. и 10. недеље, а затим се формира концентрична васкуларна мрежа у 12. и 13. недељи гестације (Hovey и сар., 2002).

Развој васкуларног система се завршава до 16 недеље када крв почиње да циркулише кроз секреторно, масно и везивно ткиво млечне жлезде. Даљи раст и развој дојке директно зависи од хормонске регулације. Масно ткиво млечне жлезде, сматра се кључним за посредовање даљег раста паренхима дојке и настаје од специјализованог везивног ткива из дубљег поткожног мезенхима који је изгубио способност формирања влакана (Hovey и сар., 2002).

У пубертету је повећање величине груди проузроковано таложењем масног ткива унутар млечних жлезда као и успостављањем редовног менструалног циклуса. Ове промене су праћене прогресивним издуживањем и гранањем примарних канала у секундарне на чијим крајевима се налази двослојни епител, па се образују пупољци који формирају гроздове зване лобули (Sternlicht и сар., 2006). Промене у сазревању млечне жлезде су повезане са повећањем концентрације естрогена, пролактина, лутеинизирајућег, фоликулостимулирајућег и хормона раста (Ankarberg-Lindgren и сар., 2001). Сложени епителни развој млечне жлезде као и лобула се наставља постепено током адолесценције до отприлике 35. године. Након потпуног сазревања млечне жлезде уочене су три врсте лобула и класификовани су према степену развијености (Слика 3-VI). Лобул I се састоји од приближно 11 дуктуса, Лобул II од око 47 дуктуса, а Лобул III од приближно 80 дуктуса, док се Лобул IV уочава код жена само током трудноће (Russo и Russo, 2004).

2. Епидемиологија и фактори ризика за настанак карцинома дојке

Карцином дојке је тренутно један од најчешћих карцинома код жена и пети узрок смртности са процењеним бројем од 2.3 милиона нових случајева широм света према подацима Globocan-а из 2020 (Sung и сар., 2021). Процењује се да ће до 2030. године број новооткривених случајева у свету достићи 2.7 милиона годишње, док ће број умрлих бити 0.87 милиона. У Европи је током 2020. године регистровано око пола милиона оболелих и 142.000 преминулих од карцинома дојке (Ferlay и сар., 2020). У Републици Србији карцином дојке је водећи узрочник смртности после цереброваскуларних болести и исхемијске болести срца. Према статистичким подацима из 2020. године које је објавио Институт за јавно здравље Републике Србије „Др Милан Јовановић Батут”, регистровано је 4561 новооболелих, док је 1691 пацијент преминуо од карцинома дојке.

2.1. Генетичка основа за настанак карцинома дојке

Карцином дојке је сложена хетерогена болест у којој долази до поремећаја у генима који регулишу раст, диференцијацију и ћелијску смрт (Sledge и Miller 2003). Спорадични карциноми дојке углавном представљају ненаследне облике ове болести, где новонастале мутације у кључним генима изазивају неконтролисану пролиферацију ћелија (Kenemans и сар., 2004). Наследни или породични карцином дојке који чини само 5 до 10% дијагностикованих случајева, се карактерише присуством наследних мутација (Walsh и King, 2007). Најпознатије наследне мутације су унутар BRCA1 и 2 гена (енгл. *Breast cancer type 1 susceptibility protein 1 and 2*) и наслеђују аутозомно - доминантно (Shiovitz и Korde, 2015).

Мутације, било да су наслеђене или новонастале, јављају у на кључним генима одговорним за процес канцерогенезе: онкогенима, тумор супресор генима, генима који контролу апоптозу и репарацију ДНК у ћелији. Протоонкогени регулишу раст, пролиферацију, диференцијацију и ћелијску смрт. Деловањем различитих фактора ови гени могу да претрпе извесне мутације и/или промене у експресији при чему постају онкогени, односно гени који су способни да иницирају малигну трансформацију ћелије (Lee и Muller, 2010). Онкогени су први откривени гени који учествују у настанку карцинома. Прекомерна амплификација ових гена је карактеристична код спорадичних облика карцинома дојке који чини већину дијагностикованих промена на дојкама (Osborne и сар., 2004). Постоји велики број онкогена који су одговорни за настанак карцинома дојке при чему су HER2 (енгл. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), cMYC (енгл. *Myelocytomatosis*) и RAS (енгл. *Rat sarcoma virus*) највише проучавани. Поред ових онкогена гени за естрогенске рецепторе, циклидин D1 и E, као и циклин зависне киназе 2 и 4/6 су такође значајно измењени и учествују у настанку карцинома дојке (Harris, 2005).

Док промене у онкогенима подразумевају њихову измењену структуру, функцију или прекомерну експресију онкопротеина, код тумор супресор гена долази до изостанка њихове функције услед настале мутације. Они такође имају кључну улогу у контроли ћелијског циклуса, пролиферацији, апоптози и репарацији и изостанак њихове функције може довести до малигне трансформације ћелије (Motoyama и Naka 2004). Показано је да је већи број тумор супресор гена укључено у развој карцинома дојке, а најпознатији су TP53 (енгл. *Tumor protein – P53*), CDH1 (енгл. *E – Cadherin – 1*), PTEN (енгл. *Phosphatase And Tensin Homolog*), и STK11 (енгл. *Serine/Threonine Kinase – 11*) (Macdonald и Dick, 2012).

2.2. Бихејвиорални фактори ризика за настанак карцинома дојке

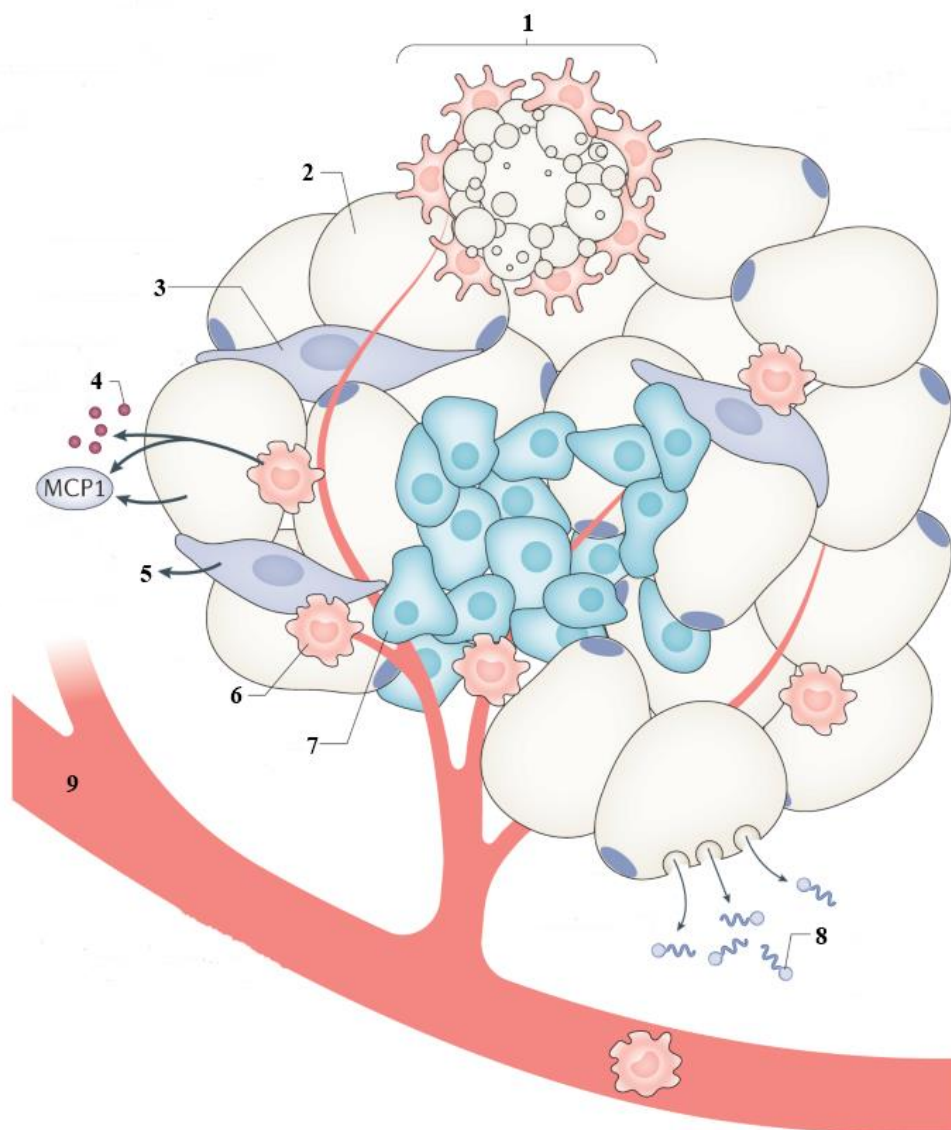
Поред генетичке основе за настанак карцинома дојке, веома важну улогу имају и фактори животне средине као и начин живота савременог човека. Нередовна физичка активност и небалансирана исхрана су једни од главних бихејвиоралних фактора ризика за настанак карцинома дојке. Као последица ових животних навика настаје гојазност која се описује и као мултифакторијална болест савременог друштва (Kolb и Zhang, 2020).

Гојазност је хронична болест која се испољава прекомерним накупљањем масти у организму што последично изазива повећање телесне масе. Свако повећање телесне масе изнад 10% се дефинише као гојазност. Епидемија гојазности је у порасту, па се гојазност сврстава у болест савремене цивилизације. Ова болест доводи до тешких и бројних компликација на многим органима и представља главни фактор ризика за настанак кардиоваскуларних болести, хиперхолестеролемије, дијабетеса типа II, опструктивне апнеје као и различитих врста карцинома (Ligibel и сар., 2014). Утицај гојазности на настанак дијабетеса и кардиоваскуларних болести је јасан, међутим разумевање настанка карцинома који је инициран гојазношћу и хиперхолестеролемијом је од великог значаја за клиничку праксу. Већ неколико деценија је познато да гојазност повећава проценат морталитета код пацијената који су оболели од карцинома и све је више клиничких студија које утврђују везу између ова два обољења. Недавне студије су показале да су прекомерна телесна маса и гојазност повезани са већим ризиком од настанка аденокарцинома једњака, карцинома желуца, штитасте жлезде, панкреаса, дебелог црева, ректума, ендометријума, простате, жучне кесе, јајника, дојке, и мултиплог мијелома. Пошто је карцином дојке најчешћи тип карцинома и други узрочник смртности код жена разумевање како гојазност утиче на развијање ове болести је од великог научног и клиничког значаја (Picon-Ruiz и сар., 2017).

Значајан проценат карцинома би се могао спречити кроз саму превенцију контролисањем фактора ризика. Нездрав начин живота, хормонски дисбаланс, гојазност и хиперхолестеролемија представљају значајне факторе ризика за настанак карцинома дојке. Повезаност између ових фактора и настанка болести може бити у корелацији са концентрацијом липида у циркулацији и активирањем аберантног метаболизмом липида у масном ткиву (Yung и Ligibel, 2016). Ћелије карцинома показују специфичне промене у различитим аспектима метаболизма липида, које могу утицати на доступност структурних липида за синтезу мембрана, одржавање енергетске хомеостазе посредством липида, активацију липидних сигналних молекула, укључујући активацију сигналних путева повезаних са инфламацијом. Све ове промене су повезане са важним ћелијским процесима, укључујући раст, пролиферацију, диференцијацију и покретљивост ћелија. Интеракција између холестерола, липопротеина, проинфламаторних сигналних путева и развоја тумора углавном је проучавана у ћелијама карцинома дојке и експерименталним моделима *in vivo*. Штавише, бенигна и малигна пролиферација ткива дојке је повезана са променама у концентрацији липида и липопротеина у плазми, што је показано у студији Cedó и сар., 2019.

Сигнални молекули и метаболити које лучи масно ткиво и адипоцити, посебно у гојазности, сада су препознати као важни фактори за настанак и прогресију карцинома, јер директно или индиректно стимулишу анти-апоптоличке факторе, раст ћелија, ангиогенезу и миграцију (Park и сар., 2014). Масно ткиво је ендокрини орган који ослобађа биоактивне масне киселине, адипокине, цитокине, хемокине и факторе сличне хормонима. У здравом масном ткиву зрели адипоцити луче углавном антимитогени хормон адипонектин, док је секреција лептина који представља проангиогени и промитогени хормон на ниском нивоу. Код гојазности сазревање зрелих адипоцита је

редуковано, и долази до повећавања броја преадипоцита који луче високе концентрације лептина (Слика 4) (Blücher и Stadler, 2017).



Слика 4. Микроокружење дојке и фактори који иницирају карцином код гојазних и пацијената са хиперхолестеролемијом. 1 – крунасте структуре које формирају макрофаги и адипоцити; 2 – адипоцити; 3 – стромалне масне ћелије дојке; 4 – проинфламаторни цитокини; 5 – ароматазе, оестероген; 6 – макрофаг; 7 – ћелија карцинома дојке; 8 – масне киселине; 9 – крвни суд (Слика преузета и модификована из: <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00487-0>).

Масно ткиво се разликује од осталих ткива јер се може проширити приликом претераног уноса нутријената код гојазних особа. Како се масно ткиво шири, потражња за хранљивим материјама и кисеоником се повећава, што доводи до локалне хипоксије око новоформираног масног ткива (Kothari и сар., 2020). Недовољан проток крви у растуће масно ткиво може довести до стварања метаболички нездравог ткива. Ангиогенеза се мора правилно активирати у новом ткиву да би се задовољиле енергетске потребе проширеног масног ткива. Главни механизам ангиогенезе је посредован регулацијом преко фактора индукованог хипоксијом (енгл. *Hypoxia-inducible factor* - HIF-1 α) и васкуларним ендотелијалним фактором раста (енгл. *Vascular Endothelial Growth*

Factor - VEGF) (Hosogai, 2007). У нормоксичним условима, HIF-1 α је хидроксилован доменима пролил хидроксилазе и у потпуности неактиван. Насупрот томе, хипоксични услови инхибирају активност пролил хидроксилазе, активирају HIF-1 α и омогућавају његово везивање за VEGF да би се створили нови крвни судови који расту према хипоксичним деловима масног ткива. Хипоксични одговор може послужити као регулатор ангиогенезе како би се осигурало да крвни судови расту истом брзином као и ткива која перфузирају, јер се крвни судови шире према хипоксичним подручјима која немају адекватно снабдевање кисеоником и крви (Kothari и сар., 2020). Раст масног ткива и метаболички процеси унутар њега су строго регулисани али дисфункција ових путева може довести до развоја различитих метаболичких болести укључујући и карцином дојке. Гојазност иницира хроничну инфламацију, посебно у белом масном ткиву, што покреће имунолошку реакцију повећаном синтезом проинфламаторних цитокина, активацијом макрофага и смањеном функцијом Т ћелија. Ткиво дојке је састављено од белог масног ткива па није ни чудно што се карцином дојке развија у овако метаболички активном ткиву (Apostolopoulos и сар., 2016). Након менопаузе код жена масно ткиво дојки представља место синтезе естрогена. Жене са прекомерном телесном тежином имају повишене нивое естрогена и последично већу вероватноћу за настанак естроген зависних карцинома дојке. Гојазност најчешће иницира настанак естроген зависних и троструко-негативних карцинома дојке који представљају најагресивније подтипове карцинома (Lohmann и сар., 2021).

3. Класификација карцинома дојке

3.1. Хисто-патолошка класификација

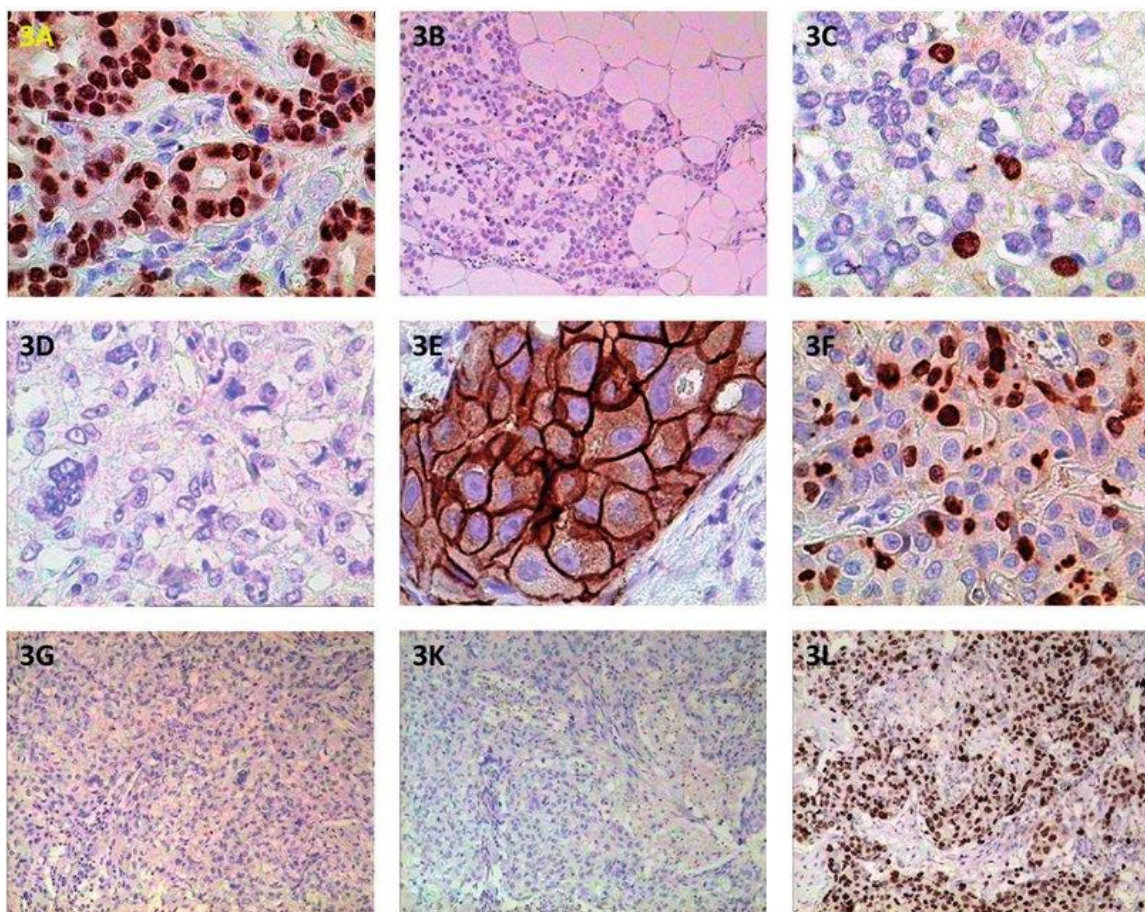
Карцином дојке представља биолошки и фенотипски хетерогену болест са различитим хисто-патолошким карактеристикама. Услед различитих карактеристика карцинома и постојања генетских, епигенетских и промена на нивоу транскриптома, све ове разлике утичу на постављање дијагнозе и персонализовано лечење пацијената (Ortanta-Borunda и сар., 2022). Да би се правилно поставила дијагноза и да би се адекватно спровело лечење неопходно је да сваки тип карцинома буде прецизно класификован (Fragomen и сар., 2018).

Карцином дојке може бити дуктални *in situ* (неинвазивни) код кога се малигне ћелије налазе на нивоу дуктуса тј. не пробијају базалну мембрану. Други тип карцинома је инвазивни или инфилтративни карцином, узрокован абнормалном пролиферацијом неопластичних ћелија у ткиву дојке, што доводи до продирања карциномских ћелија из зида канала у строму. Инвазивни и *in situ* карциноми се могу класификовати као дуктални или лобуларни, на основу места порекла. Код дукталног карцинома *in situ* (енгл. *Ductal carcinoma in situ* – DCIS), епителне ћелије које облажу млечне канале се не шире у околно ткиво дојке. С друге стране, када се ћелије дукталног карцинома *in situ* шире кроз зид канала у оближње ткиво дојке, настаје инвазивни дуктални карцином (енгл. *Invasive Ductal Carcinoma* – IDC), који је најчешћи облик инвазивног карцинома дојке (Barroso-Sousa и Metzger-Filho, 2016).

Лобуларни карцином *in situ* (енгл. *Lobular carcinoma in situ* – LCIS) је ретка врста карцинома дојке у којој се ћелије карцинома формирају у жлездама које производе млеко, ограничене су унутар лобула дојке и не пробијају базалну мембрану. Међутим, када се ове ћелије шире кроз лимфне чворове и друге делове тела, настаје инвазивни или инфилтрирајући лобуларни карцином (енгл. *Invasive Lobular Carcinoma* – ILC) (Wilson и сар., 2021). Поред наведених подтипова карцинома дојке, постоје још два: инфламаторни (енгл. *Inflammatory Breast Cancer* – IBC) и метастатски карцином дојке (енгл. *Metastatic Breast Cancer* – MBC). Инфламаторни карцином дојке је агресиван и брзо растући подтип у коме се ћелије карцинома инфилтрирају у кожу и лимфне судове дојке. Разликује се примарни и секундарни инфламаторни карцином дојке. Примарни настаје у претходно здравим дојкама, док је секундарни последица инфламације коже дојки која је настала услед развоја инвазивног карцинома (Chirpa и Barazi, 2022). Код метастатског карцинома, ћелије се шире у остале делове тела као што су лимфни чворови, јетра, плућа, кости и мозак. Након уклањања примарног тумора, карциномске ћелије или микро-метастазе могу остати у телу, што омогућава карциному да се поново прошири. Клинички, пацијентима се у почетку може дијагностиковати метастатски карцином, али се и метастатске промене могу развити месецима или годинама након лечења. Ризик од рецидива карцинома дојке и метастазирања у великој мери зависи од биологије сваког карцинома као и стадијума болести у време постављања дијагнозе (Allison, 2012).

3.2. Молекуларна класификација

Молекуларна класификација карцинома дојке се карактерише различитим профилом генске и протеинске експресије специфичних маркера који су карактеристични за сваки подтип карцинома (Слика 5). Доказано је да постоје извесне промене на нивоу експресије гена и да се управо те разлике одражавају на фенотип, прогностички значај, постављање дијагнозе и планирање терапије код пацијената (Tsang и Tse, 2020). На основу тих разлика описано је укупно четири подтипа карцинома дојке: луминални А, луминални Б, HER2⁺ и троструко-негативни карциноми дојке (енгл. *Triple – negative breast cancers* – TNBC) (Harbeck и сар., 2019). Битни дијагностички и прогностички фактори код карцинома дојке су естрогенски (енгл. *Estrogen receptor* – ER), прогестеронски (енгл. *Progesterone receptor* – PR) и HER2 рецептори као и Ki-67 маркер митотичког индекса (енгл. *Marker Of Proliferation Kiel* – 67). Имунохистохемијски панел са ова четири биомаркера (ER/PR/HER2/Ki-67) се сматра ефикасним и значајним у одређивању подтипова карцинома дојке (Tsang и Tse, 2020).



Слика 5. Молекуларни под типови карцинома дојке. Луминални карцином дојке 3А – 3С; Експресија естрогенског рецептора – 3А; Недостатак HER2 протеина – 3В; Ниска стопа пролиферације у фракцији – 3С; Прекомерна експресија HER2 – 3Д–3Ф; Недостатак естрогенског рецептора – 3Д, Прекомерна експресија HER2 протеина – 3В; умерена пролиферативна фракција – 3С. 3Г–Л, троструко негативни карциноми дојке: 3Г – недостатак хормонског рецептора; 3К – недостатак HER2 протеина; 3Л – висока пролиферативна фракција (Слика преузета и модификована из: <https://doi.org/10.2478/v10163-012-0012-x>).

Луминални А подтип – Овај молекуларни подтип је најчешћи и обухвата половину дијагностикованих карцинома дојке (Слика 3; А – С). Имунохистохемијски профил овог подтипа је дефинисан као: ER⁺ ($\geq 1\%$), PR⁺ ($\geq 20\%$), HER2⁻ ($\leq 10\%$) и низак ниво Ki-67 ($< 14\%$), као и повишена експресија цитокератина 7, 8, 18 и 19 (Gao и Swain, 2018). Ови карциноми имају низак градус, споро расту, ретко захватају лимфне нодусе, и имају мању стопу рецидива. Због позитивног статуса хормонских рецептора ови пацијенти добро одговарају на ендокрину терапију. Најчешће се у терапији користе тамоксифен или инхибитори ароматазе (Слика 5_{3А-3С}) (Росса и сар., 2015).

Луминални Б подтип – Обухвата око 20 – 30% инвазивних карцинома дојке и умереног је хистолошког градуса. Овај подтип карактерише ER⁺ ($\geq 1\%$), PR⁻ ($< 20\%$), HER2⁻ ($\leq 10\%$), Ki-67 ($\geq 20\%$); или (HER2⁺): ER⁺ ($\geq 1\%$), HER2⁺ ($> 10\%$) и било који ниво експресије PR и Ki-67 (Feng и сар., 2018). Луминални Б подтип представља најагресивнији облик ER⁺ карцинома дојке и није кандидат за класичну хормонску терапију (Fragomeni и сар., 2018). Ови карциноми су углавном средњег или високог хистолошког градуса. Повишена експресија маркера пролиферације Ki-67 потврђује чињеницу да ови карциноми брже расту од Луминалног подтипа А (Harbeck и сар., 2019).

HER2⁺ подтип – Представља 15 – 20% свих карцинома дојке. Овај подтип карактерише висока експресија HER2⁺ ($> 10\%$), ER ($< 1\%$), PR ($< 20\%$) и Ki-67 ($> 20\%$) (Goldhirsch и сар., 2013). Прекомерна експресија HER2⁺ је карактеристична за инвазивни лобуларни карцинома (Fragomeni и сар., 2018). Амплификација гена и повећана експресија HER2 протеина је повезана са туморима већег хистолошког градуса, високог пролиферативног индекса који су склони метастазирању. Овај тип карцинома добро реагује на медикаментозну терапију коју чине блокатори HER2⁺ рецептора (Слика 5_{3D-3F}) (Llombart-Cussac и сар., 2017).

Троструко-негативни карциноми дојке – Ова класа тумора чини од 10 – 20% свих карцинома дојке. Овај подтип карактерише недостатак експресије хормонских рецептора ER ($< 1\%$), PR ($< 20\%$) и HER2 ($\leq 10\%$); штавише, они су високо пролиферативни тумори, према Ki – 67 индексу ($> 30\%$) (Goldhirsch и сар., 2013). Већина троструко – негативних карцинома дојке се описује као инвазивни дуктални неспецифични хистолошки тип карцинома дојке (Слика 5_{3G-3L}). Међутим, и они укључују варијанте медуларних, метапластичних и апокриних карцинома (Feng и сар., 2018). Ови карциноми су генерално чешћи код пацијената са *BRCA1* мутацијама. Многе студије одређивања профила генске односно протеинске експресије су спроведене да би се боље разумела хетерогеност овог агресивног облика карцинома дојке (Kumar и Aggarwal, 2016). Троструко-негативни карциноми дојке се на основу тога могу поделити на седам подтипова (Lehmann и сар., 2016):

- два базална типа троструко-негативног карцинома дојке са разликама у имуном одговору на терапију;
- један тип луминалног андрогеног рецептора који представља диференцијалну експресију гена укључених у андрогени метаболизам;
- један тип имуномодулаторног карцинома са променама у експресији гена укључених у имунолошке сигналне путеве;
- један клаудин-низак тип карцинома дојке који карактерише снижена експресија клаудина 3, 4, 7 и Е-кадхерина;
- два типа мезенхимског троструко-негативног типа карцинома дојке и то оба са позитивном регулацијом сигналних путева укључених у епително-мезенхимску транзицију, али се разликују у сигнализацији повезаних гена на матичне ћелије и ангиогене факторе.

Троструко-негативни карциноми дојке представљају највећи изазов за одређивање адекватног терапијског протокола као и циљане терапије због хетерогености која се огледа у морфолошким, молекуларним и патохистолошким карактеристикама. Овај подтип се лечи хемотерапијом са платином и њеним комплексима као и употребом PARP (енгл. *Poly ADP-ribose polymerase*) инхибитора код пацијената који имају мутацију на *BRCA1* и 2 генима (Yam и сар., 2017).

4. Улога рецептора за хормоне и факторе раста у настанку карцинома дојке

Стероидни хормони су посебна група сигналних молекула, који се синтетишу из деривата холестерола у митохондријама. Постоје две класе стероидних хормона: кортикостероиди и полни стероиди. **Кортикостероиди** настају у кори надбубрежне жлезде и регулишу широк спектар физиолошких процеса, укључујући имунолошке и инфламаторне реакције. Значајни кортикостероиди укључују хормоне глукокортикоида, хидрокортизона, минералокортикоида и алдостерона. Произведени у гонадама, хормони из класе полних стероида (естроген, прогестерон и андроген) су витални за развој и одржавање полних карактеристика, као и за општу репродуктивну регулацију. Упркос њиховој улози у нормалном репродуктивном развоју, полни стероиди такође учествују у развоју и прогресији неколико типова карцинома (Cook-Botelho и сар., 2017).

Полни стероидни хормони остварују физиолошку улогу везивањем за естрогенске, андрогене и рецепторе за прогестерон. Сви ови рецептори припадају суперфамилији нуклеарних рецептора (Saha и сар., 2021). Активност стероидних хормона и њихових рецептора је битна за бројне физиолошке процесе током ембриогенезе али и у одраслом животном добу. Након обављања основних регулаторних функција рецептори за стероидне хормоне постају неактивни, а ћелије се даље деле и диференцирају. За разлику од здравих ћелија, ћелије карцинома дојке имају експримиране рецепторе за естроген и прогестерон. Карциноми који имају експримиране рецепторе за естроген и прогестерон чине укупно 70% свих карцинома. Ћелије карцинома дојке са експримираним рецепторима спорије расту у односу на ћелије карцинома које их немају, док се преласком на паракрину/аутокрину регулацију интензивира њихова пролиферација (Cook-Botelho и сар., 2017).

Естроген је стероидни хормон који регулише бројне физиолошке процесе у организму укључујући раст и диференцијацију ћелија, енергетски метаболизам, одговор на стрес и равнотежу есенцијалних минералних материја. Синтеза естрогена се одвија претежно у јајницима код жена у пременопаузи и у мањој мери у екстрагонадалним ткивима, укључујући и ткиво дојке које је главни извор естрогена код жена у постменопаузи (Jordan и Brodie 2007). Епител ткива дојке састоји се од луминалних и базалних ћелија. Управо се у луминалним ћелијама експримирају рецептори за естроген док су базалне ћелије задужене за експресију гена који регулишу механичку покретљивост млечних канала. Постоје три главне класе естрогена: естрадиол (17 β – естрадиол), естрон и естриол. Најзаступљенији естроген је естрадиол док су естрон и естриол присутни у нижој концентрацији. Естроген испољава биолошке ефекте тек након везивања за своје рецепторе у једру. Разликују се два облика естрогенских рецептора (ER α и ER β) кодирани са два различита гена, *ESR1* (енгл. *Estrogen Receptor 1*) и *ESR2* (енгл. *Estrogen Receptor 2*). Рецептор ER- α има клинички значај, док ER β још увек није довољно истражен. Ген за ER α се налази на хромозому 6q25.1, док се ген за ER β налази на хромозому 14q22–24 (Yip и Rhodes, 2014). Иако, постоје два различита ER гена, њихови продукти имају исту структурну и функционалну хомологију. Рецептори естрогена врше различите физиолошке и патофизиолошке функције. Доминантни рецептор у материци, дојкама и јајницима је ER α , док ER β има значајну улогу у костима, бубрезима и кардиоваскуларном систему (Herynk и Fuqua 2004). Естроген има веома важну улогу у физиолошком развоју епитела дојке јер стимулише пролиферацију ћелија и дукталну морфогенезу. Када су ћелије изложене високој концентрацији естрогена, интензиван пролиферативни ефекат овог стероидног хормона може да доведе до накупљања грешака приликом репликације, услед којих настају мутације и развој карцинома дојке (Clusan и сар., 2023). Последично, двоструки прекиди у молекулу ДНК доводе до промене у нивоу експресије гена који регулишу раст, диференцијацију,

апоптозу и ангиогенезу. Пролиферишуће ћелије захтевају велику количину енергије што стимулише активност митохондрија и повећање реактивних врста кисеоника које настају као производ ћелијског дисања. Када се поремети равнотежа између реактивних врста кисеоника и антиоксидативне заштите долази до нагомилавања оксидативног стреса у ћелијама и настанка карцинома (Garcia-Martinez и сар., 2021).

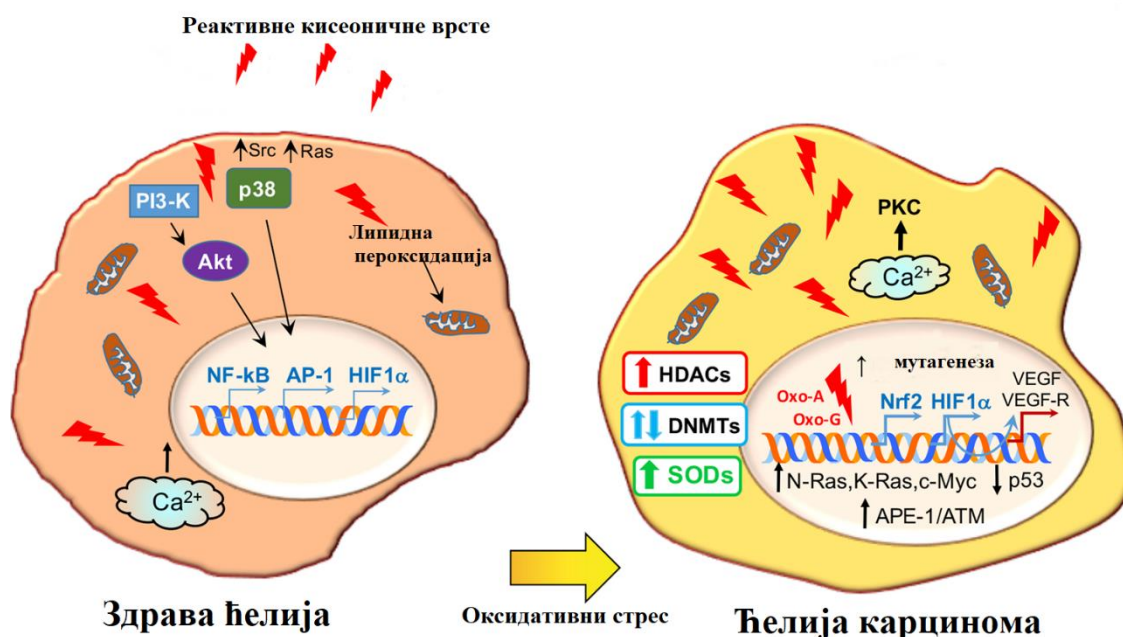
Прогестерон је стероидни хормон неопходан за физиолошки развој дојке током пубертета и у припреми за лактацију током трудноће. Биолошки ефекат прогестерон постиже након везивања за своје рецепторе. Постоје две специфичне изоформе рецептора прогестерона PR-A (енгл. *Progesterone Receptor A*) и PR-B (енгл. *Progesterone Receptor B*). Ове изоформе рецептора се првенствено експримирају као одговор на иницијацију транскрипције активирањем рецептора за естроген. Епителне ћелије у млечној жлезди су места где се експримирају обе врсте рецептора за прогестерон (Trabert и сар., 2020). Експримирање рецептора за естроген је неопходно да би се индуковала и експресија прогестерона у овим ћелијама. Управо из овог разлога је тешко одвојити и изучавати биолошке ефекте прогестерона без утицаја естрогена. Увидом у литературу рецептори прогестерона су веома мало изучавани самостално како у здравим тако и у карциномским ћелијама дојке. Изоформе прогестерона су описане као класични фактори транскрипције који се активирају преко везивања за одговарајући лиганд који регулишу експресију гена везујући се за одређена места на молекулу ДНК (Jacobsen и Horwitz, 2012). Ове изоформе рецептора се активирају након директног везивања за прогестерон или везивањем за синтетичке лиганде као што је прогестин. Ове три изоформе прогестеронских рецептора су у ствари протеински продукти једног гена који се налази на хромозому 11 q22-23. Прогестерон позитивне ћелије обично експримирају PR-A и PR-B изоформе рецептора које имају различите транскрипционе активности у оквиру истог промоторског региона. Изоформа PR-B је неопходна за физиолошки развој млечне жлезде, док PR-A регулише развој материце. Изоформа PR-C рецептора нема класичну транскрипциону активност али када је активан може повећати концентрацију прогестерона у ћелијама карцинома дојке или функционисати као инхибитор PR-B изоформе рецептора у материци. У здравом ткиву дојке и у бенигним лезијама једнака је концентрација PR-A и PR-B, док је код карцинома тај однос нарушен. Релативна експресија ове две изоформе рецептора се мења током различитих фаза канцерогенезе. Прогестерон паракрино стимулише раст епителних ћелија дојке, што је управо један од фактора ризика за настанак карцинома. Прекомерна стимулација пролиферације здравих ћелија може довести до настанка неопластичних промена у овим ћелијама, што ће последично иницирати канцерогенезу (Obr и Edwards, 2012). Прогестерон свој пролифеартивни ефекат постиже након везивања са PR-B рецептором у ћелијама карцинома дојке. Прогестерон је карактеристичан по томе што може да модификује активност естрогена и његову улогу током иницијације канцерогенезе и стимулише пролиферацију ћелија карцинома дојке преко активације протоонкогена. Већина преканцерозних лезија је ER/PR позитивна, па и њихови рецептори остају високо експримирани током свих стадијума болести, при чему могу да утичу и на ћелије из окружења тако што иницирају њихову пролиферацију (Clarke и сар., 2006).

Рецептор хуманог епидермалног фактора раста 2 је члан *HER2* фамилије гена коју чине четири рецептора. Налази се на хромозому 17к21.1 (Iqbal и Iqbal, 2014). Рецептор хуманог епидермалног фактора раста 2 учествује у ембрионалном развоју фетуса са посебним значајем у регулацији нервног система, развоју костију, мишића, коже, срца, плућа и епитела дигестивног тракта. Конкретно, *HER2* регулише нормалан раст и развој лобуло-алвеоларног система дојке. На основу биолошке функције *HER2* припада класи протоонкогена и кодира трансмембрански протеин HER2. Овај протеин се у физиолошким условима експримира у различитим типовима здравих ћелија

искључујући оне хематопоезног порекла. Његова сигнална активност је регулисана посредством HER2 лиганда (Furter и сар., 2018). Фамилија HER2 рецептора је укључена у регулацију физиолошког развоја дојке, међутим њихова прекомерна експресија је повезана са иницијацијом канцерогенезе у овим ћелијама. Неконтролисана амплификација *HER2* гена повећава протеинску експресију HER2 протеина, што нарушава функционисање рецептора и контролу сигналне трансдукције и иницира настанак агресивне форме карцинома дојке. Неконтролисана амплификација гена је првобитно описана код карцинома дојке, али је такође карактеристична и за остале карциноме репродуктивног система. *HER2* ген је амплификован код 20 – 30% карцинома дојке, углавном дукталног порекла (Majumder и сар., 2021).

5. Улога реактивних врста кисеоника у настанку, прогресији и терапији карцинома дојке

Реактивне врсте кисеоника (енгл. *Reactive Oxygen Species* – ROS) чине групу високо реактивних молекула који су значајни регулатори сигналних путева у ћелијама. Оптимална концентрација ROS-а неопходна је за одржавање сложених биохемијских механизма у физиолошким границама. Када се ова равнотежа наруши настаје оксидациони стрес, који ако пређе у хронично стање доводи до оштећења есенцијалних биомакромолекула и настанка различитих патофизиолошких процеса у ћелијама. Умерено повећање концентрације ROS-а доприноси развоју различитих патолошких стања међу којима је и карцином (Perillo и сар., 2020). Оксидациони стрес који настаје као последица повишене концентрације ROS-а доприноси стимулацији различитих сигналних путева у циљу избегавања ћелијске смрти, стимулације пролиферације, ангиогенезе, инвазије и миграције (Слика 6). С тога је одржавање редокс равнотеже у ћелијама путем редокс зависне сигнализације битно за оптимално функционисање ћелија (Sarmiento-Salinas и сар., 2021).



Слика 6. Редокс сигналинг и оксидативни стрес у здравој и карциномској ћелији (Слика преузета и модификована из: <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2>).

Реактивне кисеоничне врсте постоје у два облика у ћелијама у зависности од тога да ли имају или немају неспарене електроне. Један облик обухвата слободне радикале укључујући супероксид ($O_2^{\cdot-}$), хидроксил радикале ($\cdot OH$), азот оксид ($NO\cdot$), алкоксил радикале ($RO\cdot$) и пероксил радикале ($ROO\cdot$). Други облик обухвата нерадикалне врсте ROS-а, укључујући водоник пероксид (H_2O_2), органске хидро-пероксиде ($ROOH$), хипохлорит ($HOCl$) и пероксинитрит ($ONOO^-$) (Forman и сар., 2014). Међу њима, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и хидроксилни радикали су највише истражене врсте ROS-а. Реактивне врсте кисеоника највише се стварају у процесима оксидативне фосфорилације у митохондријама, оксидо-редукцијом у присуству јона метала као и у циклусу трикарбоксилне киселине (енгл. *The Tricarboxylic Acid Cycle* – TCA). Сматра се да се током респирације у митохондријама 1-2% молекуларног кисеоника претвара у ROS кроз редукцију једног до три електрона и то доводи до стварања хидроксилних, водоник-

пероксидних, супероксидних и пероксинитритних радикала. Многи ензими такође подстичу производњу ROS-а, као што су никотинамид аденин динуклеотид фосфат оксидаза, ксантин оксидаза, синтаза азот оксида, циклооксигеназе, ензими цитохрома P450 и липоксигеназе. Поред тога, егзогени стрес, као што је јонизујуће зрачење и употреба различитих врста лекова могу довести до стварања ROS-а (Bedard и Krause, 2007).

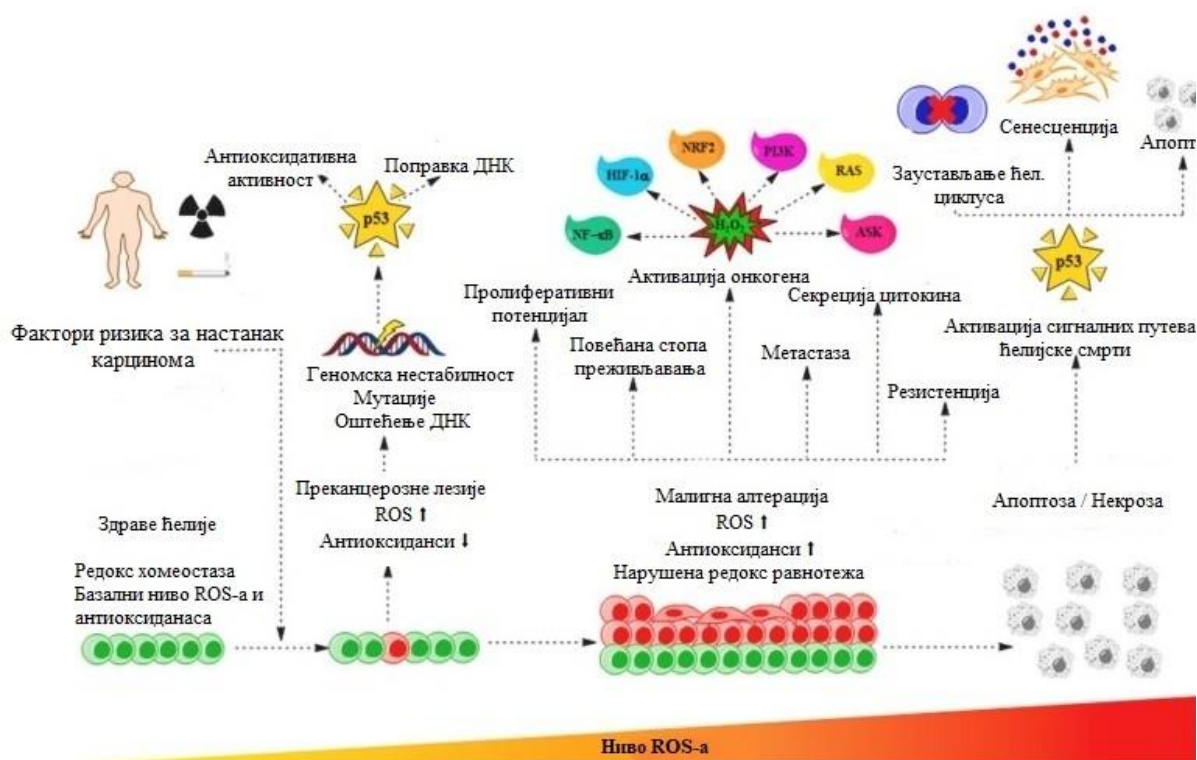
Реактивне кисеоничне врсте су у сталној интеракцији са неорганским молекулима, протеинима, липидима и нуклеинским киселинама. Дуготрајан оксидативни стрес може неповратно променити структуре и функције ових макромолекула, што је честа појава код карцинома. Поремећају редокс равнотеже могу да допринесу и реактивне врсте азота (енгл. *Reactive Nitrogen Species*), сумпора (енгл. *Reactive Sulfur Species*), селена (енгл. *Reactive Selenium Species*) као и реактивне карбонилне врсте (енгл. *Reactive Carbonyl Species*) (Sies, 2021).

Као што је већ напоменуто, концентрација ROS-а у ћелијама зависи од баланса између његове производње и елиминације антиоксидансима. Иако ћелије имају различите ендogene антиоксидативне системе заштите они не могу увек ефикасно елиминисати прекомерно продуковани ROS. Глутатион (енгл. *Glutathione* – GSH) је један од најпознатих ћелијских антиоксиданаса и представља непротеински интрацелуларни тиол (Deponte, 2017). Антиоксидативни ефекти глутатиона имају важну улогу у регулисању ћелијске пролиферације кроз активацију регулаторних сигналних путева. Повећана концентрација GSH у ћелијама спречава оштећење ћелија услед оксидационог стреса, док губитак његове активности доприноси настанку болести. Различита патолошка стања могу настати као последица дисрегулисане продукције GSH и промена у његовој концентрацији (Teskey и сар., 2018).

Смањена концентрација глутатиона у ћелији може довести до деловања ROS-а на липиде мембране при чему долази до ослобађања органских липидних пероксил радикала и липидних хидропероксида. С обзиром на липиди имају функционалну и структурну улогу у одржавању интегритета мембране, оксидација ових макромолекула мења физичка својства мембране. За настанак многих патофизиолошких процеса у ћелијама одговорни су липидни пероксиди чијом деградацијом настају једнако биоактивни реактивни алдехиди и хидрокси киселине (Hayes, 2020). Најпознатији биомаркери за одређивање липидне пероксидације су 4-хидроксинеоненал-4- (енгл. *4-Hydroxynonenal* - HNE) и малондиалдехид (енгл. *Malondialdehyde* - MDA), а уједно представљају и најзначајније реактивне алдехиде са високим афинитетом везивања за липиде, протеине и ДНК при чему доводе до њиховог оштећења (Abuja и Albertini, 2001).

5.1. Улога ROS-a у настанку карцинома

Оксидативни стрес ће настати кад год нека промена у механизмима производње и деградације ROS-a поремети нормално функционисање редокс-осетљивих механизма (Sies, 2021). Канцерогенеза је сложен процес који укључује низ промена на молекуларном нивоу које иницирају трансформацију здраве ћелије у карциномску, а истраживања показују да ROS може имати значајан утицај у настанку и прогресији различитих типова карцинома (Sarmiento-Salinas и сар., 2021). Повећана концентрација ROS-a па самим тим и оксидациони стрес у карциномским ћелијама доприноси стимулацији различитих сигналних путева у циљу избегавања ћелијске смрти, стимулације пролиферације, ангиогенезе, инвазије и миграције ћелија карцинома (Слика 7) (Barrera, 2021; Sarmiento-Salinas и сар., 2021).



Слика 7. Улога ROS-a код карцинома. Зелено обојене ћелије су здраве, док су црвене малигне (Слика преузета и модификована из: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119942>).

Реактивне врсте кисеоника имају двојаку улогу у ћелијама - могу да делују као тумор супресори али и као онкогени. Изложеност хемијским канцерогенима и јонизујућем зрачењу може да доведе до губитка интегритета генома код здравих ћелија, док се у исто време повећава концентрација ROS-a, и активирају се антиоксидативни заштитни ензими као што је GSH (Sarmiento-Salinas, 2021) (Слика 7). Уколико настане оксидација липида, нуклеинских киселина и протеина, као основних градивних макромолекула, ћелија активира репарационе системе за поправку оштећења. Међутим, када ћелија није у стању да покрене репарационе механизме, настаје трајно оштећење ових макромолекула и општа геномска нестабилност што повећава шансу за настанак мутација у онкогенима или тумор супресорима. Мутације у овим регулаторним генима доводе се у везу са настанком карцинома и формирањем преканцерозних лезија (Liou и Storz, 2010; Assi, 2017). Важно је напоменути да карциномске ћелије за разлику од

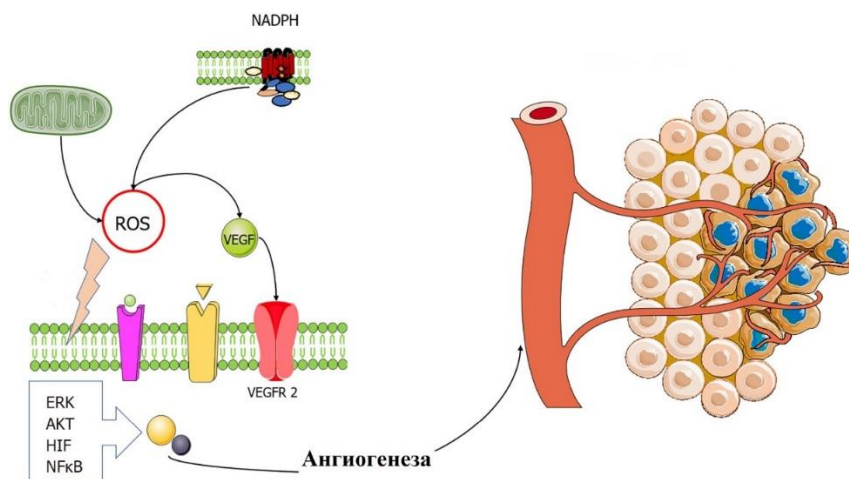
здравих имају повишену концентрацију ROS-a која је у корелацији са насталим оксидативним оштећењем ДНК и геномском нестабилношћу, док су ензими који учествују у антиоксидативној заштити екстремно повишени управо због избегавања апоптозе (Liou и Storz, 2010).

Уколико се говори о оштећењима на липидима, ROS може индуковати оксидативни стрес кроз активирање пероксидације липида, при чему ова реакција доводи до дисфункције липидног двослоја ћелијске мембране, нарушава се пропустљивост, стварају се слободни радикали и повећава се оксидациони стрес унутар ћелије (Barrega, 2021). Све промене које настају као последица липидне пероксидације су детектабилне и у карциномским ћелијама. Када интерагује са протеинима, ROS активирају на неколико десетина сигналних путева укључених у контролу пролиферације и апоптозе ћелије. Основни механизам активације ових сигналних путева заснива се на оксидацији остатака цистеина или тирозина који реагују на редокс дисбаланс при чему настају интра- и интерпротеинске модификације које доводе до промена у метаболизму и иницирају настанак карцинома (Villalpando-Rodriguez и Gibson, 2021). Константан оксидативни стрес у ћелијама карцинома дојке може да утиче и на стварање клонова који избегавају апоптозу и успешно преживљавају и пролиферишу у туморској микросредини, и уводе карцином у стање прогресије која се огледа у формирању метастатских депозита.

5.2. Улога ROS-a у прогресији карцинома

Приликом малигне трансформације ћелија, повишена концентрација ROS-a доприноси одржавању протуморгене сигнализације, при чему реактивни биомолекули активирају сигналне путеве за избегавање ћелијске смрти, пролиферацију, ангиогенезу, инвазију, метастазу, метаболизам антиоксиданаса и система за детоксикацију. Метаболичко активирање последња два система омогућава ћелијама карцинома да толеришу високе концентрације ROS-a како би избегле смрт (Sarmiento-Salinas, 2021). У складу са овим наводима, заједничко за све ћелије карцинома је да их карактерише повишена концентрација ROS-a која се повезује са оксидативним оштећењем ДНК, одржавањем геномске нестабилности и активацијом протуморгених сигналних путева (Moloney и Cotter, 2018).

Ангиогенеза индукована повишеном концентрацијом ROS-a је иницирана првенствено пролиферацијом карциномских ћелија у хипоксичном микроокружењу. Повишена концентрација одређених врста ROS-a као што су O_2 и H_2O_2 доводи до настанка оксидативног стреса, и лучења проангиогених фактора, различитих класа фактора раста, цитокина и транскрипционих фактора као што су VEGF и HIF-1 α (Слика 8). Ове реактивне врсте ROS-a функционишу као сигнални молекули који посредују у различитим одговорима везаним за раст ћелија и ангиогенезу (Ushio-Fukai и Nakamura, 2008; Kim и Byzova, 2014). Оксидативни стрес изазван ROS-ом стимулише продукцију VEGF-a у неколико различитих типова ћелија, укључујући и ендотелне ћелије. ROS на овај начин индукује ангиогенезу активацијом HIF-1 α , АКТ протеин киназе (енгл. *Protein kinase B*) и екстрацелуларне ERK киназе (енгл. *Extracellular- signal Regulated Kinase*) (Слика 9). Оксидативни стрес такође може индуковати ангиогенезу независно од VEGF-a, и то активирањем пероксидације липида и стварањем метаболита који делују или као лиганди или индукцијом пост-транслационих модификација протеина унутар ангиогених сигналних путева, као што је NF κ B (енгл. *The Nuclear Factor NF- κ B*) сигнални пут (Huang и Nan, 2019).



Слика 8. Индукција ангиогенезе повећањем концентрације ROS-a у ћелијама карцинома (Слика преузета и модификована из: <https://doi.org/10.13105/wjma.v11.i6.253>).

Овако индукована ангиогенеза повећава ризик од настанка метастатских промена кроз стимулацију миграције и инвазије карциномских ћелија, реорганизацију цитоскелета и морфогенезу тубула. Оксидативни стрес заједно са ангиогенезом може да подстакне и лимфну дисеминацију ћелија карцинома дојке. Металопротеиназа је још један молекул који је одговоран за прогресију карцинома која је иницирана ROS зависном сигнализацијом. Присуство металопротеиназа је неопходно за интеграцију ендотелних ћелија у карциномско ткиво, јер разграђују екстрацелуларни матрикс и омогућавају миграцију ових ћелија (Ushio-Fukai и Nakamura, 2008).

Промене у метаболизму липида које су честе у ћелијама карцинома, поред свих већ описаних улога имају и значајну улогу у избегавању имуног одговора ових ћелија. Најпознатије класе липида као што су холестерол и различите класе масних киселина имају значајну улогу у модулацији функције имуних ћелија и инфламаторног одговора (Yu и сар., 2021). Дисрегулисани метаболизам липида у овим ћелијама може пореметити активацију имуних ћелија и њихову инфилтрацију чиме се олакшава имунолошка инвазија и утиче на активирање имуног одговора код карцинома. Аберантни метаболизам липида може довести до акумулације слободних масних киселина што изазива оксидациони стрес у ћелијама који настаје као резултат прекомерне продукције ROS-a (Nakamura и Takada, 2021). На овај начин такође долази до оштећења ћелијских компоненти, укључујући ДНК, протеине и липиде. Хипоксично окружење може да подстакне активацију синтезе масних киселина у ћелијама карцинома, што доводи до акумулације липида и холестерола. Ова промена има за циљ иницирање оксидативног стреса као и промену у механизмима комуникације сигналних путева који регулишу раст карцинома и метастатски потенцијал, укључујући и прекомерно лучење цитокина у туморско микроокружење (Gao и сар., 2022).

5.3. Улога ROS-а у терапији карцинома

Акумулација оштећења биомолекула проузрокована ROS-ом један је од фактора ризика за настанак канцера. Велики је број научних радова који се баве улогом ROS-а у терапији карцинома. Антиоксиданси су најпознатији ензими који учествују у елиминацији ROS-а. Занимљив је податак да конзумирање само 100 g воћа или поврћа дневно смањује ризик за настанак карцинома плућа код пушача. Најпознатији антиоксиданс је витамин C са значајним антитуморским ефектом на различитим модел системима (Büchner и сар., 2010). Смањењем концентрације ROS-а уз употребу антиоксиданаса могуће је модификовати активност сигналах путева који регулишу преживљавање карциномских ћелија, избегавање имуног одговора и метастатски потенцијал ових ћелија. Ћелије карцинома иначе имају вишу концентрацију ROS-а у поређењу са здравим ћелијама, и осетљивије су на интрацелуларну концентрацију ових молекула. На основу наведеног, смањење интрацелуларне концентрације ROS-а уз помоћ антиоксиданаса може бити ефикасан терапијски приступ у лечењу карцинома (Tong и сар., 2015).

Механизам деловања већине антитуморских агенаса се заснива на повећању концентрације ROS-а у ћелија карцинома при чему се нарушава редокс хомеостаза у овим ћелијама. Антрациклини (доксорубицин, епирубицин и даунорубицин), агенси за алкиловање, координациони комплекси платине (цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина) као и камптотекани и кампотекани су једни од најпознатијих лекова са оваквим механизмом деловања (Nakamura и Takada, 2021). Стварање прекомерне концентрације ROS-а и инхибиција ћелијског антиоксидативног система су два главна разлога за повећање ROS-а као одговор на деловање хемотерапеутских агенаса. На пример, цисплатина која је једна од најефикаснијих хемотерапеутских агенаса и индукује стварање ROS-а па самим тим и иницијацију апоптозе која је активирана преко митохондријског пута (Conklin, 2004; Yang и сар., 2018).

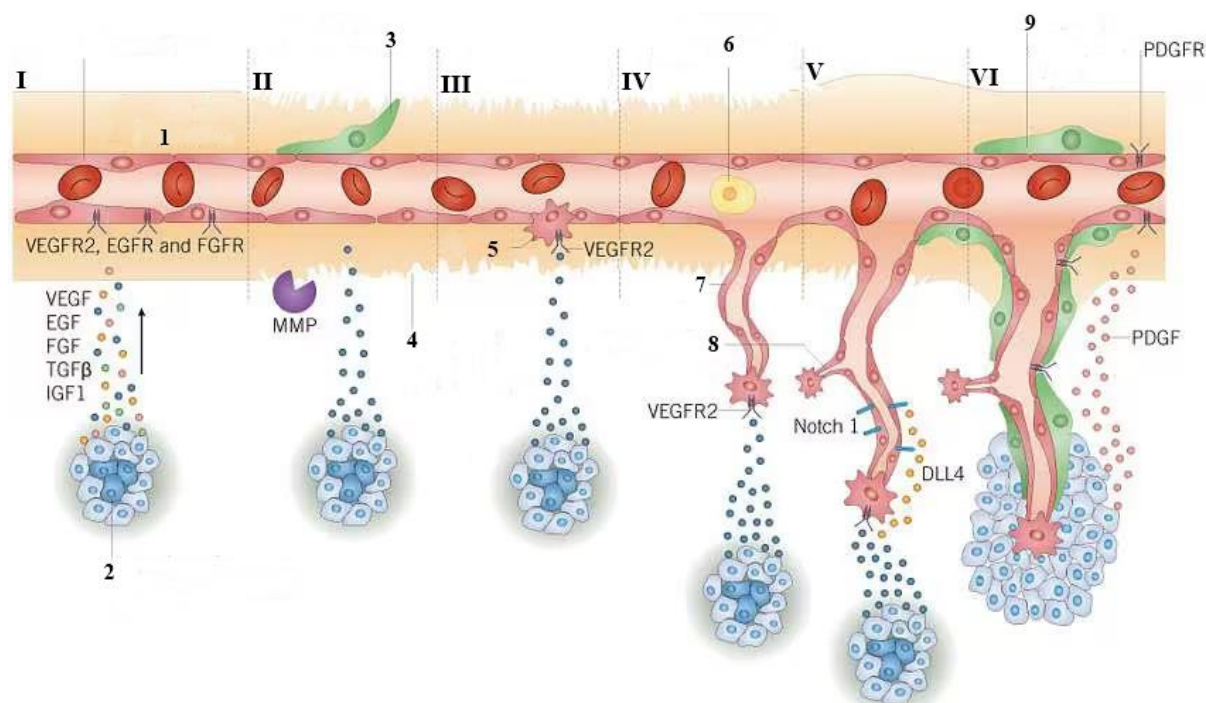
С обзиром да су митохондрије органеле у којима се примарно старају ROS оне представљају идеалну мету за терапију лечења карцинома. Митохондрије код карцинома остају функционалне и метаболички активне са тенденцијом да апсорбују више глукозе од здравих ћелија. Истраживања показују да су ћелије карцинома осетљивије на оштећење митохондрија од здравих ћелија. На основу овога се изводи закључак да ће агенси који имају утицај на митохондрије бити ефикасни и у индукцији апоптозе у ћелијама карцинома јер утичу на мембрански потенцијал ове органеле (Yang и сар., 2016). На пример, ресвератол као познати природни антиоксиданас, испољава антитуморски ефекат директно делујући на активност митохондрија. Митохондрије су такође подложне и оксидативном оштећењу, иако су ове органеле главни извори ROS-а. Митохондријска ДНК је на мети ROS-а због непосредне близине електрон транспортног ланца, јер се управо овде производи ROS. Узимајући у обзир све наведено, ћелије карцинома су осетљивије на редокс дисбаланс па стога циљање ROS-а може бити ефикасан третман лечења карцинома (Aggarwal и сар., 2019).

6. Ангиогенеза

Ангиогенеза представља процес стварања нових крвних судова из већ постојећих. Стварање нових крвних судова је неопходно због снабдевања ткива кисеоником и хранљивим материјама, али и због елиминације токсина. Ангиогенеза се нормално одвија у физиолошким процесима као што је ембриогенеза, процес зарастање рана, и у току менструалног циклуса. У физиолошким условима процес ангиогенезе је строго регулисан одржавањем хомеостазе између стимулишућих или инхибирајућих фактора у здравим ткивима. Када се ова равнотежа наруши настаје патолошка ангиогенеза. Овај тип ангиогенезе је карактеристичан за одређене болести као што су дијабетес, гојазност, артритис, кардиоваскуларне болести и карцином (Carmeliet и сар., 2005).

Раст карцинома је директно зависан од процеса ангиогенезе: да би карцином порастао само један милиметар потребно је формирање нових крвних судова, при чему туморске ћелије почињу да луче различите стимулишуће факторе које иницирају процес ангиогенезе. Активација овог процеса није неопходна само са иницијацију канцерогенезе и инвазију карциномских ћелија у околна ткива већ и за индукцију метастаза. Ћелије карцинома формирају крвне судове да би одржале свој пролиферативни потенцијал на новим локацијама и како би даље наставиле процес миграције и метастазирале (Al-Ostoot и сар., 2021). Недостатак адекватног снабдевања крвљу и нутријентима може зауставити раст карцинома, смањити примарно настали тумор, а понекад иницирати смрт ћелија. У одсуству ангиогенезе, тумори могу да порасту максимално до $1-2 \text{ mm}^3$ у пречнику, док исти ти карциноми у микросредини где је активирана ангиогенеза могу нарасти преко 2 mm^3 (Lugano и сар., 2020).

Процес ангиогенезе односно формирања нових крвних судова се одвија кроз неколико различитих корака почевши од пробијања базалне мембране, при чему је хипоксија најважнији окидач у овом процесу (Слика 9). На овај начин је извршена дестабилизација најближег здравог крвног суда, што је изазвало слабење међућелијских веза између ендотелних ћелија, пробијање базалне мембране и локалну протеолизу. Затим други корак у оквиру овог процеса подразумева активацију ангиогених фактора који стимулишу миграцију ендотелних ћелија. Овако активирани ендотелне ћелије пролиферишу и сазревају у ткиву (Lamallice и сар., 2007; Zhang и сар., 2020). Ангиогени фактори настављају да стимулишу ангиогени процес. Протеолитички ензими се ослобађају након што ангиогени стимуланси активирају ендотелне ћелије које деградују екстрацелуларни матрикс и базалну мембрану (Bouris и сар., 2018). Завршна фаза овог процеса подразумева формирање примарних клица након што ендотелне ћелије пролиферишу и мигрирају у периваскуларно подручје. Следи интензивно формирање капиларних петљи, синтеза нове базалне мембране и сазревање новоформираних крвних судова до коначних структура налик тубулама кроз које крв може да тече (Sokolov и сар., 2017). Поред ендотелних ћелија и присуство перицита је од изузетне важности приликом формирања нових крвних судова јер регулишу капиларни проток крви обавијајући се око ендотелних ћелија. Цео овај процес је строго контролисан од стране неколико кључних транскрипционих фактора који могу да доведу до промене равнотеже између про и антиангиогених регулатора и на тај начин активирати или инхибирати ангиогенезу. Важно је напоменути да микроокружење тумора има веома значајну улогу приликом свих фаза ангиогенезе јер представља кључно место синтезе одговарајућих ангиогених фактора (Hillen и Griffioen, 2007; Pine и сар., 2020).



Слика 9. Процес ангиогенезе код карцинома. **(I)** Хипоксично окружење индукује експресију HIF-1 и активирање проангиогених фактора од којих је VEGF најбитнији; 1 – базална мембрана; 2 – хипоксично микроокружење. **(II)** Протеолитичка деградација – Хипоксија регулише експресију протеазе (MMP) која деградује базалну мембрану и одвајање перицита; 3 – одвајање перицита; 4 – деградација базалне мембране. **(III)** Миграција ћелија – Специјализоване ендотелне ћелије (енгл. *tip cells*) мигрирају ангиогеним градијентом; 5 – специјализоване ендотелне ћелије. **(IV)** Тубуларна формација – ендотелне ћелије се диференцирају у пратеће ћелије крвног суда (енгл. *stalk cells*); 6 – ендотелна прогениторна ћелија; 7 – пратеће ћелије крвног суда. **(V)** регулација величине нових крвних судова – VEGF стимулише секрецију DLL4 који се везује за Notch-1 рецептор; 8 – пуњење крвног суда. **(VI)** Васкуларизација тумора – PDGFβ стимулише везивање перицита; 9 – регрутовање и везивање перицита за базалну мембрану (Слика преузета и модификована из: <https://doi.org/10.1007/s00366-019-00779-0>).

Способност ћелија да индукују ангиогенезу је једна од њихових најзначајнијих фенотипских и генотипских особина. Брзо растући тумор захтева оптималне количине кисеоника и хранљивих материја да би могао да се размножава тако да настоји да индукује ангиогени фенотип. Као резултат овог процеса настаје такозвани 'ангиогени прекидач' како би карциномске ћелије могле да утичу на хомеостазу ангиогених стимулатора и инхибитора, фаворизује се проангиогени ефекат при чему бенигне лезије прелазе у малигни фенотип (Samson и сар., 2020).

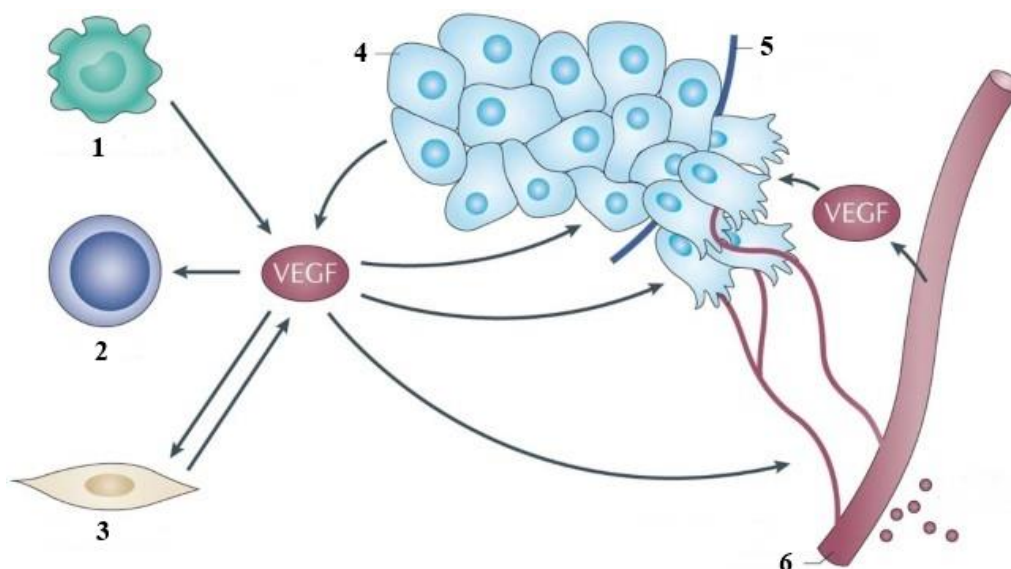
Стимулатори ангиогенезе представљају разнолику групу молекула који укључују различите факторе раста, ензиме који разграђују матрикс, цитокине, хемокине биоактивне липиде и остале разне мале молекуле. Како у физиолошким тако и у патолошким стањима, проангиогени фактори раста првенствено активирају бројне специфичне површинске рецепторе на паракрини или аутокрини начин, при чему се као кључни фактор издваја VEGF-A (енгл. *Vascular endothelial growth factor A*). Преко контролисане интеракције између VEGF-a и осталих проангиогених фактора, VEGF-A се сматра најмоћнијом VEGF изоформом која делује првенствено на рецептор VEGFR2

(енгл. *Vascular endothelial growth factor receptor 2*) при чему значајно доприноси васкуларној пермеабилности, пролиферацији ендотелних ћелија, миграцији и преживљавању (Van Hinsbergh и сар., 2006; Delle Monache и сар., 2020). Активација основног фактора раста фибробласта је у овом стадијуму неопходна како би се одржала константна стимулација активности VEGF-A преко његовог рецептора VEGFR2. Такође активација сфингозин-1-фосфата (енгл. *Sphingosine-1-Phosphate* - S1P), веома значајног биоактивног липида, даје значајан допринос ангиогенези тумора јер је неопходан за формирање мембране крвних судова (Ragunathrao и сар., 2019). Међу ензимима који разграђују екстрацелуларни матрикс и омогућавају миграцију и инвазију карциномских ћелија приликом ангиогенезе издвајају се матрикс металопротеиназе 2 и 9 као главни регулатори овог процеса, док се од хемокина издвајају хемокински рецептор CXCR-4 и његов лиганд CXCL-12 (Gonzalez-Avila и сар., 2020). Хипоксија која је карактеристична за брзо растућа ткива карцинома такође нарушава хомеостазу антиангиогених и проангиогених фактора јер значајно индукује експресију проангиогених фактора и цео овај сигнални пут регулише помоћу HIF-1 транскрипционог фактора (Al-Ostoot и сар., 2021). Нова васкуларна мрежа која настаје у процесу ангиогенезе је структурно и функционално абнормална а карактеришу је крвни судови који су незрели и високо пропусни, мањег пречника, са хетерогеном васкуларном густином, док је притисак микроваскуларне и интерстицијске течности скоро исти, за разлику од крвних судова здравог ткива. Важно је напоменути да ендотелне ћелије које образују новоформиране крвне судове немају периците обавијене око себе или уграђене у базалну мембрану малих капилара па самим тим не могу прецизно да регулишу микроцирулацију у овим крвним судовима (Al-Ostoot и сар., 2021).

6.1. Регулаторни фактори ангиогенезе

6.1.1. Васкуларни ендотелни фактор раста

Васкуларни ендотелни фактор раста је најпознатији члан фамилије ангиогених и лимфангиогених фактора раста са веома важним регулаторним улогама у процесу формирања крвних и лимфних судова током ембрионалне васкулогенезе и ангиогенезе. Први откривен и највише проучаван је VEGF-A хомодимерни гликопротеин са молекулском тежином око 45 kDa, а његов функционални ген се налази на 6к21.3 хромозому (Ferrara, 2004). Алтернативним сплајсовањем гена *VEGF-A* најчешће настају изоформе од 121, 165, 189 и 206 аминокиселина. Изоформа VEGF-A₁₂₁ се слободно лучи, док се веће изоформе (VEGFA₁₈₉ и VEGFA₂₀₆) налазе у екстрацелуларном матриксу и захтевају деловање протеаза за њихову активацију. Изоформа VEGFA₁₆₅ постоји у слободној форми или везана за екстрацелуларни матрикс (Park и сар., 1993).



Слика 10. Улога VEGF-A код карцинома. 1 – макрофаг; 2 – Т ћелије; 3 – фибробласт; 4 – карциномске ћелије; 5 – базална мембрана; 6 – капиларни ендотел (Слика преузета и модификована из: <https://doi.org/10.1038/nrc3627>).

Лиганди VEGF-A иницирају ангиогенезу преко неколико различитих рецептора. Два рецептора су идентификована на ендотелним ћелијама и окарактерисани су као високо специфични рецептори тирозин киназе VEGFR1 и VEGFR2 (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 and 2*). Различити чланови VEGF фамилије имају различите афеинитете везивања за сваки од ових рецептора, па тако изоформе VEGF-A се везују за VEGFR1 и VEGFR2 док се PlGF-1, PlGF-2, и VEGF-B фактори раста везују само за VEGFR1 рецептор (Yamazaki и Morita, 2006).

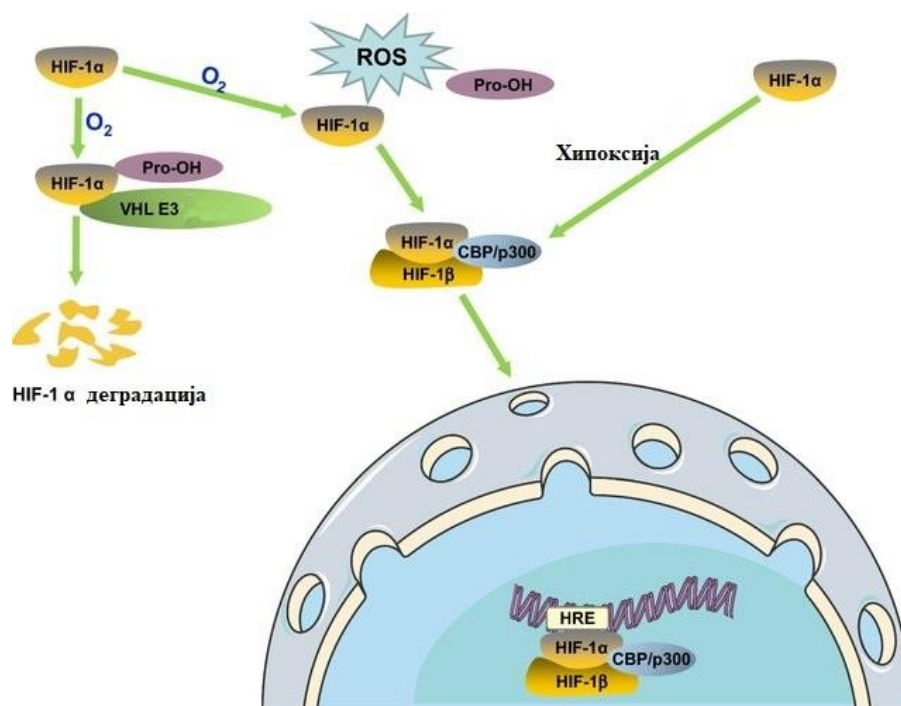
Иницијација ангиогенезе посредством VEGF подразумева стимулацију пролиферације и преживљавања ендотелних ћелија, миграцију, инвазију, повећава пропустљивост крвних судова и хемотаксу васкуларних прекурсорних ћелија. Поред ових проангиогених ефеката VEGF има неколико важних улога које су независне од васкуларних процеса, а укључују аутокрине ефекте на туморске ћелије и избегавање имуног одговора (Kaplan и сар., 2005) (Слика 10). Повишена експресија *VEGFA*-а

забележена је код различитих типова карцинома а нарочито код карцинома дојке, колоректалног, карцинома плућа, глиобластома и карцинома бубрега (Hlatky и сар., 1994). Код пацијената који су имали значајно повишену експресију *VEGFA*-а опште здравствено стање је било знатно лошије него код оних са нижим нивоима експресије. Стога ниво експресије *VEGFA*-а може послужити као предиктивни параметар за праћење метастатског типа карцинома дојке (Fernando и Hurwitz, 2003; Cvetković, 2017). Препознавање значаја VEGF-а као кључног регулатора ангиогенезе довело је до развоја неколико агенаса који спречавају везивање VEGFA за рецепторе, тј. антитела која директно блокирају VEGFR-2, као и мали молекули који инхибирају активност киназе VEGFR-2 који блокирају сигнализацију фактора раста. Блокирање експресије VEGFA на транскрипционом и протеинском нивоу индукује значајни антиангиогени ефекат преко инхибиције раста нових крвних судова и индукције апоптозе (Niu и Chen, 2010).

6.1.2. Фактор индукован хипоксијом

Фактор индукован хипоксијом (енгл. *Hypoxia inducible factor – HIF*) је активатор транскрипције регулисан кисеоником који има веома битну улогу у развоју, физиологији и патогенези. Као активни транскрипциони фактор HIF је хетеродимер кога чине једна од α субјединица (HIF-1 α , HIF-2 α или HIF-3 α) и једна β субјединица. *HIF-1 α* је локализован на хромозому 14 краку q21-q24, док је *HIF-1 β* локализован на хромозому 1 краку q21.3 и продукт је *ARNT* гена (енгл. *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*). Активација обе субјединице *HIF-a* је индукована хипоксијом на сличан начин, при чему је *HIF-1 α* најважнији регулатор хипоксије и уједно субјединица осетљива на промену концентрације кисеоника.

Обзиром да је активност HIF транскрипционог фактора кисеоник зависна, сматра се кључним регулатором ћелијског одговора на хипоксичне услове. Активација HIF-a код карцинома се дешава искључиво у хипоксичким условима када HIF-1 α димеризује са HIF-1 β и ступа у интеракцију са коактиваторима транскрипције односно p300/Creb комплексом пре везивања за HRE елемент (енгл. *Hypoxic Responsive Element*) и на овај начин активирају транскрипцију гена и протеина који су директно иницирани хипоксичним условима унутар ћелија (Слика 11) (Masoud и Li, 2015). Прекомерна експресија *HIF*-а повезана је са активацијом преко 100 гена који су одговорни за ћелијску пролиферацију, диференцијацију, апоптозу, регулацију енергетског метаболизма, метаболизам глукозе, миграцију, еритропоезу и ангиогенезу. Високи нивои експресије *HIF-1 α* су у позитивној корелацији са настанком карцинома плућа, колона, желуца, дојке, ендометријума, оваријума (Semenza, 2001; Lv и сар., 2016).



Слика 11. Активација и деградација HIF-1α (Слика преузета и модификована из: <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01370-0>)

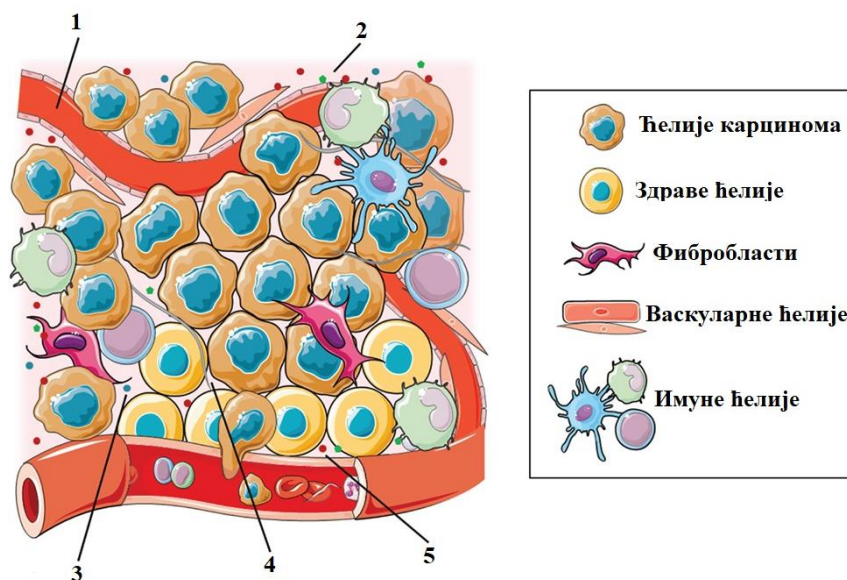
Што се тиче ангиогенезе индуковане активацијом HIF-a, овај транскрипциони фактор може да активира експресију бројних проангиогених фактора укључујући VEGF, специфичне рецепторе VEGF-a, фактор раста тромбоцита (енгл. *Platelet Derived Growth Factor B* – PDGF-B), активатор плазмиогена – 1 (енгл. *Plasminogen Activator Inhibitor-1* – PAI-1), матрикс металопротеиназе (енгл. *Matrix Metalloproteinases* – MMP-2 и MMP-9) и ангиопоетини 1 и 2 (енгл. *Angiopoietins* – ANG-1 and ANG-2), али и транскрипцију гена укључених у остале процесе: еритропоетин (енгл. *Erythropoietin* – EPO), хем-оксигеназу 1 (енгл. *Heme oxygenase 1* – HO1), алдолазу A (енгл. *Aldolase A* – ALDOA), лактат дехидрогеназу A (енгл. *Actate Dehydrogenase* – LDH), фосфофруктокиназу L (енгл. *Phosphofructokinase-L* – PFKL), фосфоглицерат киназу 1 (енгл. *Phosphoglycerate kinase* – PGK 1), индуцибилну азот оксид синтетазу (енгл. *Inducible Nitric Oxide Synthase* – iNOS) (Semenza и сар., 1997; Maynard и Ohh, 2007).

У физиолошкој али и у патолошкој ангиогнези HIF-1α сигнални пут је главни регулатор формирања васкулатуре јер директно регулише VEGF, стога има једну од битнијих улога у ангиогенези, миграцији и хемотакси ћелија. Пошто иницира ангиогенезу, стимулација експресије HIF-1α на транскрипционом нивоу може да подстакне реоксигенацију оштећених ткива и да на тај начин побољша терапијски протокол код пацијената са исхемијом ткива. Насупрот овом ефекту, инхибиција експресије HIF-1α могла би спречити ширење ћелија карцинома инактивирањем процеса ангиогенезе (Ziello и сар., 2007).

6.1.3. Матрикс металопротеиназа 9

Металопротеиназе (енгл. *Metalloproteinases* - MMPs) су велика фамилија која броји преко 20 Zn зависних ендопептидаза са основном улогом у деградацији екстрацелуларног матрикса и базалне мембране. Све металопротеиназе се синтетишу као неактивни латентни проензими који морају бити протеолитички обрађени како би се активирали, што значи да је њихова активност посттранслационо регулисана (Vu и сар., 2018). Металопротеиназе се могу поделити на шест основних група на основу структуре и специфичне улоге: колагеназе; желатиназе, стромелизини, матрилизини, металопротеиназе мембранског типа и остале неклассификоване MMPs (Amin и сар., 2017). Типична молекуларна структура MMP се састоји од N-терминалног зимогеног пропептидног домена, каталитичког домена, везујућег домена и C-терминалног домена сличном хемопексину (Jacobsen и сар., 2010). Једна од најпознатијих и највише изучаваних металопротиназа је MMP-9.

Ген за хуману *MMP-9* се налази на хромозому 20q13.12, док је молекуларна тежина проензима MMP-9 92 kDa, а тежина зреле форме 83 kDa. Прва синтетисана проформа MMP-9 садржи само 19 аминокиселина на N-терминалном крају пептида. Ова форма се излучује у екстраћелијски простор као неактивна MMP-9 величине 92 kDa. Активација проформе MMP-9 захтева исецање N-терминалног пропептидног региона под утицајем других протеаза као што је MMP-3 у циљу стварања активне, зреле MMP-9 са молекулском тежином 83 kDa. MMP-9 је регулисана на вишеструким нивоима који укључују транскрипцију, пост-транскрипциону регулацију (регулација миRNK), транслацију, лучење проMMP-9, пост-транслациону регулацију (активација проMMP-9) и инхибицију преко TIMP-a (енгл. *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* – TIMP) (Huhtala и сар., 1991).



Слика 12. Ангиогенеза и MMP-9 (1 – кapiлари тумора; 2 – MMP-9; MMP-2; 3 – цитокини и хемокини; 4 – фибриноген/колаген; 5 – проангиогени фактори (VEGF, HIF, EGF, FGF) (Слика преузета и модификована из: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00248>).

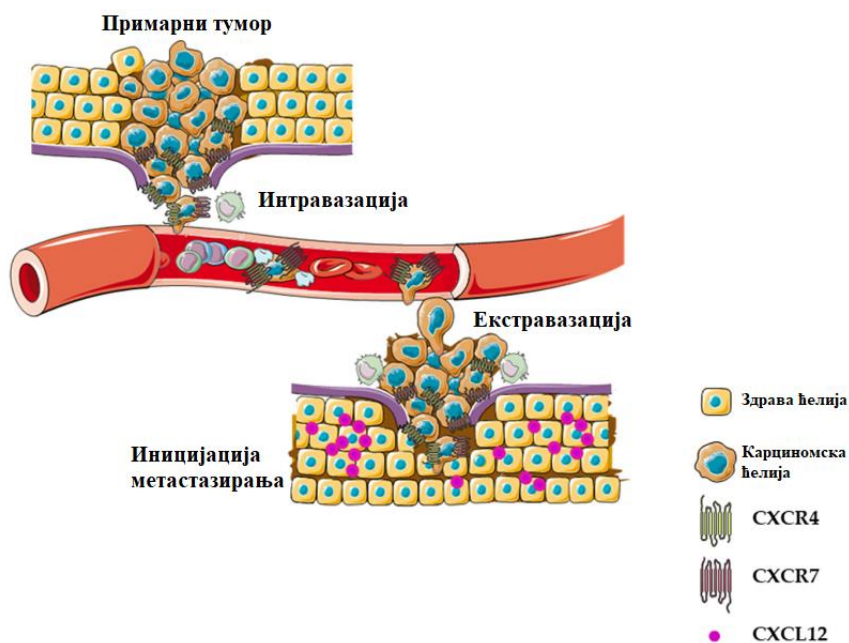
У физиолошким условима MMP-9 регулише различите развојне процесе као што су овулација, инвазија трофобласта, развој скелета, инволуција млечне жлезде и ангиогенеза. Ова металопротеиназа делује на различите врсте супстрата као што су колаген, желатин и еластин протеолитичким исецањем (Слика 10). Базална мембрана је

богата колагеном тако да MMP-9 може лако да је деградује, што је веома битно приликом прогресије карцинома јер деградација омогућава инвазију и миграцију ћелија. Ћелије карцинома луче различите факторе као што су интерферони, интерлеукини и фактори раста и на тај начин стимулишу околне ћелије да синтетишу MMP-9. Металопротеиназа 9 иницира деградацију желатина типа V, V, XI и XVI и колагена што је почетни корак метастатског процеса. Након деградације екстраћелијског матрикса и пробијања базалне мембране, ћелије почињу да мигрирају у циркулацију. Неке компоненте екстраћелијског матрикса као што су фибронектин, тромбоспондин, ламинин и остеопонтин утичу на фенотип тумора тако што усмеравају миграцију ћелија карцинома и регулишу ангиогенезу (Mondal и сар., 2020).

6.1.4. Хемокини CXCL-12/CXCR-4

Хемокини су мали излучени пептиди са молекуларном тежином у опсегу од 8 – 12 kDa и представљају фамилију цитокина. Најпознатији су по својој улози у регулацији имуног одговора, међутим имају функционалну улогу и у различитим патолошким стањима, укључујући инфламацију, атеросклерозу, хематопоезу и канцерогенезу (Chen и сар., 2018).

Хемокини се могу класификовати у четири подфамилије (CC, CXC, CX3C и C) и активирају се тако што се везују за G протеин трансмембранске рецепторе на површини ћелија. Рецептори хемокина су груписани у две подфамилије: конвенционални хемокински рецептори (енгл. *Conventional Chemokine Receptors* – CCR) и атипични хемокински рецептори (енгл. *Atypical Chemokine Receptors* - ACKR) (Bachelierie и сар., 2014).



Слика 13. Улога CXCL-12/CXCR-4 у ангиогенези (Слика преузета из: <https://doi.org/10.3390/cancers14071810>).

Ген за *CXCL-12* (енгл. *The stromal cell-derived factor 1*) се налази на 10q11.1 хромозому и има 6 егзона, а молекулска тежина му је 8 kDa. CXCL-12 се активира тако што се везује за G протеин трансмембрански рецептор CXCR-4 (енгл. *C-X-C Chemokine Receptor Type 4* – CXCR-4). Са веома битном улогом у иницијацији карцинома дојке,

CXCL-12 који настаје као продукт стромалних ћелија, тумор асоцираних фибробласта као и макрофага (Righetti и сар., 2019). Када је активиран CXCL-12 индукује транскрипцију циљаних гена који контролишу миграцију и инвазију ћелија па самим тим и ангиогенезу. Прекомерна експресија овог хемокина стимулише раст карцинома и метастатски потенцијал кроз проангиогени и проинфламаторни ефекат. Поред тога што стимулише покретљивост карциномских ћелија, поспешује и лучење протеаза што омогућава ћелијама карцинома да се лакше пробијају кроз базалну мембрану и околни екстраћелијски матрикс. На овај начин CXCL-12 може да индукује лучење MMP-9 доприносећи проангиогеном ефекту карциномских ћелија (Zielińska и Katanaev, 2020).

Фусин, односно CXCR-4, је високо конзервирани G протеин трансмембрански рецептор који се састоји од 352 аминокиселинска остатка. За CXCR-4 рецептор се везује само за CXCL-12 лиганд (Bachelierie и сар., 2014). Ген за CXCR-4 се налази на 2 q21 хромозому и има два егзона са 103 нуклеотида, 352 аминокиселине и његова молекулска тежина је 48 kDa. CXCR-4 се експримира у лимфоцитима, хематопоетским, ендотелним, епителним ћелијама, и стромалним фибробластима (Shi и сар., 2020).

У току ембриогенезе лиганд CXCL-12 и његов рецептор CXCR-4 учествују у развоју неуронских мрежа и васкуларног система у цревима као и у кардиогенези. Лиганд CXCL-12 може да делује као моћан хеоматрактант за хематопоезне матичне ћелије чинећи га веома значајним фактором за хематопоезу. У туморским ћелијама, заједно са својим лигандом CXCL-12, рецептор CXCR-4 контролише сигналну трансдукцију преко циљаних молекула који контролишу раст карциномских ћелија дојке, њихову диференцијацију, инвазију, ангиогенезу, миграцију и метастазирање. Активација овог сигналног пута има значај и у резистенцији на ординирајућу терапију за карцином и то тако што директно иницира инвазију карциномских ћелија и ангиогенезу на аутокрини или паракрини начин (Daniel и сар., 2020).

7. Биосинтеза масних киселина

Ћелије карцинома често показују специфичне промене на нивоу метаболичке активности. Метаболичко репрограмирање подразумева повећану продукцију интермедијера неопходних за синтезу протеина, нуклеинских киселина и липида. Неконтролисана пролиферација ћелија која је основна карактеристика неопластичне трансформације, не подразумева само дисрегулацију контроле ћелијског раста и деобе, него и промене на нивоу енергетског метаболизма (Phan и сар., 2014). Прва описана абнормална метаболичка промена је Warburg-ов ефекат. Ова метаболичка алтерација потврђује да ћелије карцинома користе већу концентрацију глукозе за процес гликолизе у поређењу са здравим ћелијама чак и у присуству оптималне концентрације кисеоника. Заиста, аеробна гликолиза постаје главно обележје трансформисаног фенотипа карциномских ћелија, јер им поред енергије обезбеђује и есенцијалне градивне јединице за синтезу макромолекула као што су нуклеинске киселине, протеини, липиди и угљени хидрати (Liberti и Locasale, 2016).

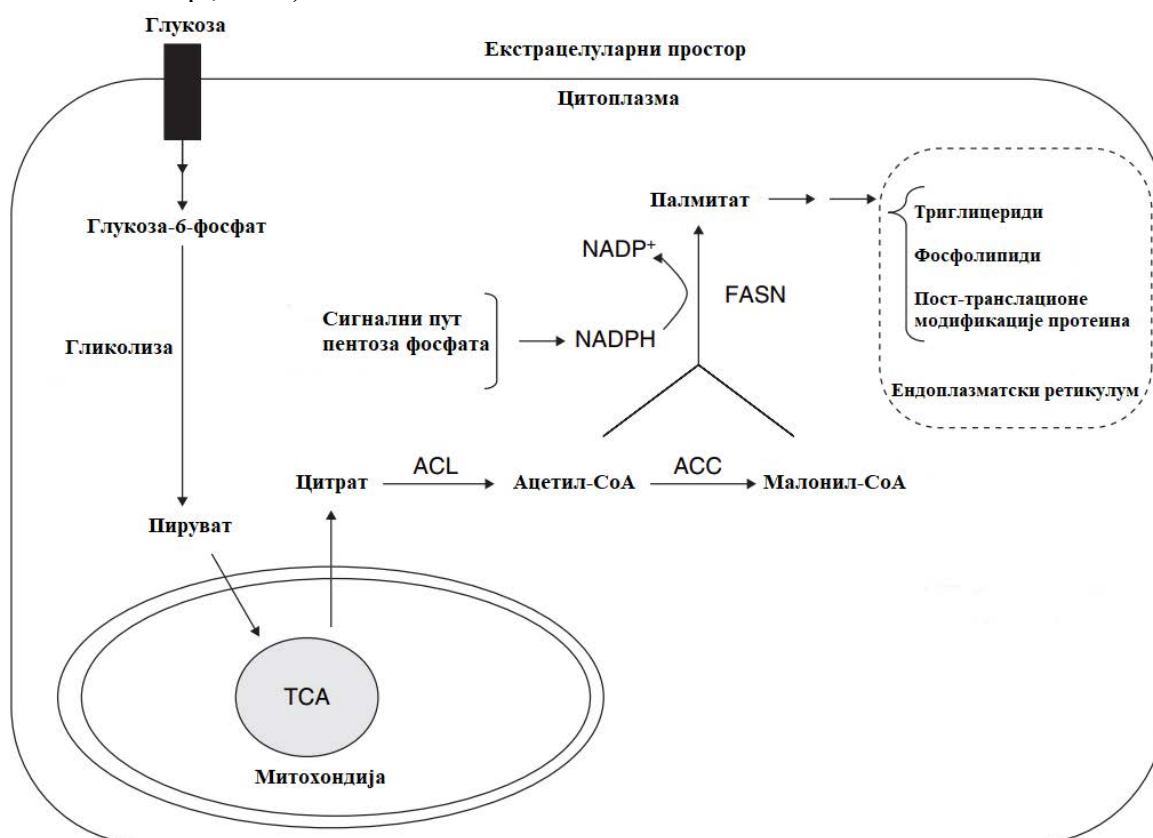
Прва студија која је описала значај синтезе липида за прогресију карцинома је закључила да је овај метаболички процес веома спор да би ћелије карцинома задовољиле своје енергетске потребе, као и да карцином користи искључиво липиде који су већ ендогено синтетисани (Medes и сар., 1953). Опречно мишљење као одговор на ову студију дају Ookhtens и сар., 1984. године који кажу да карциномске ћелије за све своје енергетске потребе *de novo* синтетишу масне киселине (Kuhajda и сар., 1994). Бројне студије су од тада потврдиле значај биосинтезе масних киселина у иницијацији канцерогенезе. Здраве ћелије се снабдевају масним киселинама из егзогених извора и складиште у триглицеридима чувајући на тај начин енергију неопходну за функционисање. Насупрот њима, карциномске ћелије синтетишу сопствене масне киселине, при чему се веома мали проценат чува у триглицеридима, јер карциномске ћелије троше више енергије од здравих за раст и пролиферацију (Röhrig и Schulze, 2016).

Липиди, укључујући стероле, изопреноиде, ацилглицероле и фосфолипиде, су хидрофобни биомолекули. Они су компоненте биолошких мембрана, учествују у енергетском метаболизму и складиштењу енергије, док истовремено имају битне физиолошке улоге као сигнални молекули. Велики проценат липида се синтетише из масних киселина, а то су класе биомолекула које се састоје од угљоводоничних ланаца различите дужине и степена десатурације. Масне киселине су основне градивне јединице хидрофобних репова фосфолипида и гликолипида, који заједно са холестеролом представљају главне структурне компоненте биолошких мембрана (Röhrig и Schulze, 2016). Када се говори о липидима као о сигналним молекулима најпознатији су диацилглицерол и фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфат који настају као одговор на ванћелијске стимулусе. Масне киселине су такође значајна градивна компонента триацилглицерида који се синтетишу и складиште током високе доступности хранљивих материја у ћелијама и служе као енергетске резерве.

Регулација синтезе липида, њихова модификација и деградација су неопходни за одржавање хомеостазе здравих ћелија, док поремећаји ових процеса могу допринети развоју патофизиолошких промена. Већина сложених класа липида је изграђена од масних киселина, па није изненађење да метаболизам липида, посебно биосинтеза масних киселина представља интересантан процес за разумевање и изучавање овог типа енергетског метаболизма и његову улогу у канцерогенези.

7.1. Процес биосинтезе масних киселина

De novo биосинтеза масних киселина је ограничена само на метаболички активна ткива, као што су јетра, масно ткиво и ткиво дојке. У току ембриогенезе, посебно током прве 3 недеље гестацијског развоја повећана је биосинтеза масних киселина. Метаболички интермедијер који је супстрат за биосинтезу масних киселина је ацетил-CoA, пореклом из цитоплазме (Слика 5). У оптималним физиолошким условима здраве ћелије користе пируват, који је пореклом из процеса гликолизе, у ТСА циклусу (Curtie и сар., 2013). У ТСА циклусу се ствара цитрат који се разлаже на ацетил-CoA и оксалацетат помоћу АТР-цитрат лиазе (енгл. *ATP citrate lyase* - ACLY) у цитоплазми. У наредној реакцији се синтетише малонил-CoA уз помоћ ензима ацетил-CoA карбоксилазе (енгл. *Acetyl-CoA Carboxylase* - ACC) (Brownsey и сар., 2006). Управо је овај ензим веома прецизно регулисан фосфорилацијом и алостерном регулацијом. Из хемијске реакције кондензације седам молекула малонил-CoA и једног молекула ацетил-CoA уз помоћ ензима синтетазе масних киселина (енгл. *Fatty Acid Synthase* - FASN) настаје палмитат. Палмитат је прва масна киселина која настаје током биосинтезе масних киселина у ћелијама. Ова масна киселина даље улази у реакције елонгације и десатурације да би настале остале масне киселине различите дужине и степена засићења (Maier и сар., 2008). Стеаринска и олеинска масна киселина се користе за биосинтезу комплексних липида. Тако на пример, олеинска киселина учествује у биосинтези фосфатидинске киселине која је прекурсор за синтезу фосфолипида. Фосфолипиди у зависности од своје хемијске структуре имају улогу сигналних молекула, учествују као градивни молекули у изградњи ћелијске мембране или посредују у синтези различитих класа мембранских липида (Jakobsson и сар., 2006).



Слика 14. Биосинтеза масних киселина у ћелијама. (Слика преузета и модификована из: <https://doi.org/10.1517/13543784.16.11.1817>).

Постоји значајна разлика у начину искоришћавања масних киселина од стране здравих и ћелија карцинома. У јетри и масном ткиву биосинтеза масних киселина у здравим ћелијама се активира као одговор на вишак калоријског уноса. Овако настале масне киселине се првенствено користе даље за синтезу триглицерида и складиштење. Насупрот овој реакцији, масне киселине настале као продукт карциномске ћелије првенство учествују у изградњи фосфолипида који се интегрише у мембранске домene. Масне киселине уопштено а посебно палмитат, имају битне функционалне улоге у ћелијама. Тако на пример, палмитат се може корисити за постранслациону модификацију протеина. Палмитат доприноси повећању хидрофобне природе протеина који учествују у изградњи мембрана и на тај начин олакшава сигнализацију повезану са мембраном. Најпознатији протеину који су претрпели ову модификацију су Ras, Wnt и Hedgehog (Resh, 2006; Kridel и сар., 2007).

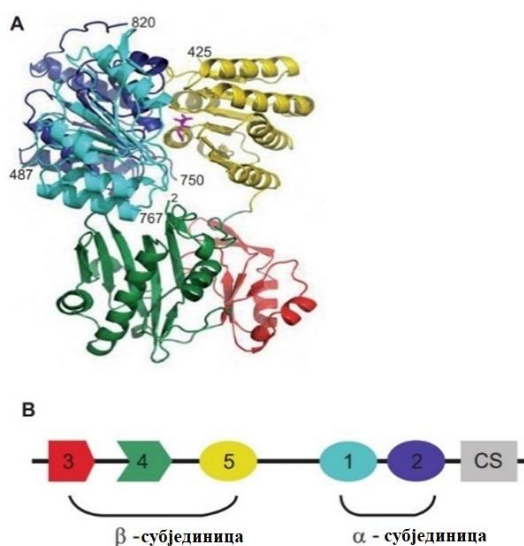
Биосинтеза масних киселина је енергетски веома захтеван процес. На пример, хидролиза АТФ-а је потребна за конверзију ацетил-КоА у малонил-КоА уз помоћ АСС-а, при чему настаје седам молекула АТФ-а за сваки синтетисан палмитат. Поред ове реакције, реакција оксидације 14 молекула NADPH током синтезе FASN-а се врши према следећој шеми: $\text{Ацетил-КоА} + 7 \text{ малонил-КоА} + 14 \text{ NADPH} + 14\text{H}^+ \rightarrow \text{палмитат} + 14 \text{ NADP}^+ + 6\text{H}_2\text{O} + 8 \text{ CoA-SH} + 7\text{CO}_2$. Велика потрошња енергије која се уочава током биосинтезе масних киселина наглашава важност овог метаболичког процеса за преживљавање и пролиферацију ћелија карцинома (Kridel и сар., 2007).

Пошто многе ћелијске функције зависе од концентрације масних киселина и функционалних липида, њихова синтеза мора бити строго регулисана како би се спречила липотоксичност и дисфункција ћелијске мембране. Ова контрола се постиже регулаторним системом позитивне повратне спреге који детектује интрацелуларне нивое холестерола и масних киселина и регулише транскрипцију гена који кодирају липогене ензиме. Ови регулатори припадају фамилији транскрипционих фактора који се називају протеини који везују регулаторне елементе стерола - SREBP (енгл. *Sterol Regulatory Element Binding Proteins*). Активност ових транскрипционих фактора је значајна за одржавање хомеостазе између биосинтезе масних киселина и концентрације липида у ћелијама (Amemiya–Kudo и сар., 2002).

7.2. Регулаторни фактори процеса биосинтезе масних киселина

7.2.1. АТР-цитрат лиаза

АТР-цитрат лиаза - ACLY је хомотетрамер величине 480 Kda који се састоји од 1101 аминокиселинског остатка; члан је суперфамилије ацил-СоА синтазе чији ген се налази на хромозому 17q21.2. Овај тетрамер настаје спајањем N терминалног домена цитрил-СоА синтетазе (енгл. *Citryl-CoA synthetase-CCS*) и С каталитичког домена цитрил-СоА лиазе (енгл. *Citryl-CoA lyase-CCL*). ACLY формира хомотетрамер преко С терминалуса да би се поједноставио процес везивања СоА и биосинтезе ацетил-СоА. АТР-цитрат лиаза је активна само као тетрамер. Састоји се од шест домена, где домен 1 формира СоА-везујуће место, домен 2 је место каталитичке фосфорилације His760, домени 3 и 4 су места везивања АТР-а, домен 5 је место везивања цитрата, а SC (цитрат синтаза) домен чини централно језгро ACLY-а. SC домен је хомолог са цитрат синтазом на С каталитичком домену и одговоран је за катализацију конверзије цитрил-СоА у ОАА и ацетил-СоА (Слика 15). Потврђено је да постоји пет самосталних кристалних структура N-терминалних домена или у комплексу са лигандима као што су цитрат или Mg-ADP. N терминални домен је мономер који самостално не може да катализује биохемијске реакције (Zu и сар., 2012).



Слика 15. АТР цитрат лиаза (енг. *ATP citrate lyase* – ACLY) – А) Комплекс са цитратом; Б) Приказ функционалних домена (Слика преузета и модификована из: <https://doi.org/10.2174/157489212799972954>).

АТР-цитрат лиаза катализује синтезу ацетил-СоА и оксалоацетата из цитрата и коензима А (СоА) уз хидролизу АТР-а до ADP-а и фосфата. Овом реакцијом ацетил-СоА учествује у *de novo* синтези масних киселина као и у транскрипцији и ацетилацији одређених протеина, посебно хистона. Оксалоацетат је супстрат за производњу аспартата, који је неопходан за синтезу нуклеотида и полиамина, а такође одржава оптималан ниво NADPH/H⁺ који одржава редокс хомеостазе. Пошто цитратни супстрат потиче из ТСА циклуса, ACLY повезује метаболизам глукозе са *de novo* синтезом липида, у којој делује као кључни ензим и битна је спрега између екстрацелуларних извора угљеника и активације метаболизма масних киселина (Beckner и сар., 2010; Röhrig и Schulze, 2016).

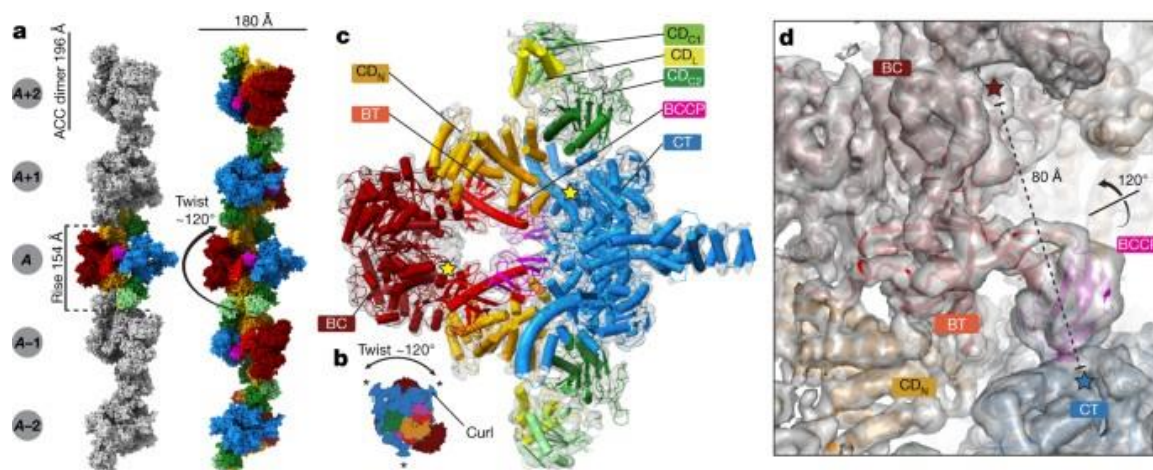
Дистрибуција и функција – С обзиром на улогу ACLY у мрежи ћелијског метаболизма, овај ензим повезује метаболизам глукозе са метаболизмом масних киселина. Већина здравих ћелија користи егзогене липиде за основне енергетске потребе, док ћелије карцинома активирају процес синтезе масних киселина *de novo* јер су њихове енергетске потребе веће. Иницијација активације *de novo* синтезе масних киселина је директно повезана са високом концентрацијом угљених хидрата и ниском концентрацијом масних киселина у ћелијама (Zaidi и сар., 2012). Промене у концентрацији есенцијалних макромолекула активирају гликолитички процес који конвертује глукозу до пирувата. Пируват, као крајњи производ се у највећем проценту излучује из ћелија као лактат. Део насталог пирувата улази у Кребсов циклус и конвертује се у ацетил-СоА помоћу ензимског комплекса пируват дехидрогеназе (Beckner и сар., 2010). Синтеза масних киселина се дешава у цитосолу, али ацетил-СоА не може да се дислоцира са митохондријалне мембране и отпусти ацетил групу која је неопходна за покретање процеса синтезе. Овај проблем заобилази цитрат који се формира од ацетил-СоА преко цитрат синтазе у митохондријама: ацетил група са два угљеника ацетил-СоА се донира оксалоацетату са четири угљеника да би се формирао цитрат са шест угљеника. Када је цитрат присутан у високој концентрацији, транспортује се у цитосол преко трикарбоксилатног транспортера и на тај начин постаје супстрат за ACLY (Chypre и сар., 2012). Даље, ACLY катализује конверзију цитрата у оксалацетат и ацетил-СоА на АТР зависан начин. Оксалоацетат се може користити у процесу глуконеогенезе у јетри или након што се редукује у малат може се вратити у митохондрије. Реакција карбоксилације ацетил-СоА при чему настаје малонил-СоА, је иницијални корак у синтези масних киселина (Zaidi и сар., 2012). АТР-цитрат лиаза је последњи ензим који се активира током процеса гликолизе али истовремено представља и полазну тачку за синтезу масних киселина. С обзиром на двоструку улогу у метаболичким процесима, његова инхибиција би редуковала концентрацију ацетил-СоА и на тај начин зауставила процес синтезе масних киселина који је директно зависан од глукозе. Степен инхибиције овог ензима зависи од процента искоришћавања глукозе и производње лактата у различитим типовима ћелија карцинома. Стога се може закључити да високо метаболички активне ћелије зависе од активности овог ензима. Ћелије карцинома које карактерише висок гликолитички индекс захтевају и високу концентрацију глукозе коју ће касније искористити и за синтезу масних киселина (Wei и сар., 2020).

Регулација – експресија *ACLY* гена и протеина се мења током ћелијског циклуса, у зависности од нивоа експресије регулаторних гена, док ензимска активност ACLY зависи од доступности цитрата, степена фосфорилације и разградње убиквитин лигазама (Icard и сар., 2019). Активност ACLY у великој мери зависи од концентрације цитрата у цитоплазми. Здраве ћелије у процесу аеробне гликолизе стварају мање цитрата него ћелије карцинома, иако је код оба типа ћелија активан метаболизам глукозе и глутамин (Christen и сар., 2016). Активација различитих онкогених сигналних путева изазива поремећај у регулацији и активности SREBP транскрипционог фактора који у оптималним условима регулише експресију ACLY-а (Mullen и сар., 2016). Регулација ACLY-а на транскрипционом нивоу је управо преко SREBP-1 транскрипционог фактора и на тај начин се ствара ацетил-СоА неопходан за синтезу холестерола и активацију синтезе масних киселина (Sato и сар., 2000). АТР-цитрат лиаза се активира и реакцијама фосфорилације и ацетилације, а деградира процесом убиквитинације. Хомеостаза ових процеса омогућава одржавање оптималне ензимске активности ACLY-а током ћелијског циклуса (Kim и сар., 2010).

7.2.2. Ацетил-коензим А карбоксилаза

Ацетил-СоА карбоксилазе - ACC су ензими који катализују реакцију карбоксилације ацетил-СоА за синтезу малонил-СоА, и припадају фамилији биотин зависних карбоксилаза. ACC ензим постоји у две изоформе: ACC1 је кодиран *ACACA* геном (енгл. *Acetyl-CoA carboxylase A*) геном који се налази на хромозому 17q12 и величине 265 kDa, док је ACC2 кодиран *ACACB* геном (енгл. *Acetyl-CoA carboxylase B*) који се налази на хромозому 12q23 и величине је 275 kDa (Abu-Elheiga и сар., 2005). Ацетил-СоА карбоксилаза 1 се налази у цитоплазми и први је ензим који директно учествује у процесу синтезе масних киселина. Ацетил-СоА карбоксилаза 2 се налази на спољашњој мембрани митохондрија, учествује у директној синтези малонил-СоА који инхибира активност карнитин палмитоилтрансферазе 1 (енгл. *Carnitine palmitoyltransferase 1* – CPT1) која даље регулише транспорт масних киселина у митохондрије за накнадну β -оксидацију (Wakil и Abu-Elheiga, 2009).

Ацетил-СоА карбоксилаза садржи пет функционалних домена (Слика 16): домен биотин карбоксилазе (BC), биотин карбоксилни протеин носач (BCCP), домен карбоксил трансферазе (CT), домен интеракције (BT) и некаталитички регион централног домена (CD), (Слика 16) (Tong, 2012). Некаталитички регион централног домена се састоји од четири компоненте: Н-терминални CD_N домен, повезујући DC_L домен и тандем С-терминал CD_{C1} и CD_{C2} домене (Hunkeler и сар., 2016). Реакција ацетил-СоА карбоксилације се одвија у два корака: прва реакција подразумева карбоксилацију BCCP-везане биотинске групе уз потрошњу АТР-а преко BC домена; а у другој реакцији настали карбокси-биотин се преноси у CT домен а карбокси група се преноси на ацетил-СоА (Wei и Tong, 2015).



Слика 16. Приказ функционалних домена ACC (Слика преузета из: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0201-4>).

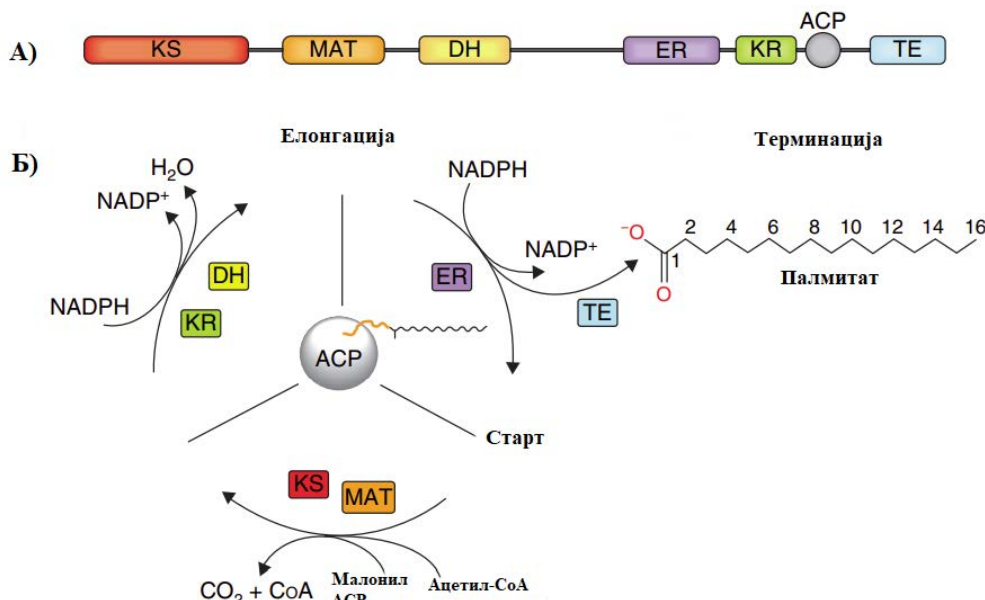
Дистрибуција и функција – ACC1 се углавном експримира у ткивима богатим липидима као што су јетра, масно ткиво и млечне жлезде што је у складу са његовом улогом у липогенези. ACC2 се првенствено експримира у метаболички активним ткивима где се врши β -оксидација масних киселина као што је срчано ткиво и скелетни мишићи (Munday, 2002). ACC1 је цитоплазматски протеин који катализује конверзију ацетил-СоА у малонил-СоА, кога директно у наредној реакцији користи синтетаза масних киселина (FASN) у процесу *de novo* синтезе масних киселина (Abu-Elheiga и сар.,

2005). ACC1 контролише синтезу средњих и дуголанчаних масних киселина које служе као основни градивни макромолекули (Harada и сар., 2007).

Регулација – Активности ACC у ћелијама могу бити транскрипционо и посттранскрипционо регулисане и њихова активност директно зависи од метаболичког стања ћелије. Ниво ензимске активности ACC-а се повећава када у ћелији има довољно хранљивих материја и енергије, са циљем да се вишак хранљивих материја и енергије складишти у облику масних киселина. Када ћелије трпе метаболички стрес, као што је недостатак глукозе или хипоксија, активира се AMPK (енгл. *AMP-activated protein kinase*) који може да фосфорилише остатке ser79 у ACC1. Фосфорилација остатка ser79 блокира формирање ACC1 хомодимера, остављајући ACC1 молекуле као мономере који нису у стању да катализују ацетил-КоА карбоксилацију (Wei и Tong, 2015). Међутим, када се ћелије врате у окружење богато хранљивим материјама и енергијом, фосфорилација ser79 у ACC1 може бити заустављена помоћу протеинске фосфатазе типа 2A (PP2A), омогућавајући реформирање ACC1 хомодимера и заустављање биосинтезе масних киселина (Auger и сар., 2019). Нивои протеина ACC1 и ACC2 се динамички регулишу у ћелијама уз помоћ транскрипционих фактора. SREBP1c је добро проучен пример. *ACACA* ген има два различита места везивања SREBP, која иницирају SREBP1c да започне транскрипцију гена. ChREBP (енгл. *Carbohydrate response element binding protein*) је још један фактор транскрипције који регулише ACC1. Он се везује за регионе промотора и активира транскрипцију *ACACA*, као одговор на исхрану богату угљеним хидратима (Ishii и сар., 2004; Iizuka и Horikawa, 2008).

7.2.3. Синтетаза масних киселина

Синтетаза масних киселина је комплексни хомодимерни ензим величине 552 kDa који регулише биосинтезу дуголанчаних масних киселина. Овај цитосолни ензим катализује синтезу палмитата од ацетил-КоА и малонил-КоА уз присуство NADPH у процесу биосинтезе масних киселина (Ventura и сар., 2015; Fhu и Ali, 2020). Ензим кодиран овим геном представља мултифункционални протеин. Ген за *FASN* се налази на 17 хромозому позицији q25.3. *FASN* протеин је хомодимер величине 273 kDa. Сваки мономер *FASN*-а садржи седам активних домена и постиже своју максималну активност у биохемијским реакцијама везивањем специфичних лиганда за своје функционалне домene. Ген за *FASN* кодира полипептид који садржи седам функционалних домена укључујући и носач (енгл. *Acyl carrier protein* - ACP) који заједно доприносе катализацији биосинтезе масних киселина. Функционални домени *FASN* полипептида су: β -кетоацил синтаза (енгл. *β -Ketoacyl synthase* - KS), ацетил/малонил трансацилаза (енгл. *Acetyl/malonyl-CoA transferase* - AT/MT), β -хидроксиацил дехидратаза (енгл. *β -hydroxyacyl dehydratase* - DH), еноил редуктаза (енгл. *Enoyl Reductase* - ER), β -кетоацил редуктаза (енгл. *β -ketoacyl reductase* - KR), ACP и тиоестеразни домени (енгл. *Thioesterase* - TE) (Слика 17-А) (Fhu и Ali, 2020). Иако, *FASN* мономер садржи све неопходне ензиме потребне за синтезу палмитата, формирање димера је кључно за постизање његове ензимске активности. Молекуларну структуру *FASN*-а чине три главна домена: I домен садржи KS, AT/MT and DH; II домен садржи ER, KR и ACP; а III домен садржи TE. Отприлике четвртина дужине мономерног протеина, лоцираног између домена I и II, коме недостаје каталитичка активност, назива се регионом међудомена и означен је као кључно место за формирање димера (Chirala и Wakil 2004; Kridel и сар., 2007; Fhu и Ali, 2020).



Слика 17. А) Организација FASN домена и Б) Каталитички циклус. Иницијација ове реакције започиње са APC зависним трансфером ацетил- CoA и малонил- CoA на MAT домен (Старт). FASN учествује у седам хемијских реакција које су прецизно координисане и укључују: кондензацију (KS), дехидратацију (β -хидроксиацил дехидратаза) и редукцију (KR, еноил редуктаза) током елонгације. Централни регулатор реакције је ACP и преноси растуће међупроизводе између седам активних места. Овако синтетисана зрела масна киселина са 16 или 18 C атома се ослобађа са растућег ланца уз помоћ TE домена што представља реакцију терминације (Слика преузета и модификована из: <https://doi.org/10.1517/13543784.16.11.1817>).

Дистрибуција и функција – Синтаза масних киселина је есенцијални молекул у процесу биосинтезе масних киселина јер катализује завршну реакцију овог метаболичког процеса и има значајну улогу у промоцији карцинома са липогеним фенотипом као што је карцином дојке. Обзиром да је есенцијални ген овог процеса одговоран је за синтезу мембранских липида, прекурсор је за секундарне молекуле и супстрат за синтезу АТР-а. FASN је растворљив протеин и сматра се да је локализован у цитоплазми. Његова дистрибуција је на највишем нивоу у јетри, масном ткиву и плућима, што су уједно и места његове синтезе. Синтаза масних киселина је неопходна у току ембрионалног развоја за обезбеђивање оптималног енергетског метаболизма приликом брзог раста, док његова инхибиција доводи до стварања патофизиолошких промена у овој фази (Menendez и Lupu, 2007). Занимљив је литературни податак да FASN иако је интрацелуларни протеин, идентификован је у супернатантима ћелија карцинома дојке у *in vitro* условима али и у крви пацијената са карциномом дојке (Wang и сар., 2021). Међутим и даље је нејасна улога екстрацелуларног FASN-а као ни молекуларни механизам његове екскреције из ћелија.

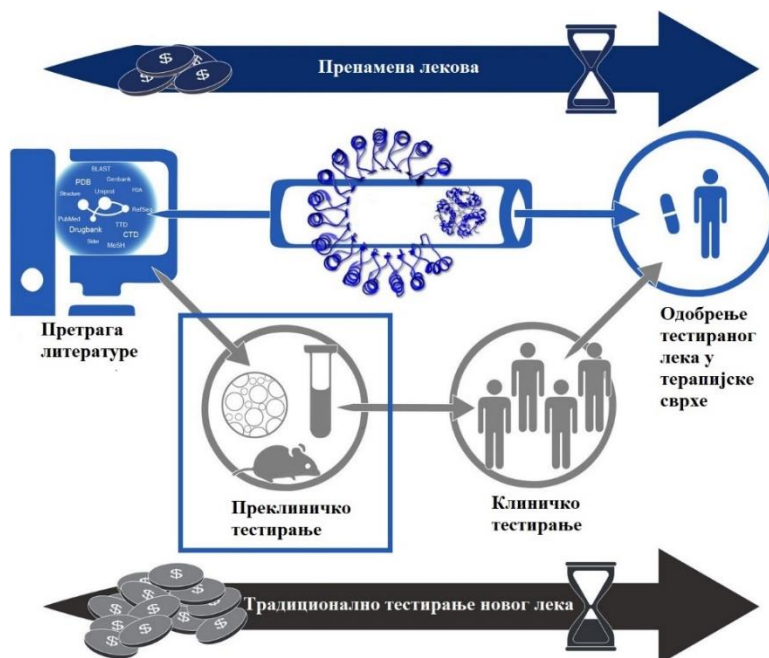
Синтаза масних киселина је веома стабилан протеин који је прекомерно експримиран у различитим типовима карцинома. На ову структурну и функционалну стабилност FASN-а утичу различити типови посттранслационих модификација (убиквитинација, сумоилација, ацетилација), које спречавају његову деградацију. Ови процеси регулације су нарочито истраживани код различитих типова карцинома јер малигне ћелије на овај начин чувају свој липогени фенотип. Тако на пример код карцинома дојке, сумоилација је главни механизам спречавања деградације FASN-а, где UBC9 има главну регулаторну улогу (Floris и сар., 2020).

Регулација – Транскрипција *FASN*-а најчешће је регулисана активацијом одређених фактора. Један од најпознатијих транскрипционих фактора је SREBP (енгл. *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1*). Постоје три изоформе SREBP транскрипционог фактора (SREBP1a, SREBP1c, SREBP2). Главни регулатор процеса биосинтезе масних киселина је SREBP1c, док је SREBP2 одговоран за синтезу холестерола. Активација овог транскрипционог фактора зависи од концентрације масних киселина у ћелији. Обзиром на чињеницу да је *FASN* функционални ензим који је одговоран за синтезу и отпуштање прве есенцијалне масне киселине (палмитинска масна киселина) чијим усложњавањем настају остале, његова активност је регулисана преко овог фактора (Jiang и сар., 2020). Транскрипциони фактор SREBP1c се синтетише као неактивни прекурсор који се налази на мембрани ендоплазматског ретикулума, где је повезан са SCAP протеином (енгл. *SREBP cleavage activating protein*). Када је концентрација стерола ниска, SREBP-SCAP комплекс се транспортује у Голџијев апарат, где се деловањем две протеазе SREBP дислоцира од SCAP протеина. Ово дислоцирање SCAP протеина, ослобађа цитосолни NH2 терминални домен SREBP-а који се везује за ДНК и активира транскрипцију гена укључених у синтезу масних киселина у једру. Сигнални путеви EGFR (енгл. *Epidermal growth factor receptor*) и PI3K/Akt/Mtor регулишу експресију и активацију SREBP транскрипционог фактора како би контролисали транскрипцију *FASN*-а. Када је у цитоплазми ниво стерола оптималан SREBP-Scap комплекс остаје везан за мембрану ендоплазматског ретикулума (Bertolio и сар., 2019; Zhao и сар., 2022).

8. Пренамена лекова за антитуморску терапију

Карцином дојке је други водећи узрок смртности у свету и обзиром на високу стопу морбидитета и морталитета од ове болести, потребно је више пажње посветити откривању иновативних третмана и ефикаснијих лекова у борби против карцинома (Sung и сар., 2021). Испитивање антитуморских лекова подразумева опсежне преклиничке и клиничке студије како би се утврдила безбедност и ефикасност лека са просечним временом трајања студије од 10 - 17 година (Prasad и Mailankody, 2017). Упркос великим финансијским улагањима и опсежним истраживањима мање од 1% тестираних лекова уђе у фазу клиничких испитивања и пласира се на тржиште, стога је неопходно окренути се приступима за брже проналажење и испитивање антитуморских лекова (Kaushik и сар., 2021).

Пренамена лекова (енгл. *Drug repurposing, drug repositioning, reprofiling or redirecting*) је алтернативна стратегија за развој антитуморских лекова, која већ постојеће лекове за третман различитих болести модификује и даје им нову терапијску индикацију. Пренаменски лекови већ имају јасно дефинисане податке у погледу безбедности, токсичности и фармаколошких својства у поређењу са новоиспитиваним потенцијалним лековима. Ови лекови могу брзо да прођу кроз све фазе преклиничких испитивања и пређу на фазу клиничких. Управо из ових разлога је скраћено време развоја лека на 3 до 5 година уз много мање финансијске трошкове (Слика 18). Узимајући у обзир све предности, пренамена лекова може бити добра иновативна стратегија за развој ефикасних антитуморских агенаса (Aggarwal и сар., 2021; Fu и сар., 2022).



Слика 18. Шематски приказ разлике у поступцима тестирања лекова (Слика преузета и модификована из: <https://doi.org/10.1101/2020.12.03.410274>).

За пренамену лекова могу се користити лекови који су повучени из употребе због токсичности када се користе за одговарајућу индикацију а потенцијално испољавају антиканцерогене ефекте у нижим дозама. Антитуморски лекови који нису прошли фазу клиничког испитивања могу се поново испитати у погледу њихових ефекта, и побољшати се њихова антитуморска ефикасност структурним модификацијама, након чега могу изаћи на тржиште за нову терапијску индикацију. Лекови који се већ налазе на тржишту

и које користе пацијенти дужи низ година за лечење различитих метаболичких болести, могу бити додатно испитивани у циљу проналажења нових терапијских индикација (Fu и сар., 2022).

Постоји неколико успешних случајева пренамене лекова који се данас користе у терапији карцинома: први је талидомид, коришћен је за лечење јутарње мучнине током трудноће, али је на крају повучен са тржишта због тератогености. Сада је пренамењен и користи се за рефракторни мултипли мијелом (Dimopoulos и Kastritis, 2018). Недавно се метформин, класични лек против дијабетеса типа II, интензивно проучава због његових ефеката на многе различите врсте карцинома укључујући карцином простате, панкреаса, дојке, јажника и ендометријума (Quinn и сар., 2013).

8.1. Нестандардни медикаменти као потенцијални антитуморски агенси

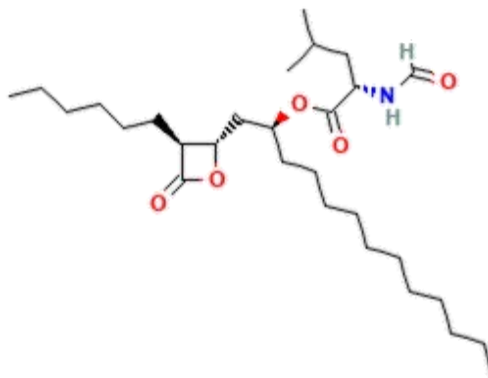
Значај преклиничког тестирања нестандартних медикамената као потенцијалних антитуморских лекова огледа се у развоју лекова са смањеним нежељеним ефектима по пацијента и високом терапијском ефикасношћу.

Стандардни хемотерапеутици који су одобрени од стране Управе за храну и лекове (енгл. *U.S. Food and Drug Administration* - FDA), поред тога што су успешни у лечењу и контроли различитих малигнитета, имају и веома озбиљне последице по здравље пацијента као што су: умор, губитак апетита, мука, гађење, повраћање, дијареја, повишена телесна температура, анемија, тромбоцитопенија, губитак косе, хормонски дисбаланс, подложност инфекцијама. Пренамена лекова је овде нашла веома велику примену јер је пожељно бирати медикаменте који не остављају озбиљне последице на здравље пацијената након њихове примене а имају значајан потенцијал да буду тестирани као антитуморски агенси. Бирање адекватног медикамента за *in vitro* тестирање се најпре заснива да изучавању њихових биохемијских карактеристика, механизма деловања, затим упознавање са фармакокинетиком и фармакодинамиком. Биохемијске особине одређеног лека као и модулација активности различитих сигналних путева у здравим ћелијама при чему ти лекови постижу највишу терапијску ефикасност је од пресудног значаја при њиховом тестирању на модел системима карцинома.

У оквиру ове докторске дисертације са аспекта испитивања потенцијалног антитуморског ефекта у *in vitro* условима одбрани су Орлистат и Симвастатин. Већ је напоменуто у претходним поглављима да су ово медикаменти који се користе у лечењу најпознатијих метаболичких болести, гојазности и хиперхолестеролемије, које могу бити повезане са настанком карцинома дојке. Обзиром да оба лека утичу на модулацију процеса биосинтезе масних киселина у здравим ћелијама, одлучено је да се прати њихова активност на модел систему ћелија карцинома дојке. Значај резултата ове дисертације се огледа у томе да је по први пут испитан инхибиторни ефекат Орлистата и Симвастатина на одређеним кључним генима и протеинима који су укључени у процес биосинтезе масних киселина и ангиогенезе, при чему је додатно објашњен њихов механизам антитуморског деловања.

8.1.1. Орлистат

Орлистат ((S)-2 formylamino-4 methyl-pentanoic acid (S)-1- [[(2S, 3S) -3-hexyl-4-oxo-2-oxetanyl]methyl]-docdecyl ester) је инхибитор липазе панкреаса и желуца који смањује апсорпцију масти у танком цреву за 30%. Хемијска формула овог једињења је $C_{29}H_{53}NO_5$ а молекулска тежина је 495.735 g/mol (Слика 19). Орлистат такође познат као тетрахидролипстатин, је засићени дериват липстатина, снажног природног инхибитора панкреасних липаза изолованог из бактерије *Streptomyces toxytricini* (Bansal и Khalili, 2023).



Слика 19. Хемијска структура Орлистата (Слика преузета из: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Orlistat>).

Орлистат је први од неколико одобрених лекова од стране FDA за гојазност и један од лекова који се интензивно испитује у клиничким студијама за лечење коморбидитета који су иницирани гојазношћу. Његово дејство је локализовано на лумен желуца и танког црева. Орлистат инхибира активност липазе путем ковалентног везивања за активно место серина у овим ензимима спречавајући хидролизу триацлиглицерида у слободне масне киселине и моноглицериде који се апсорбују. На овај начин долази до инактивације ових ензима за чак 91.4%. Несварени триглицериди се код ових пацијената излучују фецесом након примене Орлистата. Уколико се приликом коришћења Орлистата практикује уравнотежена исхрана, могуће је изазвати калоријски дефицит од ~ 200 калорија током дана (McClendon и сар., 2009).

Осим редукације телесне масе код гојазних особа и адолесцената, Орлистат смањује значајно и концентрацију лептина, хормона који је задужен за регулацију апетита. Постоји значајна корелација између концентрације лептина и телесне тежине пацијената, при чему се концентрација овог хормона драстично повећава код гојазних особа. Ниво лептина се смањује пропорционално смањењу телесне тежине посебно код пацијената који су узимали 120 mg Орлистата три пута дневно. Пошто Орлистат спречава апсорпцију масти из хране, постоји могућност да се апсорпција витамина растворљивих у мастима драстично снизи након употребе овог лека, због чега се пацијентима саветује да узимају мултивитаминске суплементе. Међутим неколико веома значајних студија је доказало да Орлистат не утиче на апсорпцију витамина Д, Е, и β-каротена. Концентрација ових витамина је била или повишена или у референтним вредностима након мерења концентрације код ових пацијената. Концентрација есенцијалних минерала који омогућавају физиолошко функционисање коштано-зглобног система (калцијум, магнезијум, цинк, гвожђе и фосфор) код особа које пију овај лек је такође била у референтним вредностима (Henness и сар., 2006).

Фармакокинетика Орлистата – Апсорпција Орлистата је минимална код гојазних пацијената, па примењене високе дозе лека (800 mg) не повећавају

концентрацију овог лека у плазми преко 5 ng/ml. Студије на анималним моделима доказују да је биорасположивост Орлистата мања од 1.9 %, при чему се не акумулира у ткивима. *In vitro* студије су показале да је > 99% апсорбованог Орлистата везано за протеине плазме посебно албумине и липопротеине, чинећи биорасположивост овог лека у слободном облику на минималној концентрацији у серуму. Апсорпција Орлистата је минимална и код здравих добровољаца и код одраслих гојазних пацијената. Укупно се излучује 83% овог лека, при чему се може закључити да је његов метаболизам баш као и акумулација минималан. Главни метаболити Орлистата су М1 (продукт хидролизе матичног лактонског прстена) и М3 (производ накнадног уклањања Н-формил леуцина бочни ланац М1). Ови метаболити се сматрају фармаколошки инертним због цепања лактонског прстеина. М1 и М3 имају отворени бета–лактонски прстен и самим тим слабу могућност инхибиције липаза. С обзиром на ниску инхибиторну активност и ниску концентрацију у плазми у терапијским дозама (просечно 26 ng/ml, односно 108 ng/ml), ови метаболити се не сматрају значајним. Главни пут елиминисања Орлистата је преко фецеса (~ 97%), док се остатак односи на елиминацију путем бубрега односно урина. Укупно време излучивања лека је 3 – 5 дана, а полуживот апсорбованог лека је 1 – 2 h (Hvizdos и Markham, 1999; Henness и Perry, 2006). Интеракције лекова представљају квалитативно односно квантитативно мењање деловања једног лека другим леком при њиховој истовременој примени. Не постоји фармакокинетичка или фармакодинамичка интеракција са лековима из групе хиполипидемика како што је симвастатин и аторвастатин; антидијабетика (метформин); антихипертензива (лосартан); антикоагулансима (варфарин); и антидепресивима (амитриптилин, флуоксетин) (Bansal и Khalili, 2023).

Механизам антитуморског деловања Орлистата – Једна од значајнијих алтерација по коме се препознаје малигни фенотип карциномских ћелија је и аберантна биосинтеза масних киселина. Овај процес је постао главно метаболичко обележје различитих типова карцинома, посебно због чињенице да се масне киселине код карцинома синтетишу *de novo* (Koundouros и Pouligiannis, 2020). Посебну пажњу научника привукао је FASN као најпознатији ензим овог сигналног пута, јер је прекомерна протеинска експресија овог параметра детектована код различитих типова карцинома: простате, дојке, колона, оваријума, ендометријума, плућа, меланома, ретинобластома и саркома (Fhu и Ali, 2020). Ниво експресије FASN-а је примарно регулисан на транскрипционом нивоу након активације онкогена, губитка тумор супресор гена или након стимулације фактора раста. Код неких типова карцинома, као што је карцином простате, FASN може бити регулисан и на пост-транслационом нивоу (Kuhajda и сар., 2006).

Због вишеструких улога које FASN има у ћелијама карцинома, сматра се да је веома значајна мета у антитуморској терапији. Наиме, све је више научних публикација које се баве проналажењем стабилног FASN инхибитора који ће бити од користи у антитуморској терапији. Инхибитори FASN-а могу се поделити у две групе: прва група инхибира претходно описан домен β -кетоацил синтазе, док друга група инхибира тиостеразни домен FASN-а. Другој групи инхибитора FASN-а припада Орлистат, који првобитно није био дизајниран и одобрен за клинчку примену да постане FASN инхибитор већ у сврху редукције прекомерне телесне тежине код гојазних пацијената (Kridel и сар., 2007).

Поред примарне улоге у инхибицији активности липазе панкреаса у гастроинтестиналном тракту и редукције телесне тежине, Орлистат инхибира активност ТЕ домен FASN-а који је одговоран за ослобађање палмитинске киселине. Конкретно, када се посматра инхибиторна активност Орлистата на молекуларном нивоу, Орлистат делује као доминантни инхибитор активности серин хидролазе унутар ТЕ домена FASN-

а (Lupu, и Menendez, 2006). Активни део Орлистата је представљен β -лактонским прстеном који уствари подлеже нуклеофилном нападу на серин у оквиру ТЕ домена (Слика 20) (Fako и сар., 2014).

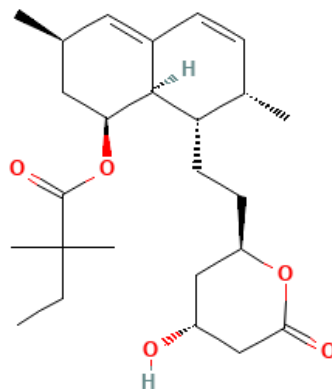
Антитуморски ефекат Орлистата се примарно заснива на инхибицији FASN-а при чему се повећава осетљивост ћелија карцинома на дејство овог лека што последично изазива стрес у ендоплазматском ретикулуму, апоптозу, заустављање ћелијског циклуса у G1/S фази, а такође инхибира ангиогенезу и пролиферацију ендотелних ћелија (Fako и сар., 2014). Доказ за ову тврдњу је претходно изведена докинг анализа која је показала да се Орлистат везује управо у месту које је предвиђен за везивање лиганда у ТЕ домену, што заиста показује да је Орлистат присутан у активном домену FASN-а где има доминанту улогу инхибитора и испољава значајан антитуморски ефекат (Pemble и сар., 2007). Обзиром да су повишена телесна тежина и гојазност једни од главних фактора ризика за настанак карцинома дојке, потрага за стабилним инхибитором који повезује ове две метаболичке алтерације је од изузетног значаја за успешно лечење овог малигнитета.



Слика 20. Каталитички механизам хидролизе Орлистата помоћу ТЕ домена FASN-а. Активно место Ser2308 ТЕ домена врши нуклеофилни напад на C1 угљеник β -лактонског дела Орлистата да би формирао ковалентну везу између Ser2308 и Орлистата. Орлистат затим ступа у реакцију хидролизације и инактивира се помоћу ТЕ домена. (Слика преузета и модификована са: <https://doi.org/10.1021/cs500956m>).

8.1.2. Симвастатин

Симвастатин ((3R,5R)-7-[(1S,2S,6R,8S,8aR)-8-(2,2-dimethylbutanoyloxy)-2,6-dimethyl-1,2,6,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanoic acid) је синтетички добијен процесом ферментације из гљиве *Aspergillus terreus*. Хемијска хормула овог лека је $C_{25}H_{38}O_5$ а молекулска тежина 418.56 g/mol (Слика 21).



Слика 21. Хемијска структура Симвастатина (Слика преузета са: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Simvastatin>).

Овај медикамент припада класи статина, који се користе за смањење ризика од настанка кардиоваскуларних болести као и код различитих типова дислипидемија а његов терапијски ефекат се заснива на смањењу нивоа циркулишућих липида директним инхибирањем ендogene синтезе холестерола у јетри. Биохемијски механизам деловања свих статина па и Симвастатина заснива се на инхибицији ензима HMG-CoA редуктазе (енгл. *3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase*), која катализује конверзију HMG-CoA у мевалонску киселину. Мевалонска киселина је неопходна за синтезу веома значајних једињења који су укључени у метаболизам и транспорт липида укључујући холестерол, LDL и VLDL (Moghadasian и сар., 1999). Симвастатин је први лек избора у лечењу хиперлипидемија јер смањује нивое циркулишућег холестерола, LDL-C, аполипоротеина Б и триглицерида а истовремено повећава концентрацију HDL-C. Инхибиција аполипротеина Б помоћу Симвастатина блокира синтезу и секрецију сложених комплекса липид-протеин који су иначе богати триглицеридима (Anderson и сар., 2016; Grundy и Stone, 2019).

Фармакокинетика Симвастатина – Симвастатин се кристи у терапији лечења дислипидемија у облуку таблета са тренутним ослобађањем активних супстанци. На проценат апсорпције лека из танког и дебелог црева утиче прописана доза, брзина растварања, метаболизам активне супстанце у лумену црева као и ефективна пермеабилност кроз слузокожу црева. Лекови улазе у ентероците који садрже различите класе ензима који активно учествују у метаболизму лека. Активност ових ензима је најинтензивнија у танком цреву. Ентероцити су карактеристични по томе што садрже скоро све типове различитих ензимских система за метаболизам лекова у јетри. Постоје две класе ензима у слузокожи танког црева: дигестивни ензими и ензими за биотрансформацију ксенобиотика. Најзаступљенији ензими за биотрансформацију ксенобиотика су изоензими CYP3A4 и CYP3A5 који воде порекло од цитохрома P450 (Lennernäs и Fager, 1997; Basniwal и Jain, 2012). Симвастатин се апсорбује из гастроинтестиналног тракта и хидролизује у форму активне β-хидрокси киселине. Овај лек је заправо супстрат за цитохром P450 и изоензим CYP3A4 при чему се метаболише

у јетри, где је његово примарно место деловања. Симвастатин као и његов метаболит β -хидрокси киселина се везују за протеине плазме. Примарно место екскреције Симвастатина је преко фецеса, док се само 10-15% излучује преко урина, углавном у свом неактивном облику. Због већ описаног начина метаболизма Симвастатин може да ступи у интеракције са осталим лековима који инхибирају активност ових ензима а то су циклоспорин, итраконазол, еритромицин, кларитромицин, ХИВ-протеазни инхибитори, амјодарон и верапамил. Због тога што ови лекови могу да итерагују са Симвастатином и изазову озбиљне нежељене ефекте саветује се да се избегавају у терпији, да се кристи адекватна алтернатива или уколико није могуће наћи алтернативу неопходно је константно пратити пацијента приликом узимања терапије (Basniwal и Jain, 2012).

Механизам антитуморског деловања Симвастатина – као што је већ напоменуто, статини су лекови који се користе у лечењу различитих метаболичких болести а посебно дислипидемија. Међутим, све је више научних радова који се баве испитивањем антитуморске активности ове групе лекова, а посебно Симвастатина. Према досадашњим сазнањима, Симвастатин има веома значајан биолошки ефекат на пролиферацију, миграцију, индукцију апоптозе, инфламаторни и оксидативни стрес у различитим типовима ћелија карцинома. Занимљив је податак да Симвастатин испољава значајнији антитуморски ефекат на агресивним метастатским типовима карцинома у поређењу са карциномима који имају нижи агресивни потенцијал. Узимајући и обзир све наведене литературне податке, још увек нема јасних објашњења на који начин и модулацијом којих сигналних путева Симвастатин остварује овакав антитуморски ефекат (Duarte и сар., 2021).

Механизам антитуморског деловања Симвастатина заснива се на компететивној инхибицији HMGCR редуктазе који је кључни ензим са синтезу холестерола у ћелијама. У здравим ћелијама концентрација холестерола се одржава на на оптималном нивоу помоћу регулаторног SREBP транскрипционог фактора механизмом повратне спреге. Активација овог транскрипционог фактора у здравим ћелијама доводи до смањења концентрације холестерола. Међутим у ћелијама карцинома овај начин регулације SREBP-а је дисфункционалан што ћелије карцинома чини осетљивим на инхибицију HMGCR (Mayengbam и сар., 2021). Симвастатин се везује директно за HMGCR редуктазу и на тај начин блокира стварање мевалонатне киселине, што директно утиче на смањење концентрације интрацелуларног холестерола (Beckwitt и сар., 2018). Сигнални пут мелвалонатне киселине подразумева конверзију ацетил-КоА у холестерол и нестеролне изопреноиде који имају веома битне улоге у расту и преживљавању ћелија. Ефекат Симвастатина на овај сигнални пут огледа се у директном смањењу синтезе мевалоната што резултира инхибирање протеинске експресије Ras, Rho, и c-Myc. Као последица инхибиције ових протеина, смањује се пролиферација и миграција туморских ћелија. Следећи механизам антитуморског деловања Симвастатина заснива се на директној инхибицији MMP-9, већ описаног протеина, који је одговоран за миграцију, ангиогенезу и метастазирање карциномских ћелија. Што се тиче процеса ангиогенезе, Симвастатин делује тако што смањује активност TNF- α (енгл. *Tumor Necrosis Factor Alpha*), а проапоптотски ефекат постиже активацијом каспазе-3 и 9 (Duarte и сар., 2021). Постоје литературни подаци који говоре да је регулација активности рецептора за одређене факторе раста у одређеним туморским ћелијама, као што су ћелије карцинома дојке, директно зависна од активације сигналних путева који регулишу синтезу холестерола. Управо из овог разлога статини, посебно Симвастатин, могу бити потенцијални агенси за превенцију и терапију карцинома дојке (Zhong и сар., 2015). Код карцинома дојке често је повећана експресија ензима који су регулатори у сигналном путу синтезе мевалоната, међутим иако статини инхибирају појединачне сигналне молекуле овог пута, механизам његовог антитуморског деловања и даље остаје непознат (Joharatnam-Hogan и сар., 2021).

9. Медицинске биљке у антитуморској терапији

Биљке заузимају веома важну улогу у антитуморској терапији. Hartwell је у својим публикацијама описао преко 3000 биљних врста са антитуморским својствима. Током 1950–их година почела су интензивна испитивања биљака са циљем идентификације и синтезе нових природних лекова који би могли да помогну у антитуморској терапији. Данас, преко 60% доступних лекова на тржишту је управо биљног порекла. Лековита својства биљака потичу због присуства секундарних метаболита (Kuruppi и сар., 2019). Секундарни метаболити су мали органски молекули који нису неопходни за раст и развој биљака, али имају веома важне секундарне улоге у одбрани биљака од биљоједа, биотичког и абиотичког стреса, инхибицији раста конкурентних биљака, бактеријских и гљивичних патогена (Teoh, 2015).

Секундарни метаболити се могу идентификовати у цветовима, семену, стаблу, кори, плоду и листу биљака. Најзначајнији секундарни метаболити биљака су флавоноиди, феноли, терпеноиди, алкалоиди и једињења која садрже сумпор (Siddiqui и сар., 2022). Ови секундарни метаболити самостално или у комбинацији са осталим једињењима имају веома значајне фармаколошке ефекте: антидијабетичке, антимикробне, имуномодулаторне, антиоксидативне, хепатопротективне, антихипертензивне, антитуморске и многе друге (Bhat, 2022). Антитуморски ефекат ових метаболита огледа се у инхибирању различитих сигналних путева и ензима који су активирани код карцинома и стимулишу раст, пролиферацију, инвазију и метастазирање. Најпознатији лекови на биљној бази који се данас користе у терапији карцинома су винка алкалоиди (винбластин, винкристин и виндезин), епиподофилотоксини (етопозид и тенипозид), таксани (паклитаксел и доцетаксел) и деривати камптотецина (камптотексин и иринотекан). Биљке и даље имају огроман потенцијал у преклиничком испитивању и синтези нових антитуморских лекова јер су као такве природан извор биоактивних једињења са важним хемопротективним својствима (Desai и сар., 2008).

Последњих неколико година је доказано да хемотерапија која се ослања на употребу природних једињења побољшава терапијску ефикасност стандардних антинеопластичних лекова. Природна биљна једињења са снажним антитуморском активношћу и минималном токсичношћу на здравим ћелијама у комбинацији са хемијским хемотерапеутицима смањују проценат нежељених ефеката. Међу предностима употребе комбинованих третмана издваја се синергизам који може повећати искористљивост и ефикасност лека као и смањење дозе, избегавање токсичности и резистенције на лекове. Због бројних терапијских предности, комбиновани третман се нашироко користи и постала је главна опција за лечење карцинома. Многа преклиничка испитивања су доказала да природна једињења делују селективно и то само на карциномске ћелије (Pezzani и сар., 2019).

9.1. *Ocimum minimum* L.

Породица Lamiaceae је једна од најпознатијих породица лековитих ароматичних биљака. Садржи око 236 родова и више од 6000 врста, а најпознатији родови су *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Plectranthus*, *Nyctis*, *Ocimum*, *Teucrium*, *Vitex*, *Thymus*, and *Nepeta*. Ову породицу биљака одликује велика разноликост и космополитска дистрибуција. Врсте породице Lamiaceae су лако препознатљиве по четвртастим стаблима, наизменичним листовима, док су цветови зигоморфни са по пет спојених латица и чашица, обично двополни (Carović-Stanko и сар., 2016).

Род *Ocimum* чине најпознатије лековите биљке, са око 64 врсте ароматичних биљака које могу бити једногодишње или вишегодишње. Биолошка и фармаколошка активност врста овог рода се заснива на антимикробном, антиинфламаторном, хепатопротективном, хиполипидемијском, атихипертензивном, антикоагулатном ефекту због чега се већ годинама користе у народној медицини за лечење различитих метаболичких болести. Врсте овог рода су богате разноврсним секундарним метаболитима као што су алкалоиди, сапонини, флавоноиди, гликозиди, танини и феноли који доприносе широком спектру фармаколошких ефеката (Dharsono и сар., 2022).

Један од важних представника рода *Ocimum* је врста *Ocimum minimum* L., (*O. minimum*) познат и под називом ситнолисни босиљак. Морфолошки посматрано, ова биљка је жбунаста, висине од 30 – 40 cm, са ситним зеленим листовима, док су цветови бели са зеленом чашицом и на врху стабљике образују цвасти (Jakovljević, 2018) (Слика 22). *Ocimum minimum* се дуго користи у народној медицини за уклањање симптома респираторних инфекција, гастроинтестиналних тегоба а поседује диуретичка, антипиретичка, хиполипидемијска и антибактеријска својства. У терапијске сврхе се најчешће користи у виду чаја, док се за уклањање симптома респираторних инфекција користи у виду инхалација (Bilal и сар., 2012).



Слика 22. *Ocimum minimum* L. – ситнолисни босиљак (Слика преузета са: <https://herbgarden.co.za/mountainherb/herbinfo.php?id=521>)

У превенцији настанка различитих метаболичких болести као што су гојазност, хиперхолистериемија и канцер *O. minimum* заузима веома важно место. Ова биљка различитим механизмима може да утиче на губитак тежине код гојазних особа: повећава ниво лептина, делује хиполипидемијски и хипогликемијски, утиче на метаболизам масти и на ове начине смањује апетит и доводи до калоријског дефицита и редукције телесне масе. С обзиром да је један од главних фактора ризика за настанак карцинома дојке

гојазност, није изненађујуће да ова биљка има позитиван ефекат на свеукупно стање пацијента и битну улогу у превенцији настанка ове болести (Sun и сар., 2021).

Увидом у литературу, све је више података о антитуморском ефекту *O. minimum* на различитим модел системима карцинома, али још увек није јасан тачан механизам његовог деловања. Ова биљка је јако богата биоактивним једињењима која детерминишу њену фармаколошку и антитуморску активност па стога захтева опсежнија испитивања на конкретним сигналним путевима који су укључени у иницијацију и прогресију карцинома дојке. Готово да у литератури нема података који се тичу модулације биосинетезе масних киселина и ангиогенезе код карцинома након примене третмана са *O. minimum* на ћелијским линијама карцинома.

10. Машинско учење у биомедицинским наукама: иновативни приступи и перспективе

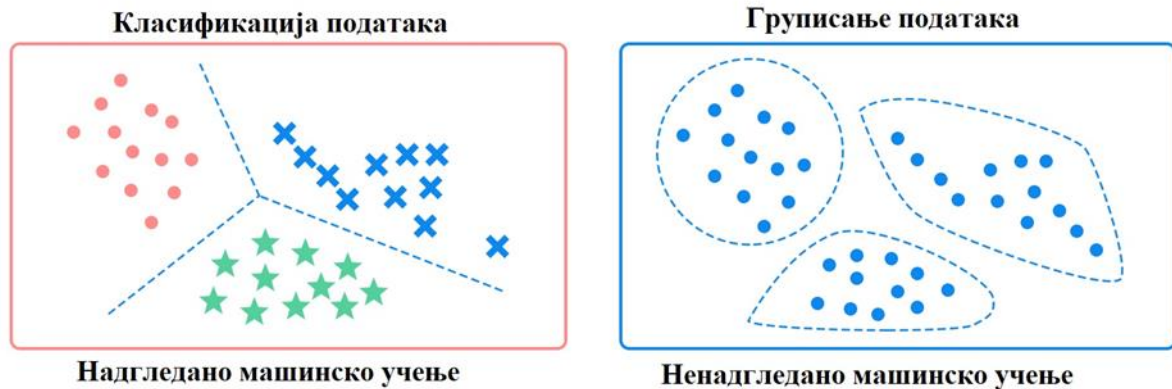
Машинско учење (енгл. *Machine learning*) је процес истраживања, анализе и односа између одређене групе података коришћењем различитих аналитичких техника. Ове технике укључују креирање модела из ког произлази резултат који може постати корисна информација у биомедицинским истраживањима. Успостављањем и дефинисањем нових медицинских база дошло је и до креирања огромног броја клиничких података (Harbola и сар., 2020). Успостављање методологије за управљањем велике количине хетерогених података постао је главни приоритет истраживања у биомедицинским наукама. Подаци који су добијени у биомедицинским истраживањима више нису ограничени само на нумеричке или описне, већ подразумевају интеграцију различитих типова мултимедијалних података као што су слике, аудио и видео подаци (Shu и Ye, 2023).

Машинско учење је нашло велику примену и у идентификацији и анализирању тумор маркера. Молекуларни маркери могу побољшати дијагностичку и прогностичку процену и помоћи лекарима приликом одређивања адекватног терапијског протокола за сваког пацијента понаособ. На овај начин се постиже индивидуални приступ у постављању дијагозе, лечењу и праћењу сваког пацијента чему тежи модерна онкологија (Mitra и сар., 2014; Cvetković, 2017; Zhu и сар., 2018; Qu и сар., 2018; Wen и сар., 2019; Lai и сар., 2020). Из перспективе ове проблематике, машинско учење нуди нове и ефикасне начине коришћења података и алгоритама. Алгоритми машинског учења могу да анализирају велике количине клиничко-патолошких и биолошких података који описују одређени карцином, чиме се аутоматизује и побољшава ефикасност и тачност скрининга тумор маркера. На овај начин се селекују најважније карактеристике које ће се користити за креирање одређених предиктивних модела, као и успостављање и дефинисање релације између тумор маркера и типа карцинома (Fu и сар., 2024). Штавише, оптимизован алгоритам машинског учења, који прикупља и са прецизношћу обрађује овакве типове података, може олакшати персонализован скрининг тумор маркера анализирањем индивидуалног генома и профила експресије циљаних параметара. Стога, машинско учење представља веома моћан алат у биомедицинским истраживањима који лекари и истраживачи могу да користе за боље разумевање и побољшање дијагностичких протокола (Jian и сар., 2021; Fu и сар., 2024).

Технике машинског учења се могу поделити на две категорије: надгледано и ненадгледано машинско учење (Слика 23). *Ненадгледано машинско учење* се односи на технику која није одређена неком променљивом или ознаком класе. Код овог типа машинског учења не креира се модел или хипотеза пре анализе. Алгоритам се примењује директно на податке и добијени резултати се одмах тумаче и прави се модел. На основу свега наведеног, ненадгледано машинско учење се користи за дефинисање класа података без претходног додељивања класе. Груписање (енгл. *Clustering*) је једна од највише коришћених метода ненадгледног машинског учења (Greener и сар., 2022).

Насупрот изнетом, код *надгледаног машинског учења* модел или хипотеза се креирају пре саме анализе. Циљ креирања модела коришћењем техника надгледаног учења је да се предвиди исход или категорија од интереса. Примена надгледаног учења је огромна у биомедицинским истраживањима. Алгоритам са надгледаним учењем покушава да објасни како одређене карактеристике утичу на припадност дефинисаној класи. Постоји веома велики број алгоритама који припадају надгледаном машинском учењу а највећу примену у биомедицинским истраживањима имају: Логистичка

регресија, Стабло одлучивања, Случајна шума, Наивни Бајес, Метода потпорних вектора и К најближих суседа (Webb, 2018).



Слика 23. Схематски приказ разлика између основних техника машинског учења (Слика преузета и модификована из: <https://analystprep.com/study-notes/cfa-level-2/quantitative-method/supervised-machine-learning-unsupervised-machine-learning-deep-learning/>).

Логистичка регресија (енгл. *Logistic Regression*) је једна од највише коришћених алгоритама надгледаног машинског учења. Овај алгоритам се користи за предвиђање категоријске зависне променљиве коришћењем скупа независних променљивих. Логистичка регресија је значајан алгоритам машинског учења који има могућност да обезбеди вероватноћу и класификује нове податке користећи континуиране и дискретне скупове података. Користи се за класификацију запажања користећи различите скупове података и уједно одређује најефикасније варијабле које се користе за класификацију. Постоје три типа логистичке регресије које се могу применити у биомедицинским истраживањима (Loh, 2023):

1. Бинарна логистичка регресија – зависна променљива је бинарна, односно може припадати једној или другој дефинисаној класи.
2. Номинална логистичка регресија – зависну променљиву описују три или више категорија које међусобно не могу да се упореде.
3. Ординална логистичка регресија – зависна променљива у овом случају има три или више категорија које се могу упоређивати и рангирати.

Стабло одлучивања (енгл. *Decision tree*) је алгоритам који припада надгледаном машинском учењу који може да се користи за проблеме класификације и регресије. Класификација се податке када је излаз дискретан, а регресиони модел се користи када је излаз података континуиран. Стабло одлучивања је дијаграм који представља сва могућа решења за одређени проблем заснован на одређеним условима (Charbuty и Abdulazeez, 2021). Овај алгоритам се карактерише структуром стабла при чему га следећи појмови описују:

1. Раздвајање – процес разлагања чвора на два или више подчворова;
2. Чвор одлуке – овај чвор се разлаже на подчворове и назива се чвор одлуке;
3. Чвор листа – овај чвор се не разлаже и представља предикцију коју је стабло одлучивања одредило;
4. Прунинг – уклањање подчворова;

5. Грана/подстабло – представља поскуп целог стабла;
6. Чвор потомака и чвор родитеља – чвор који се дели у подчворове је родитељски чвор, а подчворови су чворови потомака тог родитељског чвора.

Случајне шуме (енгл. *Random forest*) представљају надгледани класификациони алгоритам машинског учења. Може се користити и за класификацију и за регресију. Такође је најфлексибилнији и најлакши алгоритам за коришћење. Назив овог алгоритма потиче из чињенице да се модел састоји од мноштва стабала одлучивања, од којих свако врши предвиђање на неком улазном податку. Резултати предвиђања свих стабала се прикупљају и методом гласања врши се избор коначне одлуке. Шума се састоји од стабла одлучивања. Каже се да што више стабла има, то је шума снажнија. Случајне шуме креирају стабла одлучивања на насумично одабраним узорцима података, добијају предвиђање од сваког стабла и бирају најбоље решење путем гласања. Такође пружа прилично добар показатељ важности функције (Ren и сар., 2017).

Алгоритам K најближих суседа (енгл. *K-Nearest Neighbor* – K -NN) је један од најједноставнијих алгоритама машинског учења заснованог на техници надгледаног учења. K -NN алгоритам претпоставља сличност између новог података и доступних података и ставља нови случај у категорију која је најсличнија доступним категоријама. K -NN алгоритам чува све доступне податке и класификује нову тачку података на основу сличности. То значи да када се појаве нови подаци онда се лако могу класификовати у категорију коришћењем K -NN алгоритма. K -NN алгоритам се може користити за регресију као и за класификацију, али се углавном користи за проблеме класификације. K -NN је непараметарски алгоритам, што значи да не прави никакве претпоставке о основним подацима. K -NN алгоритам у фази обуке само чува скуп података и када добије нове податке, онда те податке класификује у категорију која је много слична новим подацима (Zhang, 2016).

Метода потпорних вектора (енгл. *Support Vector Machine* – *SVM*) је један од најпопуларнијих алгоритама за надгледано учење, који се користи за проблеме класификације и регресије. Међутим, првенствено се користи за проблеме класификације у машинском учењу. Циљ овог алгоритма је да створи најбољу линију или границу одлуке која може да одвоји n -димензионални простор у класе тако да можемо лако да ставимо нову тачку података у исправну категорију у будућности. Ова граница најбоље одлуке назива се хипер равна. *SVM* бира екстремне тачке/векторе који помажу у креирању хипер равни. Ови екстремни случајеви се називају вектори подршке, и стога се алгоритам назива метода потпорних вектора (Behera и сар., 2023).

II ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Велика је потреба за испитивањем супстанци различитог порекла и механизма деловања зарад развоја нових антитуморских лекова, обзиром на све већу учесталост карцинома дојке и бројна нежељена дејства хемотерапеутских агенаса. Пренамена лекова се спроводи у циљу тестирања већ одобрених клиничких лекова са познатим фармакокинетичким својствима, са тенденцијом идентификације нових терапијских индикација. Имајући у виду да су преклиничка тестирања **прва фаза истраживања** у склопу процеса пренамене лекова, у оквиру ове докторске дисертације испитан је антитуморски ефекат Орлистата и Симвастатина на ћелијским линијама карцинома дојке *in vitro*. Будући да су повишена телесна маса и хиперхолестеролемија једни од главних фактора ризика за настанак карцинома дојке, ови лекови су одабрани као третмани. Актуелна истраживања на пољу испитивања нових антитуморских једињења заснивају се и на употреби биљака и супстанци природног порекла у превенцији и терапији карцинома дојке. У оквиру ове дисертације испитана је и антитуморска активност лековите биљке *O. minimum*.

С обзиром на актуелност теме, постављени су **циљеви прве фазе истраживања**:

- Испитивање антитуморског потенцијала, односно цитотоксичности Орлистата, Симвастатина и *O. minimum* на ћелијским линијама карцинома дојке (MDA-MB-231 и MDA-MB-468). Као контрола цитотоксичности коришћени су здрави фибробласти MRC-5.
- Испитивање типа индуковане ћелијске смрти након примене одабраних третмана на ћелијским линијама карцинома дојке.
- Испитивање ефекта редокс статуса након примене третмана у ћелијским линијама карцинома дојке праћењем концентрације циљаних параметара: супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$), водоник-пероксида (H_2O_2) и малондиалдехида (MDA) као индикатора оштећења липида мембране и концентрације укупног глутатиона (GSH).
- Одређивање концентрације укупних липида након примене третмана на ћелијским линијама карцинома дојке.
- Испитивање молекуларних механизма дејства третмана на сигналне молекуле укључене у процес биосинтезе масних киселина у ћелијама карцинома дојке: релативне експресије иРНК и протеинске експресије ACLY, ACC и FASN сигналних молекула.
- Испитивање молекуларних механизма дејства третмана на сигналне молекуле ангиогенезе у ћелијама карцинома дојке: релативне експресије иРНК и протеинске експресије VEGF-A, MMP-9 и CXCL12/CXCR4 сигналних молекула.
- Испитивање повезаности молекуларних механизма биосинтезе масних киселина са процесом ангиогенезе након примене третмана на ћелијским линијама карцинома дојке.

Друга фаза истраживања у оквиру докторске дисертације заснивала се на праћењу молекуларних маркера који су у вези са процесом биосинтезе масних киселина на модел систему ткива карцинома дојке. Поремећај биосинтезе масних киселина је повезан са хиперхолестеролемијом, гојазношћу као и многим другим метаболичким болестима.

На основу наведеног, постављени су циљеви **друге фазе истраживања** у оквиру докторске дисертације:

- Испитити релативну експресију иРНК *ACLY* и *FASN* гена чији су протеински продукти укључени у биосинтезу масних киселина у узорцима ткива карцинома дојке и узорцима из микроокружења.
- Испитати да ли протеинска експресија FASN-а, као и релативна експресија иРНК *ACLY* и иРНК *FASN* гена у карциномском ткиву и узорцима ткива из микроокружења карцинома дојке зависе од хисто-патолошких карактеристика (врста карцинома, статус хормонских рецептора, хуманог епидермалног фактора раста и година пацијената).
- Испитати да ли релативна експресија иРНК *ACLY* и *FASN* гена, и протеинске експресија FASN-а у карциномском ткиву и узорцима ткива из микроокружења карцинома дојке повезана са степеном агресивности карцинома дојке (TNM класификација и хистолошки градус).
- Испитати улогу микроокружења карцинома у прогресији карцинома дојке.

Трећа фаза истраживања у оквиру ове докторске дисертације огледа се у примени савремених метода машинског учења са циљем побољшања TNM класификационог модела карцинома дојке.

Приликом овог типа истраживања постављени су следећи циљеви:

- Креирање јединствене базе података која садржи све доступне клиничко-патолошке и биолошке податке о типу дијагностикованог карцинома са посебним освртом на податке у вези TNM класификационог модела.
- Извршити статистичку обраду података помоћу савремених алгоритама машинског учења на основу прикупљених података из јединствене базе креиране искључиво за ово истраживање.
- Дефинисати клинички значај најбоље рангираног класификационог алгорита на дефинисаном сету података.
- Испитати да ли протеинска експресија FASN-а доприноси побољшању TNM класификационог модела на модел систему карцинома дојке.

III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Експериментални део истраживања у оквиру ове докторске дисертације урађен је у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Хемикалије и реагенси

За потребе извођења експеримената током израде докторске дисертације коришћене су следеће хемикалије и реагенси: медијум за гајење имортализованих ћелијских култура DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), фосфатни пуфер PBS (енгл. *Phosphate Buffer Saline*), говеђи фетални серум FBS (енгл. *Fetal Bovine Serum*), 0,25% трипсин-EDTA и пеницилин/стрептомицин набављени су од Capricorn Scientific, Ебсдорфергруд, Немачка. МТТ реагенс (енгл. *3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) набављен је од Santa Cruz Biotechnology, Далас, Тексас, САД. DMSO (енгл. *Dimethyl sulfoxide*), секундарно антитело коњуговано са Cy3, примарно поликлонско антитело CXCR4, и DAPI боја (енгл. *Diamidino -2- phenylindole*) су од Thermo Fisher Scientific, Волтам, Масачусетс, САД. Акридин оранж од Acros organics, Гел, Белгија. Етидијум бромид (енгл. *Ethidium bromide*), NBT (енгл. *Nitro Blue Tetrazolium*), албумин пореклом из говечета BSA (енгл. *Bovine Serum Albumine*), хлороформ, етанол и изопропанол PCR чистоће набављени су од SERVA, Хајделберг, Немачка. Примарна поликлонска антитела VEGF, MMP-9 су купљени од RD System, Минеаполис, Минесота, САД. Моноклонска примарна антитела ACLY, ACC, FASN и медијум за лепљење препарата су набављени од Abcam, Кембриџ, Велика Британија. Орлистат, Симвастатин, ванилин, пероксидаза тип II пореклом из рена, сумпорна киселина, ортофосфатна и трихлорсирћетна киселина, хидроген-пероксид, ацетон, тиобарбитурна сулфосалицилна и хлороводонична киселина, трипан плаво, GSH редуктаза, катехин, р-кумаринска киселина, протокатехуинска киселина, 3,5-дихиробензоева киселина, гална киселина, р-хидробензоева киселина, сиригин, сиригинска киселина, ферулинска киселина, рутин, кафеична киселина, кверцетин-3-о-глукопиранозид, хлорогена киселина, кверцетин, метанол су од Sigma-Aldrich, Сент Луис, Мисури, САД. NADPH (енгл. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) и DTNB (енгл. *Ellman's Reagent*) су допремљени од Invitrogen, Волтам, Масачусетс, САД. SDS (енгл. *Sodium dodecyl sulfate*) и параформалдехид (енгл. *Paraformaldehyde* - PFA) су купљени од Merck, Дармштат Немачка. TRIzol (енгл. *TRI Reagent*) и PCR вода (енгл. *RT-PCR grade water*) су од произвођача Ambion, Тексас, САД. Прајмери су поручени од Eurofins Genomics, Еберсберг, Немачка. Кит за реверзну транскрипцију (енгл. *Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*) и кит за qPCR (енгл. *Applied Biosystems SYBR Green PCR Master Mix*) су набављени од Applied Biosystems, Волтам, Масачусетс, САД.

1. Узорковање, идентификација и припрема биљног материјала

Цветови врсте *O. minimum* су узорковани у селу Горња Трешњевица (GPS 44° 13' 0" N, 20° 33' 0" E), општина Аранђеловац, 2019. године у периоду цветања од јуна до септембра по сувом времену. Сакупљен материјал је транспортован до Лабораторије за физиологију биљака, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Детерминација биљног материјала је обављена коришћењем стандардних кључева за идентификацију биљака (Josifović, 1970 – 1980; Tutin и сар., 1964 – 1993). Узорци биљног материјала који је предходно хербализован су депоновани у Хербаријум Института за биологију и екологију при чему је добијен идентификациони ваучер са идентификационим бројем 134/020. Биљни материјал је сушен на тамном и сувом месту, након чега је уситњен и припремљен за екстракцију метанолом. Узето је 10 g сувих уситњених цветова, додато је 100 ml метанола и екстракција је вршена са Soxhlet апаратом у два наврата. Овако припремљен метанолни екстракт је филтриран кроз филтер папир (Whatman, No. 1) и упарен на ИКА Rotary Evaporator - WU-28710-00 апарату на 40 °C. Овако припремљен метанолни екстракт је чуван у тамној бочици у фрижидеру на 4 °C до употребе.

1.1. Одређивање концентрације фенола, флавоноида и танина

Одређивање концентрације фенола, флавоноида и танина у метанолном екстракту цветова *O. minimum* урађено је у Лабораторији за физиологију биљака, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Укупан садржај фенола је одређен спектрофотометријски помоћу Folin-Ciocalteu's методе (Wootton-Beard и Ryan, 2011). Резултати укупних фенола су представљени као еквиваленти галне киселине (mg GAE/g) у односу на линеарну једначину добијену из конструисане стандардне криве ($y=0.006x+0.0069$, $R^2=0.994$).

Концентрације флавоноида је одређена применом методе са алуминијум хлоридом (Quettier и сар., 2000). Концентрација флавоноида је израчуната из линеарне једначине стандардне криве ($y=0.014x+0.027$, $R^2=0.995$). Резултати који представљају концентрацију флавоноида су изражени преко еквивалента рутина (mg RU/g).

Концентрација танина је одређена коришћењем бутанол-HCl методе (Makkar, 2000). Цијанидин хлорид је коришћен као стандард приликом извођења ове методе. Концентрација танина је израчуната преко линеарне једначине из стандардне криве ($y=0.009x+0.006$, $R^2=0.999$).

1.2. HPLC анализа биљног материјала

Идентификација фенолних једињења присутних у метанолном екстракту цветова *O. minimum* урађена је у сарадњи са колегама са Института за хемију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Идентификација и квантификација фенолних једињења у цветовима *O. minimum* урађена је на Shimadzu Prominence HPLC систему. Овај HPLC систем се састоји од: пумпе (LC-20AT), дегасера (DGU-20A), пећи за колону (СТО-20A), инјекторског система са петљом од 20 µl, детектора (SPD-M20A PDA) и контролора система (CBM-20A Prominence 3). За потребе овог експеримента коришћена је Luna C18 колона. Мобилну фазу су чинили: (A) ацетонитрил и (B) вода: сирћетна киселина = 100:1 v/v. Проток

мобилне фазе је био 0.7 ml/мин, док је пећ била подешена на 35 °C. HPLC програм мобилне фазе за елуирање био је: линеарни градијент од 95% – 93% В (0 – 7 min), линеарни градијент од 93% – 91% В (7 – 9 min), линеарни градијент од 91% – 87% В (9 – 12 min), линеарни градијент од 87% – 85% В (12 – 15 min), линеарни градијент од 85% – 80% В (15 – 20 min), линеарни градијент од 80% – 37% В (20 – 35 min), и изократски од 10% В (35 – 40 min). PDA детектор је био подешен да прати апсорпцију од 200 nm до 800 nm, док су хроматограми фенола и флавоноида детектовани на: 254 nm (за галну киселину), 260 nm (за протокатехуинску киселину, 3,5-дихидроксibenзојеву киселину, р-хидроксibenзојеву киселину, синингин, рутин, кверцетин-3-О-глукопиранозид), 280 nm (за синингинску киселину и катехин) и 320 nm (за хлорогенску, р-кумаринску, кафеинску и ферулну киселину).

Суви екстракт цветова *O. minimum* (10 mg) је коришћен за квантификацију фенола и флавоноида растворен је у 1 ml метанола, да би се добио радни раствор од 10 mg/ml. Овако припремљен екстракт је пре извођења HPLC анализе филтриран ради уклањања нечистоћа. Да би се оптимизовали хроматографски услови сваки стандард је растворен у метанолу у концентрацији од 1000 µg/ml, а затим разблажен до концентрације од 500 µg/ml. У сврху квантитативне анализе цветова *O. minimum* направљен је почетни раствор смеше свих стандардних једињења у метанолу, а концентрација сваког је износила 1000 µg/ml. Од овог полазног раствора за израду калибрационе криве, направљена је серија радних раствора у опсегу од 500 µg/ml до 1 µg/ml. Сви стандардни раствори су до употребе чувани на температури од 4 °C. Концентрације стандардних једињења у испитиваним екстрактима одређене су на основу површине пика коришћењем једначине за линеарну регресију добијену из калибрационе криве.

2. Припрема третмана

Орлистат (кат. бр. O4139-25MG) и Симвастатин (кат. бр. S6196-5MG) су комерцијално купљени од компаније Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Према упутству произвођача, ови третмани су растварани у DMSO-у а затим разблажени медијумом за гајење ћелија тако да концентрација почетног радног раствора буде 100 µg/ml. Од овако спремног почетног радног раствора даље су припремане ниже концентрације за извођење експеримента, при чему концентрација DMSO-а у највишој тестираној дози није прелазила 0.1%.

Метанолни екстракт цветова врсте *O. minimum* је најпре растворен у 50 µl DMSO-а тако да његова концентрација у највишој тестираној дози није прелазила 0.5%. Овако растворен екстракт је разблажен медијумом за гајење ћелија тако да финална концентрација радног раствора буде 1 mg/ml. Са циљем отклањања присутних нечистоћа, почетни раствор је филтриран кроз стерилни филтер са порама пречника 0.2 µm. Овако направљен почетни раствор је разблажен медијумом за гајење ћелија до одговарајућих циљаних концентрације које су даље тестиране одговарајућим експерименталним методама.

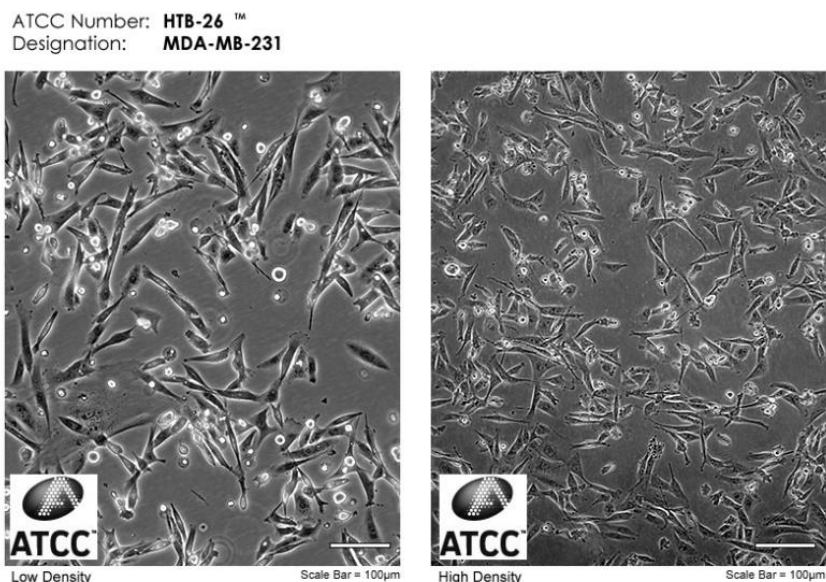
3. Ћелијско-молекуларне анализе

3.1. Имортализоване ћелијске културе у *in vitro* истраживањима

Имортализоване ћелијске културе су добар модел систем за *in vitro* биомедицинска преклиничка испитивања антитуморских агенаса. Употребом имортализованих ћелијских линија у истраживањима се обезбеђује чиста хомогена популација ћелија што осигурава конзистентан модел систем за истраживање као и поновљивост добијених резултата. Предност коришћења ћелијских линија у истраживањима огледа се у једноставном тестирању метаболизма лекова и цитотоксичности, производњи антитела, проучавању функције гена, стварању вештачких ткива и синтези терапеутских протеина (Mirabelli и сар., 2019). У истраживањима са аспекта ћелијске и молекуларне биологије, имортализоване линије су битне у проучавању биохемије и метаболизма ћелија, као и интрацелуларних и екстрацелуларних сигналних путева код карцинома. Тестирање антитуморских агенаса на ћелијским културама представља први ниво преклиничких истраживања у циљу разумевања механизма настанка болести и развоју нових суплемената и лекова. Најпознатији репозиторијум ћелијских линија је у компанији American Type Culture Collection (ATCC) (Capes-Davis и сар., 2019).

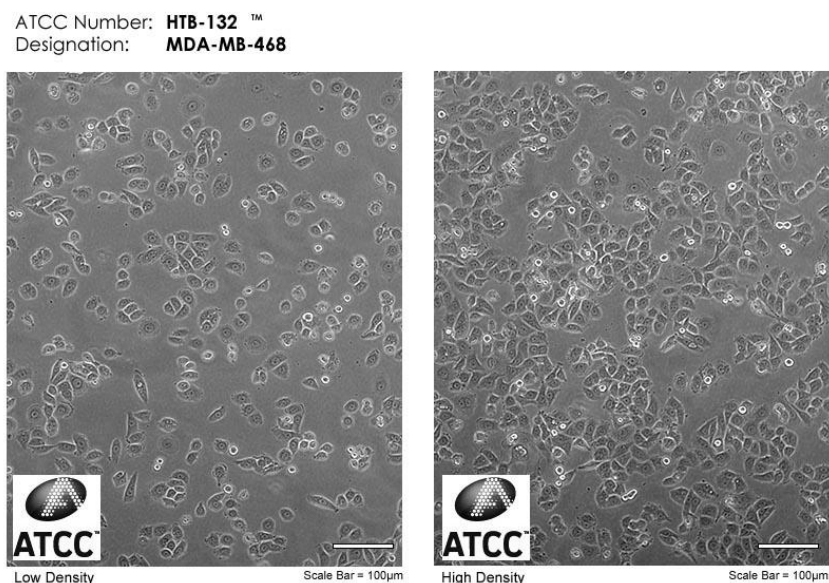
У оквиру ове докторске дисертације коришћене су троструко негативне MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелије карцинома дојке. Као контрола за испитивање цитотоксичности третмана коришћена је здрава MRC-5 ћелијска линија феталних фибробласта плућа.

Ћелијска линија карцинома дојке MDA-MB-231 представља троструко негативну, адхерентну ћелијску линију која је изолована из плеуре пацијента са инвазивним дукталним карциномом (Слика 18). У истраживањима ова ћелијска линија се обично користи као модел систем за истраживање карцинома који се дијагностикује у унапредовалој фази болести. Ова линија не експримира рецепторе за естроген, прогестерон, HER2 и Е-кадхерин али је карактерише мутиран p53. Као резултат недостатка експресије естрогена, прогестерона и HER2 ова ћелијска линија је првобитно класификована као базална Б. Међутим сада је познато да припада claudin-low молекуларном подтипу због инхибиције клаудина 3, 4 и 7, као и ниске експресије Ki-67 маркера пролиферације, прекомерне експресије маркера епително-мезенхимске транзиције, као и CD44⁺/CD24⁻ маркера матичних ћелија канцера дојке. MDA-MB-231 ћелије су веома агресивне и са високим метастатским потенцијалом, по морфологији вретенасте и слабо диференциране, а њихова инвазивност је посредована протеолитичком деградацијом екстрацелуларног матрикса (<https://www.atcc.org/products/htb-26>).



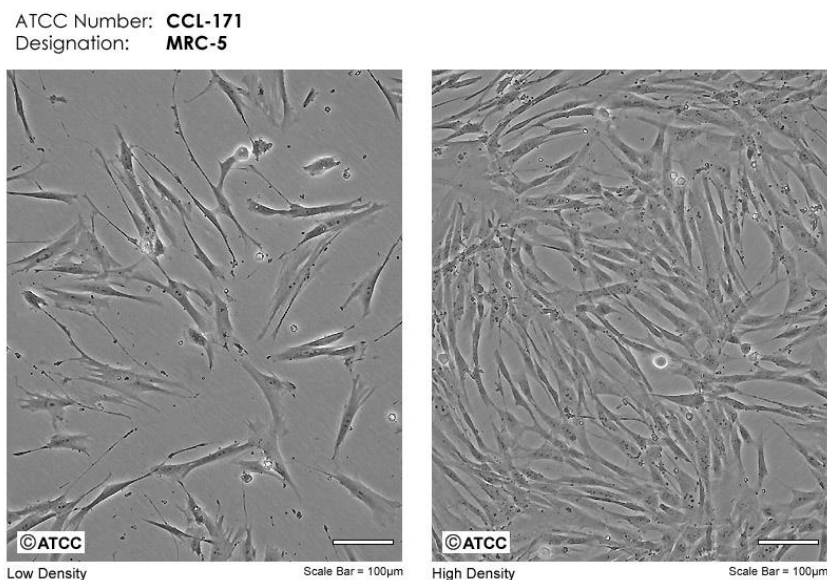
Слика 24. Морфолошки изглед MDA-MB-231 ћелија карцинома дојке (Слика преузета са: <https://www.atcc.org/products/htb-26>)

Ћелијска линија карцинома дојке MDA-MB-468 је троструко негативна, адхерентна линија изолована из плеуралног излива пацијента са аденокарциномом дојке (Слика 19). Ова линија не експримира рецепторе за естроген, прогестерон и HER2. Прекомерна експерсија Ki-67 маркера пролиферације, EGFR рецептора епидермалног фактора раста и цитокина 5 и 6, ову ћелијску линију сврстава у базални тип А карцинома дојке. С обзиром на ове карактеристике, MDA-MB-468 ћелије су високо пролиферативне за разлику од MDA-MB-231 ћелија које имају ниску експресију Ki-67 маркера. MDA-MB-468 ћелије су епителног порекла, округластог облика и расту у кластерима и имају нижи ниво метастатског потенцијала и мање су агресивног фенотипа у поређењу са MDA-MB-231 ћелијама (<https://www.atcc.org/products/htb-132>).



Слика 25. Морфолошки изглед MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке (Слика преузета са: <https://www.atcc.org/products/htb-132>)

Ћелијска линија MRC-5 су здрави фетални фибробласти плућа и представљају диплоидну културу која се првенствено користила за продукцију вакцина против хепатитиса А, варицеле и полиомијелитиса. MRC-5 ћелије су имортализоване, адхерентне културе, вретенастог облика које одликује веома брзи раст. Ова ћелијска линија је нашла примену и у антитуморском испитивању потенцијалних терапеутика, јер су фибробласти заправо нетрансформисани и здрави, и саставни су део свих везивних ткива у људском организму (Jacobs и сар., 1970).



Слика 26. Морфолошки изглед MRC-5 ћелија здравих фибробласта плућа (Слика преузета са: <https://www.atcc.org/products/ccl-171>).

3.2. Манипулација ћелијским културама

Култивација ћелија подразумева скуп различитих процедура у циљу одржавања вијабилности ћелија у лабораторијским условима. Одржавање ћелијске културе у *in vitro* истраживањима подразумева гајење ћелија у контролисаним условима и посебним CO₂ инкубаторима за гајење ћелија. Ови услови подразумевају одржавање оптималне концентрације кисеоника, угљен-диоксида и температуре (37 °C, 5% CO₂) при чему се имитирају *in vivo* услови. За гајење ћелија користе се посебне стерилне посуде са филтерима (фласкови) које садрже хранљиви медијум са нутријентима, факторима раста, аминокиселинама, неорганским солима, масним киселинама, липидима и pH индикаторима. У хранљиви медијум додато је и 10% FBS-a, 100 IU/ml пеницилина и 100 IU/ml стрептомицина. Додавање антибиотика у хранљиви медијум спречава настанак контаминација (Segeritz и Vallier, 2017).

Одлеђивање ћелија – Криопрезервација представља процес чувања ћелија у специјалним криотубама на температури од -196 °C у течном азоту. Поступак одлеђивања подразумева пребацивање залеђених ћелија из течног азота у 5 ml свежег медијума и центрифугирање (10 минута, 1200 rpm). Након овог корака, ћелијски талог је ресуспендован у нови медијум и ћелије су пребачене у стерилан фласк T-25 cm³. Након 24 часа мења се медијум (Pollard, 1997).

Трипсинизација и пасажирање ћелија – Трипсинизација представља поступак којим се одвајају ћелије са дна флашка уз помоћ ензима трипсина. Обично се ћелије трипсинизују онда кад испуне дно флашка у коме су гајене (80 – 90%). Процес трипсинизације подразумева додавање 1 ml трипсина у флашк Т-25 cm³ или 2 ml у флашк величине Т-75 cm³ где је предходно отклоњен медијум у којем су ћелије гајене. Након додавања трипсина потребно је сачекати 2 – 3 минута да се ћелије у потпуности одлепе. Активност трипсина се прекида додавањем медијума. Пасажирање преставља процес пребацивања мањег броја ћелија у нови стерилни флашк са хранљивим медијумом како би ћелије даље несметано расле и делиле се за потребе експерименталног рада (Mitry и Hughes, 2012).

Бројање ћелија – за потребе извођења експерименталних метода у ћелијској биологији користе се само вијабилне односно живе ћелије. За бројање ћелија користи се трипан плава боја, која улази у цитоплазму мртвих ћелија чији је интегритет мембране нарушен и боји их плаво, док вијабилне ћелије остају необојене. За бројање ћелија се користи хемоцитометар, а суспензија ћелија се меша са бојом у размери 1:1 и налива се у комору за бројање. Овако припремљене ћелије се броје под светлосним микроскопом у 2 дијагонална квадрата. Број ћелија по милилитру се рачуна на следећи начин: средња вредност броја ћелија из оба квадрата $\times$ разблажење $\times 10^{-4}$ (10^{-4} је корекциони фактор дубине коморе хемоцитометра). Након израчунавања броја вијабилних ћелија у 1 ml, прерачунава се број ћелија неопходан за експериментални рад у зависности од методе (Freshney, 1983).

3.3. Култивација ћелија и припрема за третман

Непосредно пре извођења експеримената неопходно је припремити ћелијске културе. Припрема ћелијских култура обухвата процесе култивације у стерилним условима и одржавања оптималног броја вијабилних ћелија у циљу испитивања биолошких ефеката третмана.

За одређивање **цититоксичности (MTT тест)**, 1×10^5 MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке, као и здравих MRC-5 ћелија засејано је у плоче са 96 отвора. Након 24 часа инкубације, ћелије су третиране са 100 μ l метанолног екстракта цветова биљке *O. minimum* у концентрацијама 1, 10, 50, 100, 250 и 500 μ g/ml као и растворима Орлистата и Симвастатина у концентрацијама 1, 5, 10, 25, 50 и 100 μ g/ml. Као контролне коришћене су нетретиране ћелије и њима је само замењен медијум.

За одређивање **типа ћелијске смрти** помоћу АО/ЕБ микроскопске методе, 1×10^5 MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке засејано је у плоче са 96 отвора. Након 24 часа од инкубације, ћелије су третиране са 100 μ l метанолног екстракта цветова биљке *O. minimum* у концентрацијама 1 и 100 μ g/ml и растворима Орлистата и Симвастатина у концентрацијама 1 и 25 μ g/ml. Контролним ћелијама је замењен медијум.

За потребе одређивања концентрације **параметара редокс статуса**, MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке засејане су у плоче са 96 отвора и то 1×10^5 за одређивање концентрације супероксид анјон радикала и 5×10^4 за одређивање концентрације водоник пероксида и глутатиона. За одређивање концентрације малонилдиалдехида 1×10^6 ћелија засејано је у плоче са 6 отвора. Ћелије су третиране са 100 μ l метанолног екстракта цветова биљке *O. minimum* у концентрацијама 1, 10, 50, 100, 250 и 500 μ g/ml; као и растворима Орлистата и Симвастатина у концентрацијама 1, 10, 25 и 50 μ g/ml. Контролним ћелијама је замењен медијум.

За одређивање **концентрације укупних липида**, 1×10^6 MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке засејано је у плоче са 6 отвора. Након истека периода инкубације, ћелије су третиране са 1500 ml метанолног екстракта цветова биљке *O. minimum* у концентрацијама 1 и 100 $\mu\text{g/ml}$, и растворима Орлистата и Симвастатина у концентрацијама 1 и 25 $\mu\text{g/ml}$. Контролним ћелијама је замењен медијум.

За одређивање **генске експресије qPCR методом** 10×10^5 MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке засејано је у фласк површине T-25 cm^3 . Након постизања конfluентности од 90%, ћелије су третиране са 5 ml метанолног екстракта цветова биљке *O. minimum* у концентрацијама 1 и 100 $\mu\text{g/ml}$ као и растворима Орлистата и Симвастатина у концентрацијама 1 и 25 $\mu\text{g/ml}$. Контролним ћелијама је замењен медијум.

За одређивање **протеинске експресије** методом имунофлуоресценце параметара ACLY, ACC, FASN, VEGF, CXCR-4 и MMP-9, 5×10^4 MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке засејано је у плоче са 6 отвора на покровним стаклима. Ћелије су третиране са 1.5 ml метанолног екстракта цветова биљке *O. minimum* у концентрацијама 1 и 100 $\mu\text{g/ml}$ као и са растворима Орлистата и Симвастатина у концентрацијама 1 и 25 $\mu\text{g/ml}$. Контролним ћелијама је замењен медијум.

4. Испитивање биолошких ефекта третмана

4.1. Испитивање цитотоксичности

MTT тест представља колориметријску методу за одређивање вијабилности ћелија. Ова метода се заснива на реакцији редукције жуто обојене 3-[4,5-диметилазол-2]-2,5-дифенилтетразолијум бромид соли до љубичастог формаза уз помоћ митохондријалне редуктазе (Mosmann, 1983).

Након примене третмана и истека времена инкубације (24 и 72 сата) у контролне и третиране ћелије додато је по 25 μl MTT раствора (5 mg/ml). Ћелије су инкубирале 2.5 сата у CO_2 инкубатору (37° C, 5% CO_2), након чега је третман са MTT-ем аспириран и додато је 150 μl DMSO-а у циљу формирања боје која води порекло од формазана. Интензитет боје је мерен на 550 nm на ELISA читачу за плоче (RT-21000C), а добијене вредности апсорбанци су пропорционалне интензитету респирације живих ћелија. Проценат живих ћелија је израчунат као однос апсорбанци третираних и контролних ћелија помножен са 100.

4.2. Одређивање типа ћелијске смрти

Акридин оранж/етидијум бромид микроскопска метода је коришћена за одређивање типа ћелијске смрти. Ова метода се заснива на принципу бојења ћелија различитим бојама при чему акридин оранж боји живе и мртве ћелије емитујући зелену флуоресценцу након везивања за ДНК односно црвену када се веже за молекуле РНК. Етидијум бромид улази само у мртве ћелије бојећи их у црвену боју, при чему се везује само за молекуле ДНК (Baskić и сар., 2006).

Након инкубације ћелија са третманом у периоду од 24 часа, у сваки бунарић је додато по 10 μl акридин оранжа и етидијум бромида (100 $\mu\text{g/ml}$) који су растварани у дестилованој води. Након додавања боје ћелије су посматране на микроскопу на увећању 400x, и бројено је најмање 300 ћелија по сваком испитиваном узорку. Током бројања ћелија уочене су морфолошке промене након деловања третмана, при чему су се разликовале: вијабилне ћелије са јасно зеленом флуоресценцом; код ћелија у раној апоптози интегритет мембране је био очуван али присутна фрагментација хроматина унутар ћелије; код ћелија у касној апоптози било је присутно наранџасто једро са кондензованим и/или фрагментисаним хроматином; док су ћелије у некрози биле црвено обојене са кондензованим једрима. Као резултат ове методе добијен је проценат живих ћелија, ћелија у раној односно касној апоптози као и проценат ћелија у некрози.

4.3. Одређивање параметара редокс статуса

4.3.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала

NBT тест је коришћен за спектрофотометријско одређивање концентрације супероксид анјон радикала у третираним и контролним ћелијама карцинома дојке. Ова метода је карактеристична по томе што се у присуству O_2 редукује нитро плав тетразолијум до нитро плавог формаза (Auclair и Voisin, 1985).

Након истека периода инкубације у трајању од 24 часа контролним и ћелијама са третманима, додато је 10 μ l NBT-а у концентрацији 5 μ g/ml и плоча је инкубирана 45 минута у CO_2 инкубатору. Након дефинисане инкубације, додато је 10 μ l DMSO-а и резултат је прочитан на 550 nm на ELISA reader Optic System RT2100-C апарату. Добијене апсорбанце контролних и третираних ћелија су прерачунате преко формуле:

$$\text{nmol NBT/ml} = A/0.015 \times V_{\text{cuv}} / V_{\text{ex}}$$

(A- апсорбанца; 0.015 моларни коефицијент за моноформазан; V_{cuv} – укупна запремина у бунару; V_{ex} – запремина ћелија са третманом. Резултат је приказан у nmol/ml у односу на проценат вијабилних ћелија из МТТ-а.

4.3.2. Одређивање концентрације водоник пероксида

Концентрација водоник пероксида се одређује спектрофотометријски из супернатанта контролних и третираних ћелија. Ова метода се заснива на оксидацији фенол црвене боје помоћу водоник пероксида, при чему се као катализатор реакције користи пероксидаза рена (Rhee и сар., 2010).

За извођење ове методе пре експеримента је припремљена реакциона смеша коју су чинили: 0.28 mM PhenolRed-а и 1 U/ml пероксидазе рена. Из контролних и третираних ћелија узето је 50 μ l супернатанта, након примене третмана од 24 часа и додато је 50 μ l реакционе смеше. Овако припремљена смеша инкубирана је 37 $^{\circ}C$ у CO_2 инкубатору сат времена. Интензитет развијене боје мерен је на таласној дужини од 550 nm на ELISA reader Optic System RT2100-C апарату. Резултат је приказан у nmol/ml у односу на проценат вијабилних ћелија из МТТ-а. Добијене апсорбанце контролних и третираних ћелија се прерачунавају преко формуле:

$$\text{nmol/ml } H_2O_2 = A/F \times R$$

A-апсорбанца; F – фактор стандардне криве; R – разблажење.

4.3.3. Одређивање концентрације малонилдиалдехида

Концентрација малонилдиалдехида, као индикатора оштећења липида услед оксидационог стреса, се одређује спектофотометријски TBARS методом. Ова метода се заснива на реакцији између 2-тиобарбитуратне киселине са малонилдиалдехидом у којој настаје обојени комплекс (Buege и Aust, 1978).

За потребе ове методе ћелије су засејане у плоче са 6 отвора. По истеку периода инкубације ћелије су испране PBS-ом, а након тога лизирани са 200 μ l пуфера за лизирање и 2 μ l протеазног инхибитора. Овако лизирани ћелије су инкубирани 30 минута на леду, а по истеку инкубације су центрифугиране (10 мин, 1200 rpm, 4° C). Супернатант је пребачен у нову микротубу и одвојено је 10 μ l за мерење концентрације протеина на биофотометру (Eppendorf BioPhotometer plus). Остатку супернатанта је додато 1 ml TCA-TBA-HCl реакционе смеше након чега су узорци загревани на 90 °C, 30 минута на термоблоку. Након загревања уследило је хлађење узорака у трајању од 5 минута па центрифугирање 10 минута на 6600 rpm, 4 °C. Након завршеног центрифугирања по 100 μ l супернатанта је наливано у микротитар плоче а резултат је прочитан на таласној дужини од 405 nm на ELISA reader Optic System RT2100-C апарату.

Концентрација протеина је одређена на следећи начин: протеини су загревани 5 минута на термоблоку на 90 °C, и након тога растварани у 450 μ l PCR воде а апсорбанца сваког протеина мерена је на биофотометру. Познате концентрације BSA (енгл. *Bovine serum albumin* – BSA) су коришћене ради конструисања стандардне криве, а концентрација протеина је изражена у mg/ml. Резултати одређивања концентрације малонилдиалдехида су представљени преко процента вијабилних ћелија и изражени у pmol/mg протеина.

Формула за израчунавање концентрације малондиалдехида:

$$TBARS = (\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times V_{rs} \times 10 \text{ (MDA nmol/mg протеина)} / 1.56 \times V_{uz} \times C_{pr}$$

ΔA_{uz} – средња вредност апсорбанце узорка; ΔA_{sp} – средња вредност апсорбанце слепе пробе; V_{rs} – запремина реакционе смеше; V_{uz} – запремина узорка; C_{pr} – концентрација протеина у mg/ml.

4.3.4. Одређивање концентрације глутатиона

Концентрација глутатиона је одређена спектофотометријски, а принцип ове методе се заснива на реакцији оксидације GSH при чему настаје 5'-тио-2-нитробензоева киселина помоћу DTNB реагенса ((5,5'-дитио-бис(2-нитробензоева киселина) (Baker и сар., 1990).

Непосредно пре експеримента спремљена је реакциона смеша коју су чинили 1 Mm DTNB-а растворен у DMSO-у и фосфатни пуфер (pH 7.4) до потребне запремине. Након завршене инкубације са третманима у трајању од 24 часа, контролне и третиране ћелије су центрифугиране 10 минута, 1000 rpm, при чему је супернатант одливан и додато је 100 μ l 2.5% сулфосалицилне киселине. Овако припремљена ћелијска суспензија инкубирана је на леду 15 минута а након тога и центрифугирана (15 минута на 1000 rpm). У нову плочу је пренето 50 μ l супернатанта и додато још 100 μ l реакционе смеше. Плоча је инкубирана на собној температури у трајању од 5 минута, а интензитет развијене боје је мерен на таласној дужини од 405 nm на читачу микротитар плоча - ELISA reader Optic System RT2100-C апарату. Резултати одређивања концентрације глутатиона су изражени

преко процента вијабилних ћелија и представљени у nmol/ml. Коришћена је следећа формула за прерачунавање GSH:

$$\text{nmol GSH/ml} = A/F_{(0.0157)} \times R$$

A - апсорбанца; F - фактор стандардне криве GSH; R - разблажење.

5. Изолација укупних липида

Изолација укупних липида се заснива на хлороформ-метанол методи (Bligh и Dyer, 1959). Ћелије су испране PBS-ом, подигнуте са 1 ml хладне воде и покупљене скапером 24 часа од примене третмана. Подигнуте ћелије су пребачене у микротубе са додатком 400 μ l хладног метанола и овако припремљена ћелијска суспензија лизирана је у течном азоту у два наврата. Након завршене фазе лизирања у сваки узорак додато је 800 μ l хладног хлороформа након чега је уследила инкубација на собној температури 10 минута. Након инкубације, узорци су центрифугирани (20 минута, 12000 rpm, 4 °C), а липиди су из доње фазе пребачени у нове микротубе и инкубирани на собној температури да би испарио растварач. Овако изоловани липиди су ресуспендовани у 100 μ l хлороформа и чувани на -20 °C.

5.1. Одређивање концентрације укупних липида

Колориметријска метода за одређивање концентрације укупних липида у узорку заснива се на сулфо-фосфо-ванилин реакцији. Ова реакција се одиграва у два основна корака: прва је реакција липида са сумпорном киселином на високој температури, након чега следи друга реакција са ванилином у присуству фосфорне киселине. Ове хемијске реакције су веома сложене и укључују формирање стабилних карбонијум јона у почетној реакцији, након чега следи стварање ружичасте боје која води порекло од хромофора након додавања ванилина.

За извођења ове методе коришћено је по 20 μ l претходно изолованих липида. Додато је 180 μ l сумпорне киселине и узорци су загревани на термоблоку (100 °C, 10 минута). У охлађене узорке додато је 500 μ l 0.6 % фосфо-ванилин реагенса у циљу развијања боје и узорци су поново загревани на термоблоку (37 °C, 5 минута). По 100 μ l овако припремљених узорка је инкубирано 45 минута у мрачној комори.

Интензитет развијене боје је читаван на таласној дужини од 530 nm на микротитар читачу плоча - ELISA reader Optic System RT2100-C апарату. Стандардни раствор палмитинске киселине је коришћен у концентрацијама од 0.39 до 500 μ g/ml ради конструисања стандардне криве. Концентрација укупних липида је изражена у μ g/ml и прерачуната преко следеће формуле:

$$\text{Укупни липиди } (\mu\text{g/ml}) = A/F$$

A - апсорбанца; F - фактор стандардне криве.

6. Одређивање протеинске експресије у ћелијама

Имунофлуоресценца представља методу за одређивање протеинске експресије и заснива се на принципу реакције антиген-антитело. Ова реакција омогућава да се прати присуство и локализација одређеног протеина и комплетних ћелијских структура. Антитело које се детектује је обележено флуоресцентном бојом са различитим таласним дужинама екситације и емисије сигнала. Сигнал се детектује коришћењем флуоресцентног микроскопа који има филтере за детекцију боје одређене таласне дужине (Higuchi и сар., 2001).

За извођење ове методе ћелије су засејане на претходно стерилисана покривна стакла стављена у плоче са 6 отвора. Након истека 24 часа од примене третмана, ћелије су испирание PBS-ом и фиксирание 4% параформалдехидом, 20 минута. Након фиксације ћелијска мембрана је пермеабелизована са хладним метанолом. Ћелије су испирание 3х5 минута PBS-ом, и уследило је блокирање ћелијске мембране са 1 % BSA у трајању од 20 минута. Након блокирања ћелијске мембране покривна стакла са ћелијама су инкубирани са 30 μ l примарног антитела у трајању од 60 минута на собној температури. За овај експеримент коришћена су примарна моноклонска (ACLY, ACC, FASN) и поликлонска (CXCR-4, VEGF, MMP-9) антитела у одређеним размерама (за CXCR-4 размера је 1:1000, док су остала примарна антитела коришћена у размери 1:100). Након истека инкубације са примарним антителом, покривна стакла са ћелијама су враћена у плоче и уследило је испирање PBS-ом 3х5 минута. На исти начин је уследила инкубација ћелија са секундарним антителом које је конјуговано са Cy3 флуоресцентном бојом. Секундарно антитело је растворено у PBS-у (1:200), док је за детектовање једра коришћена DAPI боја (1:1000). После инкубације са секундарним антителом ћелије су испране PBS-ом и залепљене на предметна стакла поливинил медијумом. Овако спремљени препарати су посматрани на флуоресцентном микроскопу (Ti-Eclipse), на увећању 600х. Сликано је најмање 20 микрографија помоћу NIS-ELEMENT програма.

Протеинска експресија тестираних параметара је квантификована са репрезентативних микрографија помоћу ImageJ програма на начин који је детаљно описан на страници: <https://theolb.readthedocs.io/en/latest/imaging/measuring-cell-fluorescence-using-imagej.html>.

Као резултат добијен је број који представља релативну флуоресценцу по ћелији (CTCF) а прерачунава се преко следеће формуле:

$$CTCF = ID - (ASC \times MFBR)$$

CTCF - Corrected total cell fluorescence; ID - Integrated Density; ASC - Area of selected cell; MFBR - Mean fluorescence of background readings

7. Критеријуми за укључивање пацијената у истраживање

За истраживања у оквиру ове докторске дисертације коришћена су ткива карцинома дојке (n=30) као и ткиво из микроокружења карцинома (n=30). Све пацијенткиње које су укључене у ову студију су прегледане од стране Онколошког конзилијума Универзитетског Клиничког центра у Крагујевцу. Уз добровољни пристанак пацијенткиња и одобрење Етичког комитета Универзитетског Клиничког центра (бр. 01-4990), узимани су узорци карцинома и микроокружења у току хируршке интервенције. Узорци микроокружења карцинома дојке су узимани на око 3 cm од макроскопске маргине карцинома, док је величина узорака карцинома дојке зависила од величине самог карцинома. Сви узорци су хистопатолошки прегледани и евалуирани од стране Службе за патолошку и анатомску дијагностику Универзитетског Клиничког центра у Крагујевцу. Узорци су чувани у течном азоту на -196 °C.

У ову студију нису укључени подаци пацијената код којих је преоперативно апликована неoadјуватна терапија, са породичном историјом карцинома дојке као ни пацијенти са метастатским променама пореклом из других органа. Истраживање у оквиру ове докторске дисертације није омело лечење и постоперативно праћење пацијената, што је у складу са принципима добре клиничке праксе.

7.1. Припрема узорка ткива

Узорци карциномског ткива и узорци из микроокружења карцинома су најпре измерени на аналитичкој ваги (0.01 g), након чега је уследила хомогенизација ткива. Хомогенизација је рађена течним азотом уз помоћ авана и тучка са додатком 1 ml Trizol реагенса. Овако припремљен узорак је додатно хомогенизован пипетом и инкубиран на собној температури 5 минута.

7.2. Одређивање релативне генске експресије

7.2.1. Изолација РНК из ћелијских линија и ткива

Изолације иРНК из узорака ткива као и из контролних и третираних ћелија је урађена према протоколу описаном у Chomezynski и Sacchi, 1987. Ова метода се заснива на фенол/хлороформ реакцији при чему се издваја водена фаза са РНК молекулом.

Медијум из контролних и третираних ћелија је сачуван по истеку инкубације и ћелије су подигнуте трипсином, пренете у медијум и центрифугиране (10 мин, 1200 rpm). Након завршене центрифуге медијум је аспириран, а ћелијски талог је хомогенизован на леду са додатком 1 ml TRIZOL реагенса. По завршетку хомогенизације, ћелије су поново центрифугиране (5 мин, 12000 rpm, 4 °C), а супернатант пребачен у нове микротубе са додатком 200 µl хлороформа. Након овог корака припреме ћелија даљи протокол за изолацију РНК из ћелија и ткива је био исти. Узорак је инкубиран 10 минута на собној температури а након тога центрифугиран 10 мин, 12000 rpm, 4 °C. Супернатант изопропанола је одбачен, додато је 1 ml хладног 80% етанола на пелет РНК и уследило је поновно центрифугирање (7 мин, 7600 rpm, 4 °C). Талог изоловане РНК је сушен 2 - 3 минута и растворен у 15-20 µl PCR воде. У циљу растварања РНК талога у потпуности, узорак је инкубиран на термоблоку 5 мин на 55 °C. Концентрација РНК је мерена на

биофотометру (Eppendorf BioPhotometer plus) и изражена у $\mu\text{g/ml}$. Однос апсорбаци на 260/280 nm, указује на чистоћу изоловане РНК, при чему су само узорци чистоће од 1.7 - 1.9 коришћени за даље анализе. Овако изолована и измерена РНК чувана је на -80°C .

7.2.2. Реверзна транскрипција

Реверзна транскрипција је процес током кога молекула РНК служи као полазна матрица за синтезу комплементарног молекула ДНК уз помоћ ензима РНК транскриптазе. Ова метода захтева коришћење PCR стерилних хемикалија због превенције контаминације узорка па се најчешће употребљавају *ready to use* китови. За ову методу је коришћен The Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit који садржи све неопходне компоненте за ову реакцију. Овако синтетисана комплементарна ДНК је стабилна за извођење qPCR-а, поновну конверзију у комплементарну РНК или за дуго чување на температури од -20°C .

За извођење реакције реверзне транскрипције за сваки узорак је направљен појединачан мастер микс који је садржао: 2 μl 10x RT пуфера, 0.8 μl 25x dNTP микса, 2 μl 10x RT Random прајмера, 1 μl MultiScribe™ реверзне транскриптазе и 10 μl PCR воде. Припрема мастер микса је вршена на леду. У овако припремљен мастер микс је додато по 2 μl претходно изоловане РНК концентрације 1 $\mu\text{g/ml}$. За извођење реакције реверзне транскрипције програм PCR апарата (Eppendorf Mastercycler) је био подешен на четири циклуса: I циклус 25°C , 10 минута; II циклус 37°C , 120 минута; III циклус 85°C , 5 минута и IV циклус на 4°C , 5 минута. Овако добијена комплементарна ДНК за све узорке чувана је на -80°C до коришћења.

7.2.3. Ланчана реакција полимеразе у реалном времену

За одређивање генске експресије реакцијом квантитативне реакције полимеразе у реалном времену коришћена је комплементарна ДНК као полазни молекул. Ланчана реакција полимеразе омогућава умножавање сегмента ДНК у *in vitro* условима и чине је три основна корака: I корак подразумева денатурацију дволанчане ДНК матрице; II корак је хибридизација специфичних прајмера за ДНК матрицу; док III корак подразумева екстензију прајмера. Екстензија прајмера је катализована Taq стабилном ДНК полимеразом. Ова три корака чине један циклус PCR-а који је понавља од 20 до 45 пута при чему се ДНК амплификује до 10^9 пута. Real time PCR метода комбинује конвенционалну амплификацију и флуориметрију. За квантификацију се најчешће користе dsDNK боје које се специфично везују за дволанчану ДНК и специфично флуоресцентно обележене пробе. Најчешће коришћена dsDNK боја је SYBR green (Nolan и сар., 2006).

За ову методу је коришћен Applied Biosystems SYBR Green PCR Master Mix кит који садржи све компоненте неопходне за ову реакцију. Коришћењем оваквих *ready to use* китова постиже се максимална тачност при квантитативном испитивању генске експресије. За сваки узорак, на леду је направљена појединачана реакциона смеша која је садржала: 10 μl SYBR Green qPCR Master микса; 0.5 μl Forward и 0.5 μl Reverse прајмера (10 mM); и 8 μl PCR воде. У овако припремљен мастер микс је додато по 1 μl комплементарне ДНК тако да је укупна запремина реакције буде 20 μl . Овако припремљени узорци у PCR плочама стављени су у Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systems апарат где је програм Applied Biosystems (7500/7500 Fast Real-Time

PCR softver v 2.0) подешен на 40 циклуса. Сваки циклус почиње активационим кораком у трајању од 120 секунди на 94 °C а након тога следи понављање реакције у 40 циклуса: денатурација молекула ДНК (15 секунди, 95 °C); фаза хибридизације прајмера за ДНК (60 секунди, 58 °C) и полимеризација (60 секунди, 60 °C). Након завршене амплификације резултати су анализирани помоћу софтвера Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR softver v 2.0. Релативна квантификација гена је добијена у односу на експресију β -actin-а у истом узорку који је коришћен као контрола (Schmittgen и Livak, 2008).

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

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

ΔC_{T_1} = C_T вредност испитиваног гена у узорку; $D_{C_{T_2}}$ = C_T вредност β -actin-а у узорку.

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

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

ΔC_{T_1} - је разлика C_T вредност испитиваног гена у узорку и C_T вредности β -actin-а у истом узорку; $D_{C_{T_2}}$ - је разлика C_T вредност испитиваног гена у контроли и C_T вредности β -actin-а у контролном узорку.

Табела 1. Секвенце коришћених прајмера за испитивање релативне експресије иРНК.

Назив гена	Forward секвенца	Reverse секвенца
<i>VEGF-A</i>	5'-ACGGTCCCTCTTGGAATTGG-3'	5'-CTAATCTTCCGGGCTCGGTG-3'
<i>HIF-1α</i>	5'-CCACCTCTGGACTTGCCTTT-3'	5'-TTTTCTTGTCTGTCGCGCC-3'
<i>MMP-9</i>	5'-TGCCCGGACCAAGGATACAG-3'	5'-TCAGGGCGAGGACCATAGAG-3'
<i>CXCL-12</i>	5'-CCGGCTGAAGAACAACAACA-3'	5'-CCACGTCTTGGCCCTTTCAT-3'
<i>ACLY</i>	5'-TGCTCGATTATGCACTGGAAGT-3'	5'-ATGAACCCCATACTCCTTCCAG-3'
<i>ACC</i>	5'-CTGTAGAAACCCGGACAGTAGAAC-3'	5'-GGTCAGCATACATCTCCATGTG-3'
<i>FASN</i>	5'-TCGTGGGCTACAGCATGGT-3'	5'-GCCCTCTGAAGTCGAAGAAGAA-3'
β -actin	5'-AAGCAGGAGTATGACGAGTCCG-3'	5'-GCCTTCATACATCTCAAGTTGG-3'

7.3. Депарафинизација ткивних узорака и имунохистохемија

Узорци ткива карцинома дојке који су коришћени у овој докторској дисертацији су хисто-патолошки обрађени у складу са протоколом Службе за патолошко-анатомску дијагностику Универзитетског Клиничког центра у Крагујевцу. У току операције на Клиници за хирургију УКЦ у Крагујевцу узимани су узорци ткива карцинома и ткива из микроокружења који су током 24 часа фиксирани у 4 % формалдехиду и калупљени у парафинске блокове. Припрема ткивних исечака започиње сецирањем укалупљеног ткива микротомом на веома танке филмове промера 4 μ m. Филмови су након сечења пребачени на предметна стакла и сушени ради фиксације (56 °C, 1 сат). Овако

припремљени исечци ткива подвргнути су процесу депарафинизације да би се отклонио медијум у коме су узорци калупљени и фиксирани за предметна стакла.

Депарафинизација представља поступак коришћења различитих врста и концентрација алкохола: 2х5 минута ксилол; 2х5 минута апсолутни алкохол; 5 минута 96% алкохол; 5 минута 70% алкохол; 5 минута у 50% алкохола. Након употребе серије алкохола ткивни узорци су испрани дестилованом водом 5 минута. Следећи корак депарафинизације подразумевао је загревање узорака у микроталасној пећи на 560 W у цитратном пуферу (10mM Citric Acid, 0.05% Tween 20, pH 6.0), 5 минута, а након хлађење још 8 минута. Парафински исечци су испирани текућом водом 5 минута, дестилованом и PBS-ом. Добро испрани препарати су потапани у ацетон 5 минута. Одливан је вишак ацетона са ткивних узорака и додато 100 μ l Normal Goat серума, а након овог корака је уследила инкубација од 20 мин на собној температури.

По завршеној инкубацији директно је наливано 50 μ l примарног моноклонског антитела FASN у размери 1:100. Инкубација са примарним антителом је трајала 60 минута у влажној комори, а вишак антитела је испран 3х5 минута PBS-ом. Следећи корак је подразумевао наливање секундарног антитела Cy3 (1:200), а за детекцију једра је коришћена DAPI плава боја (1:1000), са инкубацијом од 60 мин у влажној комори. Ткивни узорци су испрани 3х5 минута PBS-ом. Преко ткивних узорака се ставља покровно стакло чији се крајеви лепе. Овако направљени препарати су остављени преко ноћи у мрачну комору ради сушења, након чега су снимани на флуоресцентном микроскопу (Ti-Eclipse) на увећању 600х. Приликом посматрања сваког појединачног препарата направљено је најмање 20 микрографија уз помоћ програма NIS-ELEMENT и резултати су квантификовани по формули који је описана у поглављу 5.

8. Статистичка обрада података

Сви експерименти у оквиру ове докторске дисертације, рађени су у трипликату, а добијени резултати представљају средњу вредност три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. Коришћени су Student's T тест и Independent test и ANOVA, при чему је $p < 0.05$ сматрана статистички значајном разликом, уколико је расподела података била нормална. За расподелу података која није била нормална коришћени су χ^2 - тест, Mann–Whitney U тест, Kruskal–Wallis H тест. Резултати су обрађени у статистичком пакету SPSS (SPSS for Windows, ver.17, Chicago, IL) програму за статистичку обраду резултата (SPSS for Windows, ver. 17, 2008). IC₅₀ вредности су израчунате из дозно-зависних крива добијених у компјутерском програму *CalcuSyn*. Квантификација нивоа протеинске експресије је одређена преко ImageJ програма за денситометријско мерење (Wayne Rasband, ImageJ).

9. Машинско учење

Креирање базе података и обрађивање резултата применом савремених метода машинског учења остварено је у сарадњи са тимом професора др Ненада Филиповића са Факултета инжењерских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Применом савремених метода машинског учења урађена је статистичка обрада података за резултате добијене на узорцима карцинома дојке и узорцима ткива микроокружења карцинома. База података која је коришћена у овом истраживању представља комбинацију клиничко-патолошког и лабораторијског истраживања. Сви лични подаци о пацијентима са карциномом дојке су анонимни и складиштени су у базу података која је креирана искључиво за потребе овог експеримента.

Подаци који су коришћени у овој студији су клиничко-патолошки и молекуларни. Клиничко-патолошки параметри су: старост пацијента, хистолошки тип тумора, хистолошки градус, статус хормонских рецептора (HER2, ER, PR), захваћеност лимфних нодуса, величина тумора и присуство метастатских промена. Протеинска експресија синтетазе масних киселина (FASN) је молекуларни параметар који је коришћен у овој студији. Одређивање протеинске експресије овог параметра у лабораторијским условима не представља део стандардних клиничко-патолошких испитивања, тако да овај параметар није ни на који начин утицао на ток и исход лечења пацијената са карцином дојке. Протеинска експресија FASN-а је квантификована са микрографија код 30 пацијената са карциномом дојке при чему су коришћени узорци ткива карцинома и узорци из микроокружења. Сви ови параметри су представљали сет података који се користио за машинско учење.

У оквиру овог истраживања, на основу прикупљених клиничко-патолошких података пацијената и испитиваних молекуларних параметара у лабораторијским условима одлучено је да се тестирају алгоритми традиционалног машинског учења. Примена неуронских мрежа (енгл. *Artificial neural networks*) често постиже најбоље резултате приликом тестирања оваквих типова података у поређењу са традиционалним методама машинског учења. Примена алгоритма за неуронске мреже захтева огромну количину података коју за овај тип истраживања није било могуће прикупити.

Применом метода машинског учења извршено је класификовање података пацијената у три категорије. Процедура примене машинског учења се састојала од следећих корака:

1. Дефинисање циљева анализе;
2. Припрема података за анализу као фаза претпроцесирања подразумева решавање; проблема недостајућих вредности, различитих типова атрибута (нумерички, описни), скалирање нумеричких вредности;
3. Тренирање предикционих модела на основу означених података;
4. Валидирање модела - у овом истраживању је коришћена унакрсна валидација (енгл. *Cross Validation*) методом изостављања пет примера (енгл. *Five-Fold Cross-Validation*) а добијени резултати су поређени са другим моделима машинског учења.

За обучавање модела коришћени су алгоритми за надгледано учење: Логистичка регресија, Стабло одлучивања, Случајна шума, Метода потпорних вектора и К-најближих суседа.

За имплементацију наведених алгоритама коришћена је библиотека *scikit-learn* и програмски језик *Python*. При имплементирању алгоритама потребно је навести вредности за његове хиперпараметре. Хиперпараметри представљају параметре чије вредности контролишу процес обучавања модела. Како би се избегло мануелно подешавање хиперпараметара модела (енг. *Hyperparameter tuning*), оптимални модели наведених алгоритама су нађени коришћењем *GridSearch* методе. Овој методи се задају скупови вредности за различите хиперпараметаре, а потом се креирају модели користећи различите комбинације хиперпараметара. Сви модели се тестирају користећи унакрсну валидацију методом изостављања пет примера. Модел који даје најбоље вредности за метрике валидације (тачност, прецизност и сензитивност) се узима за коначни избор.

Особине класификационих модела који су коришћени у овом истраживању су:

1. Тачност (енгл. *Accuracy*) представља пропорцију укупног броја предвиђања која су била тачна;
2. Сензитивност (енгл. *Sensitivity*) је дефинисана као пропорција позитивних налаза који су исправно класификовани. Представља способност да се исправно детектује појединачни пацијент који поседује особину од интереса;
3. Прецизност (енгл. *Precision*) представља удео позитивних инстанци у свим инстанцама проглашеним позитивним;
4. Криве оперативних карактеристика пријемника (енгл. *Receiver Operating Characteristic* - ROC) се често користе у биомедицинским истраживањима у циљу свеобухватне процене модела класификације.

Идеалан класификатор за ове параметре има вредност 1, а оцена класификатора према овој вредности је представљена у Табели 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

Класификациони алгоритми су тестирани комбинацијом вредности хиперпараметара из следећих скупова:

1. **Логистичка регресија:**
 penalty : l2, elasticnet, none
 C : np.logspace(-4,4,20)
 solver : newton-cg, lbfgs, liblinear, sag, saga
 max_iter : 100,1000,2500,5000
2. **Стабло одлучивања:**
 criterion : gini, entropy
 splitter : best, random

max_dept' : 1,2,3,4,5,6,7,8,None

3. **Случајна шума:**

criterion : gini, entropy

max_depth : 1,2,3,4,5,6,7,8,None

n_estimators : 10,20,30,40,50,60,70,80,90,100

max_features : auto,sqrt

4. **Метода потпорних вектора:**

C : 0.000100, 0.000264, 0.000695, 0.001833, 0.004833, 0.012743, 0.033598, 0.088587,
0.233572, 0.615848, 1.623777, 4.281332, 11.288379, 29.763514, 78.475997,
206.913808, 545.559478, 1438.449888, 3792.690191, 10000.000000

kernel : linear, rbf

gamma : scale, auto

5. **К-најближих суседа:**

weights: uniform, distance

algorithm : auto, ball tree, kd tree, brut

IV РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Све већа пажња се посвећује испитивању различитих молекуларних механизма у циљу разумевања настанка и прогресије карцинома дојке. Предмет великог броја преклиничких истраживања су и гени укључени у аберантну биосинтезу масних киселина као важног метаболичког пута који се активира током прогресије карцинома дојке. Примена стандардних лекова у терапији лечења карцинома, поред свих позитивних ефеката показује и бројна нежељена дејства на здраве ћелије. Преклиничка испитивања нестандардних лекова који се користе у лечењу различитих метаболичких стања а имају позитиван ефекат на регулацију прогресије карцинома су веома актуелна. Ови лекови имају способност модификације сигналних путева укључених у процес канцерогенезе, па њихова употреба може бити користан сегмент антинеопластичног третмана у комбинацији са стандардном онколошком терапијом.

У оквиру испитивања биолошких ефеката нестандардних лекова (Орлистат и Симвастатин) и биљке (*O. minimum*) као потенцијалних антитуморских агенаса праћена је цитотоксичност, одређиван је тип ћелијске смрти, промене у редокс хомеостазу, одређена је концентрација укупних липида, као и експресија гена чији су протеински производи укључени у активацију биосинтезе масних киселина у малигним ћелијама, као и утицај тих гена на регулацију ангиогенезе. Као контрола за цитотоксичну активност коришћена је MRC-5 ћелијска линија здравих фибробласта плућа.

1. Концентрација фенола и флавоноида у екстракту биљке *O. minimum*

Узоркован и припремљен биљни материјал је екстрахован метанолом у циљу одређивања концентрације биолошки активних супстанци које су присутне у цвету биљке *Ocimum minimum*.

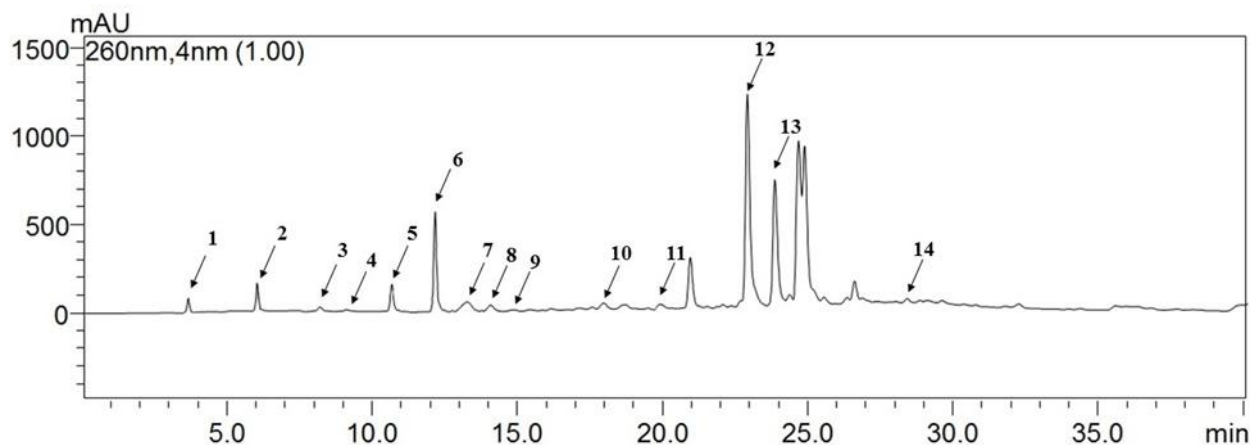
У Табели 3 су приказане добијене вредности биолошки активних једињења изолованих из *O. minimum*. Добијене вредности показују да су фенолна једињења најзаступљенија док су танини присутни у нижој концентрацији. На основу резултата може се закључити да су цветови *O. minimum* богати различитим класама биолошки активних супстанци са потенцијалном терапијском применом.

Табела 3. Укупна концентрација фенолних једињења, флавоноида и танина у цветовима биљке *O. minimum* изражена као еквивалент галне киселине (mg Ga/g екстракта) и концентрације флавоноида као еквивалента рутина (mg Ru/g екстракта).

Метаноли екстракт цветова <i>O. minimum</i>	Концентрација биоактивних једињења
Феноли	166.30 ± 0.340
Флавоноиди	65.50 ± 1.143
Танини	0.78 ± 0.330

1.1. Течна хроматографија високих перформанси

Резултати HPLC анализе показују да су цветови *O. minimum* богати различитим класама фенолних једињења, што се види по заступљености и висини пикова на HPLC MS хроматограму. Као једно од доминантних фенолних једињења изолована је кафеична киселина, а најзаступљенији флавоноиди су рутин и кверцетин-3-О-глукопиранозид док је и у значајној концентрацији присутна и хлорогенична киселина. Утврђено је присуство протокатехуичне, галне, 3,5-дихидробензоичне, сиригинске, ферулинске и р-кумаринске киселине као и кверцетина у нижим концентрацијама што се види из присуства малог броја пикова на HPLC MS хроматограму (Табела 4, Слика 27).



Слика 27. HPLC-MS укупни јонски запис метанолног екстракта цветова *O. minimum*.

Резултати линеарне регресије представљени у Табели 4. указују на добру линеарну корелацију са коефицијентима корелације (R^2) од 0.99 за сва квантификована једињења. Уочена граница детекције (LOD) је од 0.27 $\mu\text{g/ml}$ за катехин до 0.61 $\mu\text{g/ml}$ за протокатехуинску киселину, а граница квантификације (LOQ) је од 0.43 $\mu\text{g/ml}$ за кверцетин, р-кумаринску киселину и хлорогенску киселину до 0.79 $\mu\text{g/ml}$ за протокатехуинску киселину (Табела 4).

Табела 4. Укупна концентрација фенолних једињења у цветовима *O. minimum* је изражена у mg/g суве материје са HPLC карактеристикама за фенолне киселине и флавоноиде (R^2 – Коефицијент корелације; LOD – лимит детекције; LOQ – лимит квантификације).

Једињење	Ретенцион о време	Концентрациј а (mg/g)	Калибрациона крива	R^2	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
Гална киселина	3.82	0.23 ± 0.01	$y = 78475x - 527$	0.99	0.43	0.56
Протокатехуинска киселина	6.15	0.83 ± 0.03	$y = 47086x - 17132$	0.99	0.61	0.79
3,5-дихидробензоева киселина	8.23	0.14 ± 0.01	$y = 145312x + 1292$	0.99	0.39	0.54
р-хидробензоева киселина	9.29	0.16 ± 0.01	$y = 246304x - 98356$	0.99	0.59	0.71
Катехин	10.97	0.97 ± 0.03	$y = 18726x + 185$	0.99	0.27	0.48

Хлорогена киселина	12.08	6.49±0.11	$y=74207x - 12483$	0.9 9	0.29	0.43
Кафеична киселина	13.28	2.63±0.13	$y=178260x + 1607$	0.9 9	0.39	0.51
Сиригин	14.22	0.10±0.01	$y=101226x - 1682$	0.9 9	0.41	0.68
Сиригинска киселина	14.88	0.12±0.01	$y=82958x - 560$	0.9 9	0.45	0.64
р-кумаринска киселина	17.98	0.57±0.08	$y=181403x + 4072$	0.9 9	0.34	0.43
Ферулинска киселина	19.95	0.11±0.01	$y=186266x - 6449$	0.9 9	0.37	0.52
Рутин	22.91	18.96±0.37	$y=69896x + 6179$	0.9 9	0.28	0.45
Кверцетин-3-О- глюкопиранозид	23.38	9.58±0.14	$y=84932x + 6491$	0.9 9	0.29	0.47
Кверцетин	28.42	0.37±0.04	$y=85040x + 4314$	0.9 9	0.28	0.43

2. Цитотоксичност испитиваних супстанци

Цитотоксичан ефекат Орлистата и Симвастатина је праћен на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијским линијама карцинома дојке у концентрацијском распону од 1-100 $\mu\text{g/ml}$, док је ефекат *O. minimum* праћен у распону од 1-500 $\mu\text{g/ml}$ на истим ћелијама. Проценат вијабилних ћелија је одређен применом колориметријске методе - МТТ теста, а цитотоксичност је изражена преко IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) вредности која приказује концентрацију која убија 50% ћелија. Као контролне ћелије за испитивање цитотоксичности, коришћени су здрави фибробласти плућа (MRC-5).

2.1. Цитотоксичност Орлистата

На Графикону 1 је представљен ефекат Орлистата на вијабилност MDA-MB-231 ћелија карцинома дојке у односу на контролне вредности. Орлистат дозно и временски зависно смањује вијабилност тестираних ћелија карцинома дојке указујући на значајан антипролиферативни ефекат.

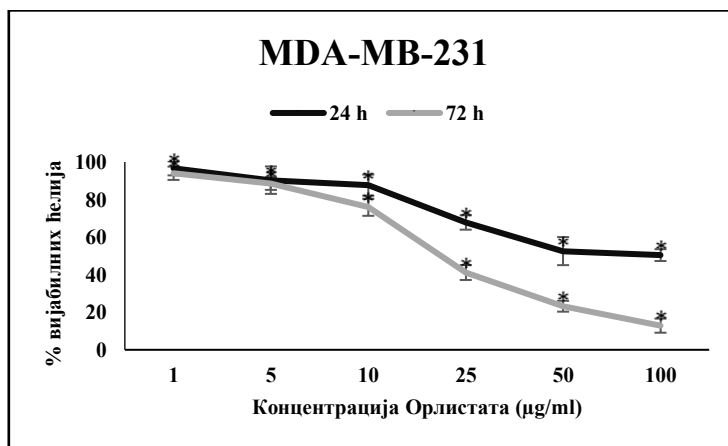
Након примене Орлистата на MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, евидентна је значајна редукција вијабилности ћелија у свим примењеним концентрацијама. Резултати показују дозно и временски зависно смањење вијабилности тестираних ћелија карцинома дојке након примене третмана (Графикон 2).

Ефекат Орлистата на вијабилност здравих MRC-5 ћелија је приказан су на Графикону 3. Резултати су показали да Орлистат само у високим дозама (50 и 100 $\mu\text{g/ml}$) статистички значајно смањује вијабилност MRC-5 ћелија 24 часа након третмана. MRC-5 ћелије се опорављају што је праћено повећаним процентом вијабилних ћелија у високим примењеним дозама Орлистата након 72 часа.

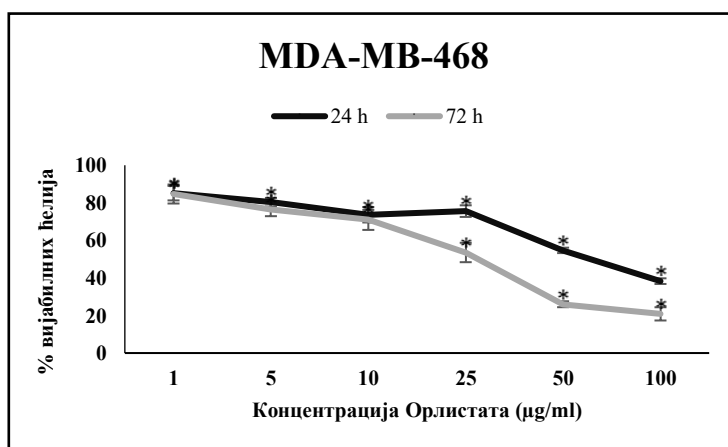
Цитотоксични ефекат Орлистата је представљен као IC_{50} вредност ($\mu\text{g/ml}$) и прерачунат на основу криве из МТТ теста, и дефинише се као концентрација која убија 50% ћелија (Табела 5). Добијене IC_{50} вредности Орлистата указују на значајну временски зависну цитотоксичност на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке. На основу приказаних IC_{50} вредности, може се закључити да Орлистат има јачи цитотоксични ефекат на MDA-MB-468 ћелије у поређењу са MDA-MB-231 ћелијама карцинома дојке. IC_{50} вредност на здравим MRC-5 ћелијама је током оба праћена времена већа од највише тестиране дозе (100 $\mu\text{g/ml}$). На основу приказаних IC_{50} вредности најмање је осетљива здрава MRC-5 ћелијска линија што говори о селективности тестираног третмана.

Табела 5. Цитотоксични ефекат Орлистата изражен преко IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) вредности на MDA-MB-231, MDA-MB-468 и MRC-5 ћелијама.

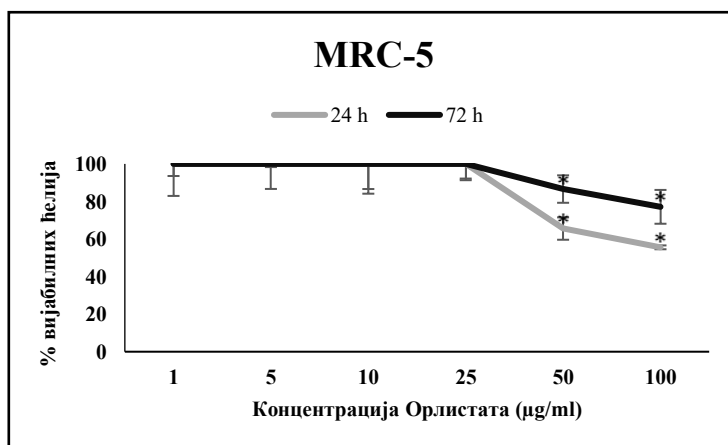
Ћелијска линија	IC_{50} вредност 24/72 h
MDA-MB-231	82.14/21.98
MDA-MB-468	60.85/27.19
MRC-5	>100/>100



Графикон 1. Ефекат Орлистата на вијабилност MDA-MB-231 ћелија карцинома дојке након 24 и 72 часа од третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.



Графикон 2. Ефекат Орлистата на вијабилност MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке након 24 и 72 часа од третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.



Графикон 3. Ефекат Орлистат на вијабилност MRC-5 здравих фибробласта након 24 и 72 часа од третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

2.2. Цитотоксичност Симвастатина

Симвастатин значајно утиче на смањење вијабилности MDA-MB-231 ћелија карцинома дојке, 24 и 72 часа од примене третмана, што је приказано на Графику 4. Резултати показују да Симвастатин има значајан дозно и временски зависан антипролиферативни ефекат у односу на контролне ћелије.

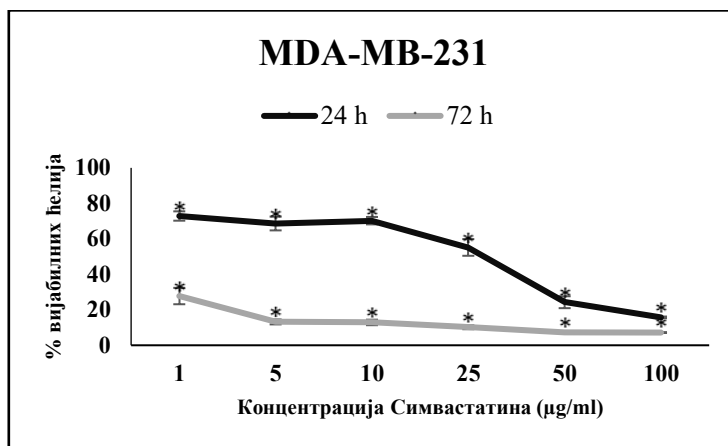
На Графикону 5 је приказан ефекат Симвастатина на MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке. Симвастатин у дозно зависном маниру, значајно смањује вијабилност MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке након 24 и 72 сата од примене третмана у односу на контролне вредности.

Ефекат Симвастатина на MRC-5 здравим ћелијама је приказан на Графикону 6. Статистички значајно смањење броја вијабилних ћелија је дозно и временски зависно у свим тестираним концентрацијама у поређењу са контролним ћелијама након примене овог третмана.

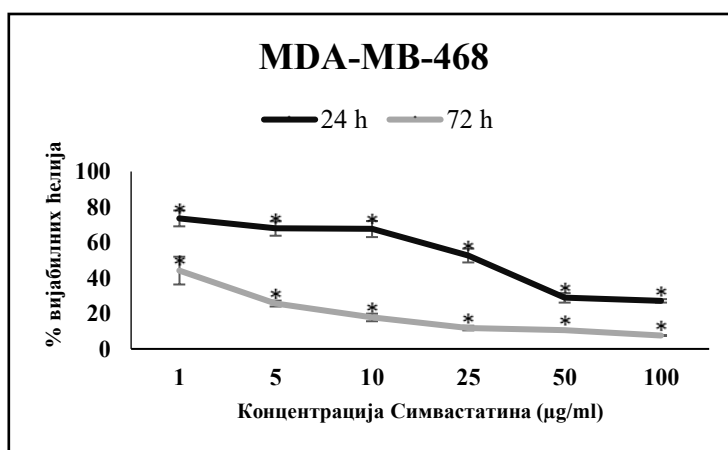
Цитотоксичност Симвастатина је такође изражена је као IC_{50} вредност ($\mu g/ml$). На основу приказаних IC_{50} вредности у Табели 6, закључује се да Симвастатин индукује значајан дозно зависан цитотоксични ефекат на обе ћелијске линије карцинома дојке. На здравим MRC-5 ћелијама, IC_{50} вредности указују да постоји такође значајан цитотоксични временски зависан ефекат. Важно је напоменути да Симвастатин индукује доминантан цитотоксични ефекат на све три испитане линије након 72 часа са IC_{50} вредношћу мањом од $1 \mu g/ml$, што је уједно и најмања тестирана концентрација. Третман са Симвастатином није показао селективност између карциномских и здравих ћелија, с обзиром да индукује значајну цитотоксичност након примене на здравој MRC-5 ћелијској линији (Табела 6).

Табела 6. Цитотоксични ефекат Симвастатина изражен преко IC_{50} ($\mu g/ml$) вредности на MDA-MB-231, MDA-MB-468 и MRC-5 ћелијама.

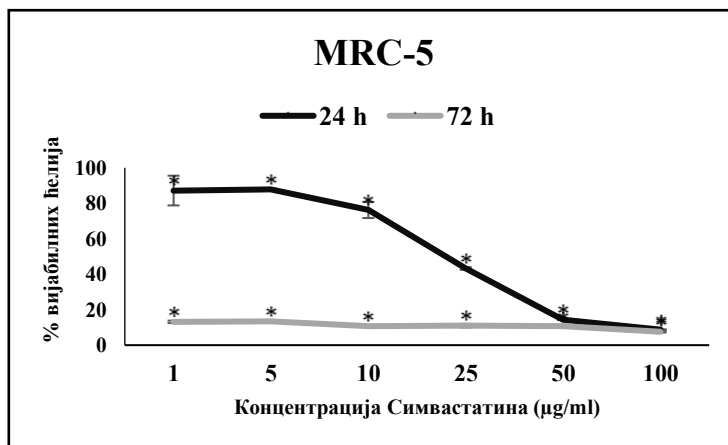
Ћелијска линија	IC_{50} вредност 24/72 h
MDA-MB-231	27.83/ <1
MDA-MB-468	26.91/<1
MRC-5	22.04/<1



Графикон 4. Ефекат Симвастатина на вијабилност MDA-MB-231 ћелија карцинома дојке након 24 и 72 часа од третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.



Графикон 5. Ефекат Симвастатина на вијабилност MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке након 24 и 72 часа од третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.



Графикон 6. Ефекат Симвастатина на вијабилност MRC-5 здравих фибробласта након 24 и 72 часа од третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

2.3. Цитотоксичност *Ocimum minimum*

Цитотоксичност третмана се процењује на основу његове способности да смањује вијабилност испитиваних ћелија. Резултати показују да третман са *O. minimum* значајно снижава вијабилност MDA-MB-231 ћелија карцинома дојке у високим концентрацијама, након 24 и 72 часа од примене третмана (Графикон 7).

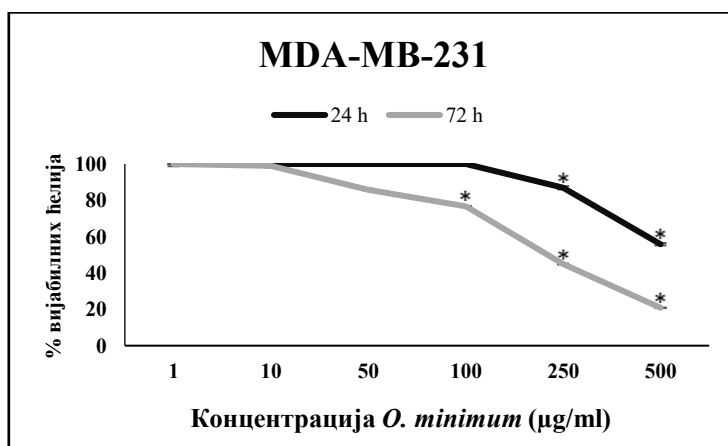
Вијабилност MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке је значајно смањена након примене *O. minimum* само у високим дозама (100 до 500 µg/ml) након 24 часа у односу на контролне ћелије. Након 72 часа тренд смањења вијабилности се наставља и у нижим тестираним концентрацијама, указујући да постоји и временски завистан ефекат. MDA-MB-468 ћелије карцинома дојке су осетљивије на третман са *O. minimum* у поређењу са MDA-MB-231 ћелијама (Графикон 8).

Резултати на MRC-5 здравим фибробластима који су коришћени као контрола за проверу цитотоксичности, показују значајну редукцију вијабилности ћелија само у највишој примењеној дози *O. minimum* (500 µg/ml) након 24 часа. Међутим, након 72 часа забележен је тренд смањења вијабилности у концентрацијском распону од 100 до 500 µg/ml. Ове ћелије су уједно и најмање осетљиве на третман са *O. minimum* (Графикон 9).

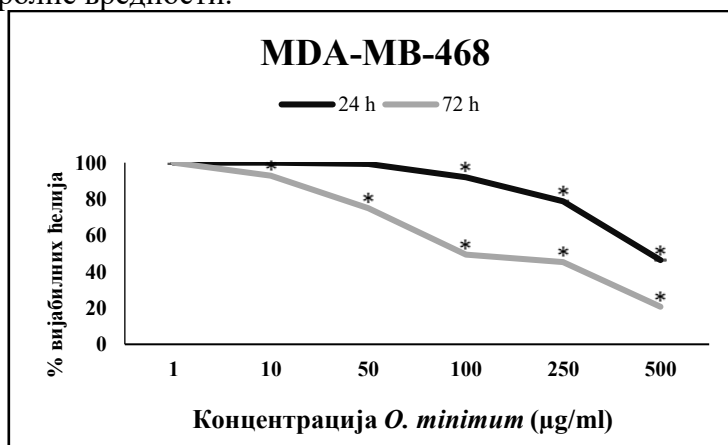
Добијене IC₅₀ вредности (Табела 7) указују на цитотоксичност *O. minimum* на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке. Упоредивши IC₅₀ вредности карциномских ћелија, закључује се да су MDA-MB-468 осетљивије на третман са *O. minimum*. На здравим MRC-5 ћелијама IC₅₀ вредност након 24 сата је већа од највише примењене дозе, док се након 72 часа незнатно снижава. На основу резултата уочава се временски зависна цитотоксичност на карциномским ћелијама, док на здравим MRC-5 ћелијама нема значајне цитотоксичности. Третман са *O. minimum* индукује и значајну селективност између тестираних карциномских и здравих ћелија.

Табела 7. Цитотоксични ефекат *O. minimum* изражен преко IC₅₀ (µg/ml) вредности на MDA-MB-231, MDA-MB-468 и MRC-5 ћелијама.

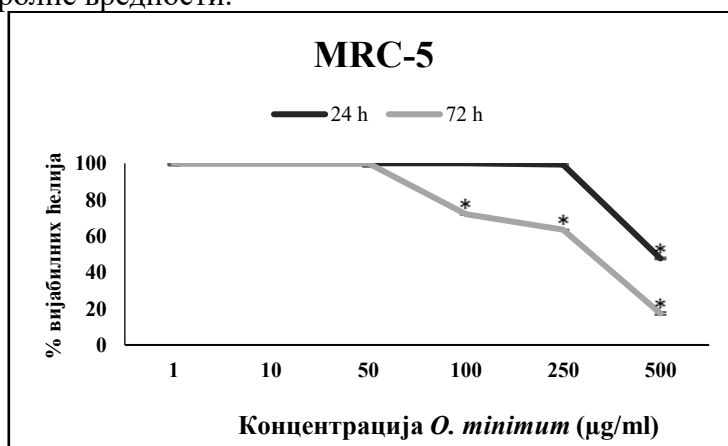
Ћелијска линија	IC ₅₀ вредност 24/72 h
MDA-MB-231	>500/215.06
MDA-MB-468	453.75/111.18
MRC-5	>500/468.83



Графикон 7. Ефекат *O. minimum* на вијабилност MDA-MB-231 ћелија карцинома дојке након 24 и 72 часа након третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.



Графикон 8. Ефекат *O. minimum* на вијабилност MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке након 24 и 72 часа након третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.



Графикон 9. Ефекат *O. minimum* на вијабилност MRC-5 здравих фибробласта након 24 и 72 часа након третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

3. Одређивање типа ћелијске смрти

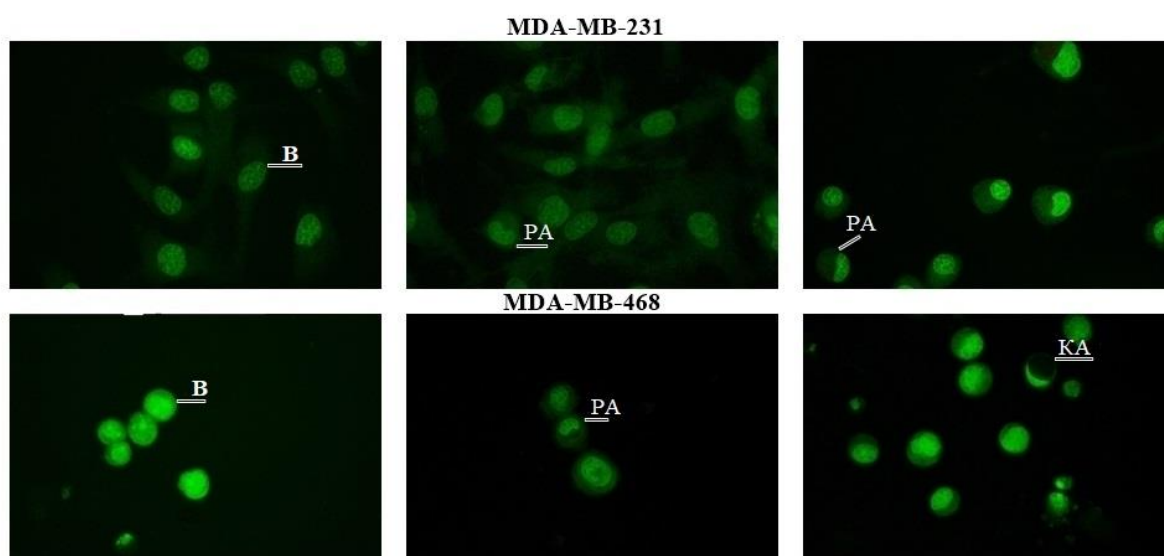
Орлистат, Симвастатин и *O. minimum* су третмани који су индуковали цитотоксичан ефекат на тестираним линијама карцинома дојке па је у даљем испитивању одређен тип ћелијске смрти АО/ЕБ микроскопском методом. Типичне морфолошке промене карактеристичне за процес апоптозе су пупљење ћелијске мембране, кондензација хроматина, фрагментација једра, смањење волумена ћелије и формирање апоптотских тела.

Орлистат у концентрацијама 1 и 25 $\mu\text{g/ml}$ изазива типичне морфолошке промене карактеристичне за рану апоптозу у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке. Рана апоптоза је доминантан тип ћелијске смрти код обе тестиране ћелијске линије карцинома дојке. Мањи проценат касне апоптозе је детектован само код MDA-MB-468 ћелија. С обзиром на приказане резултате Орлистат делује проапоптотски у ћелијским линијама карцинома дојке, 24 h након примене (Табела 8, Слика 28).

Табела 8. Проценат вијабилних, апоптотских и некротских MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке након 24 часа од примене Орлистата.

Ћелијска линија	Концентрација	Вијабилне ћелије	Рана апоптоза	Касна апоптоза	Некроза
MDA-MB-231	0	96.67 $\pm$ 0.25	3.33 $\pm$ 0.01	/	/
	1	88.62 $\pm$ 0.36	11.38 $\pm$ 0.2*	/	/
	25	84.32 $\pm$ 1.02*	13.68 $\pm$ 0.15*	/	/
MDA-MB-468	0	96.2 $\pm$ 0.007	3.79 $\pm$ 0.07	/	/
	1	86.83 $\pm$ 0.61	13.05 $\pm$ 0.5*	/	/
	25	83.31 $\pm$ 0.17*	14.68 $\pm$ 0.18*	1.48 $\pm$ 0.01*	/

Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.



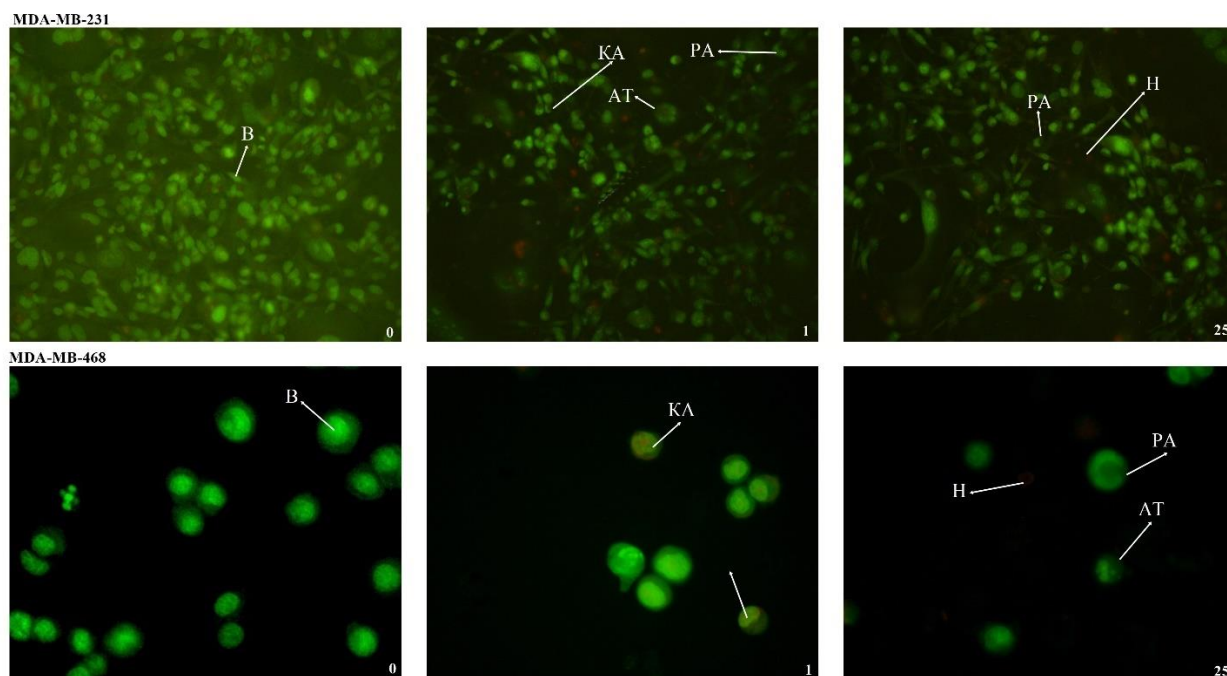
Слика 28. Ефекат Орлистата на морфологију MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке, 24 часа након примене третмана. (Вијабилне ћелије (B); Рана апоптоза (PA); Касна апоптоза (KA)).

Ефекат *Симвастатина* на проценат вијабилних MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелија приказан је у Табели 9 и на Слици 29. На микрографијама се јасно види да овај третман изазива морфолошке промене на тестираним ћелијама типичне за стадијуме ране и касне апоптозе у обе тестиране дозе. Некроза је присутна у најнижем проценту у односу на остале морфолошке промене. Рана апоптоза представља доминантан тип ћелијске смрти код ове ћелијске линије, док је значајан проценат касне апоптозе индукован у MDA-MB-468 ћелијама након примене 25 $\mu\text{g/ml}$ Симвастатина. На основу приказаних резултата закључује се да Симвастатин индукује значајан проапоптотски ефекат у тестираним ћелијама карцинома дојке.

Табела 9. Проценат вијабилних, апоптотских и некротских MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке након 24 часа од примене Симвастатина.

Ћелијска линија	Концентрација	Вијабилне ћелије	Рана апоптоза	Касна апоптоза	Некроза
MDA-MB-231	0	97.28 $\pm$ 0.01	2.72 $\pm$ 0.93	/	/
	1	87.96 $\pm$ 0.46	10.41 $\pm$ 0.25*	0.92 $\pm$ 0.14*	0.64 $\pm$ 0.001*
	25	74.75 $\pm$ 1.02*	22.08 $\pm$ 0.15*	2.67 $\pm$ 0.04*	0.48 $\pm$ 0.003*
MDA-MB-468	0	95.1 $\pm$ 0.007	4.9 $\pm$ 0.07	/	/
	1	75.91 $\pm$ 1.28*	17.43 $\pm$ 0.5*	5.18 $\pm$ 0.87*	1.48 $\pm$ 0.21*
	25	62.60 $\pm$ 0.52*	25.2 $\pm$ 0.34*	10.97 $\pm$ 0.59*	1.21 $\pm$ 0.09*

Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.



Слика 29. Ефекат Симвастатина на морфологију MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке, 24 часа након примене третмана. (Вијабилне ћелије (B); Рана апоптоза (PA); Касна апоптоза (KA); Некроза (H); Апоптотска тела (AT)).

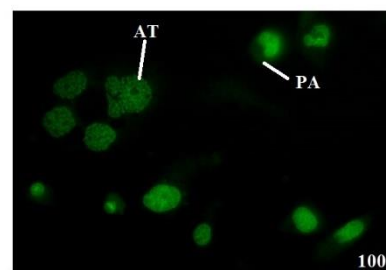
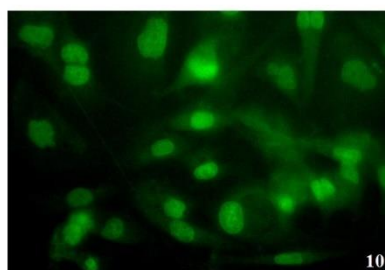
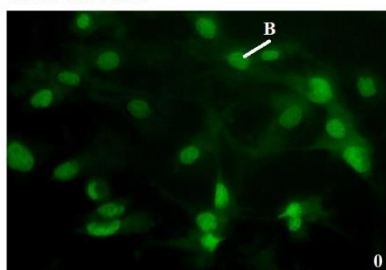
Третман са *O. minimum* изазива типичне морфолошке промене карактеристичне за процесе ране и касне апоптозе у тестираним концентрацијама од 10 и 100 $\mu\text{g/ml}$ на ћелијским линијама карцинома дојке. Доминантан тип ћелијске смрти након примене *O. minimum* представља стадијум ране апоптозе. Морфолошке промене на нивоу ране апоптозе су израженије у MDA-MB-468 ћелијама. Касна апоптоза као и некротичне промене су присутне код MDA-MB-468 ћелија у малом проценту (Табела 10, Слика 30).

Табела 10. Проценат вијабилних, апоптотских и некротских MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке након 24 часа од примене *O. minimum*.

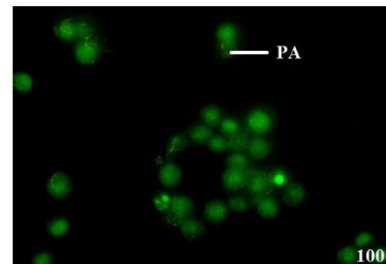
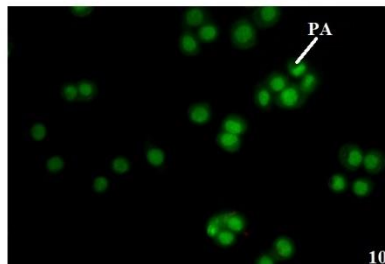
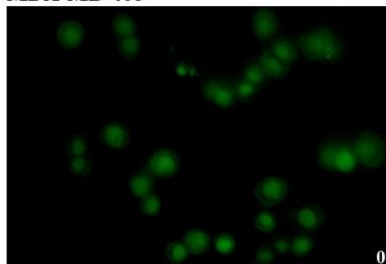
Ћелијска линија	Концентрација	Вијабилне ћелије	Рана апоптоза	Касна апоптоза	Некроза
MDA-MB-231	0	98.95 $\pm$ 0.67	1.05 $\pm$ 0.87	/	/
	10	94.44 $\pm$ 2.38	5.56 $\pm$ 0.64*	/	/
	100	92.13 $\pm$ 0.76	7.87 $\pm$ 0.39*	/	/
MDA-MB-468	0	97.89 $\pm$ 0.75	2.11 $\pm$ 1.23*	/	/
	10	95.17 $\pm$ 1.67	3.63 $\pm$ 2.06*	1.2 $\pm$ 0.52*	/
	100	87.29 $\pm$ 1.92	10.42 $\pm$ 1.81*	1.14 $\pm$ 0.16*	1.15 $\pm$ 0.26*

Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

MDA-MB-231



MDA-MB-468



Слика 30. Ефекат *O. minimum* на морфологију MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке, 24 часа након примене третмана. (Вијабилне ћелије (B); Рана апоптоза (PA); Апоптотска тела (AT)).

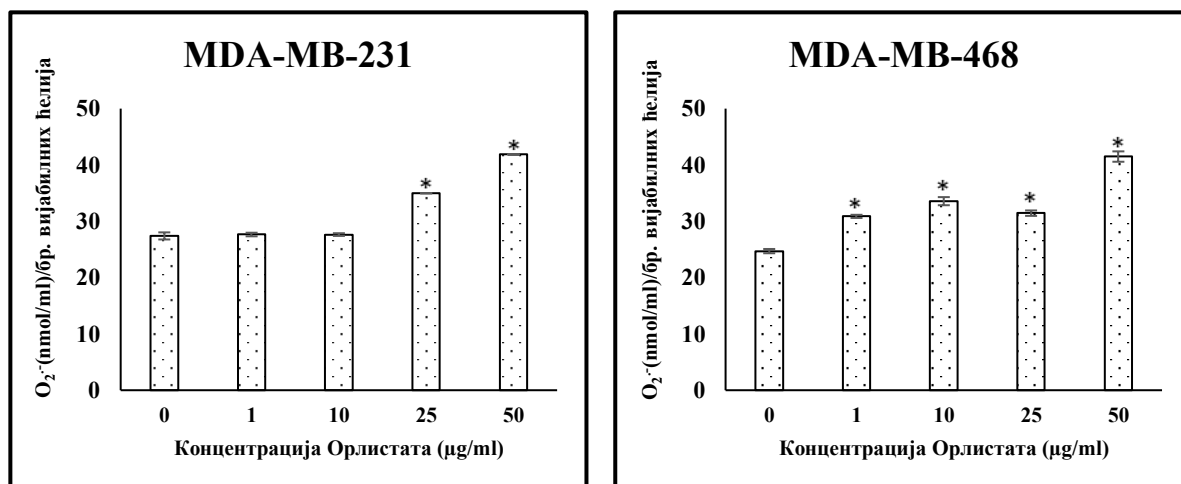
4. Испитивање параметра редокс статуса након примене третмана

У овом одељку приказани су резултати за одабране параметре редокс статуса. Испитани параметри обухватају одређивање концентрације супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$), водоник-пероксида (H_2O_2) малонилалдехида (MDA) и глутатиона (GSH) колориметријским методама након примене третмана са Орлистатом, Симвастатином и *O. minimum* на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијским линијама карцинома дојке. Резултати су праћени 24 часа након примене третмана и изражени преко процента вијабилних ћелија у појединачним концентрацијама – коришћене су добијене вредности из MTT теста.

4.1. Концентрација супероксид анјон радикала

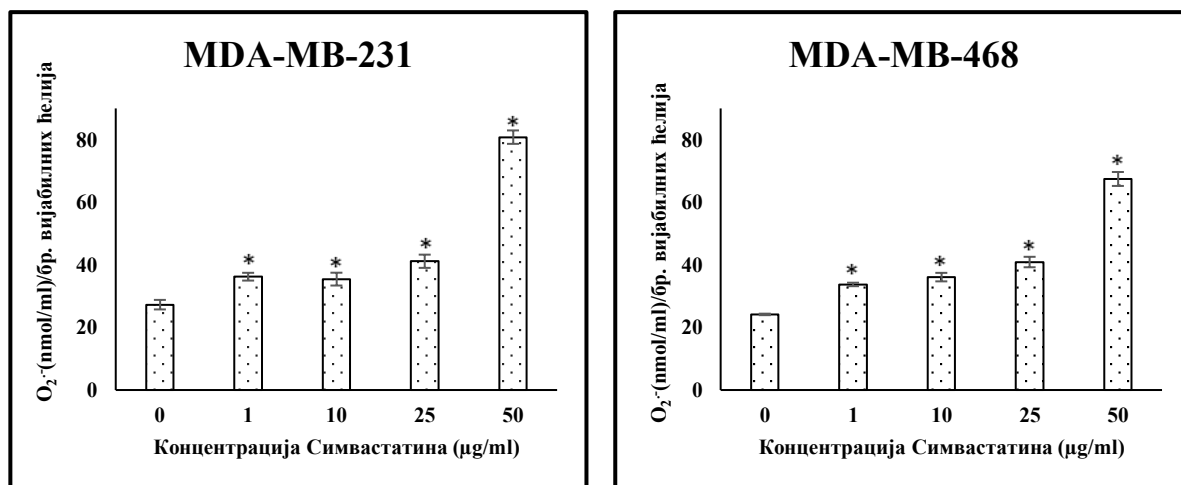
Концентрација $O_2^{\cdot-}$ у контролним MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке као и у третираним Орлистатом, Симвастатином и *O. minimum*, одређена је спектрофотометријски NBT тестом, 24 часа од третмана. Резултати су изражени преко процента вијабилних ћелија из MTT теста (nmol/ml).

На основу резултата приказаних на Графикону 10, 24 часа након примене **Орлистата**, запажа се статистички значајно повећање концентрације $O_2^{\cdot-}$ само у високим дозама (25 и 50 $\mu\text{g/ml}$) у MDA-MB-231 ћелијама карцинома дојке у односу на контролне вредности. Док је након примене Орлистата на MDA-MB-468 ћелије карцинома дојке евидентно је статистички значајно повећање концентрације $O_2^{\cdot-}$, у свим примењеним дозама у односу на контролне вредности.



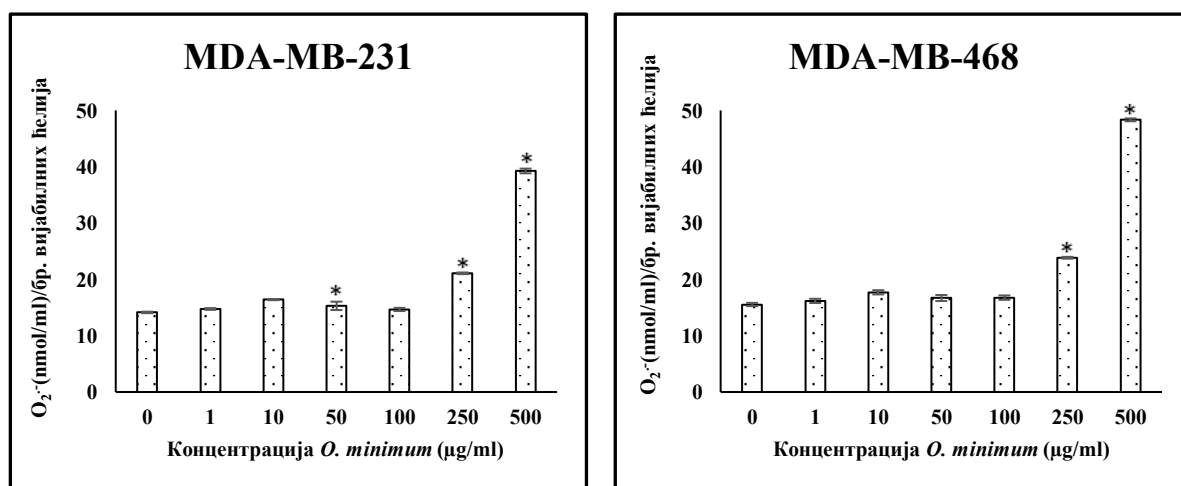
Графикон 10. Ефекат Орлистата на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке на концентрацију супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$), 24 часа након третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

На Графикону 11 је приказан ефекат **Симвастатина** на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелије карцинома дојке на концентрацију $O_2^{\cdot -}$ након 24 часа од примене третмана. На основу приказаног, Симвастатин статистички значајно повећава концентрацију $O_2^{\cdot -}$ у карциномским ћелијама у односу на контролне вредности. Што је примењена доза Симвастатина на ћелијама била већа, то се продукција $O_2^{\cdot -}$ значајно повећавала, што указује на дозно зависан ефекат.



Графикон 11. Ефекат Симвастатина на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке на концентрацију супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot -}$), 24 часа након третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

Под утицајем ***O. minimum*** концентрација $O_2^{\cdot -}$ је значајно повишена у MDA-MB-231 ћелијама карцинома дојке нарочито у вишим тестираним дозама (250 и 500 µg/ml) у односу на контролне вредности. Исти тренд повећања $O_2^{\cdot -}$ је присутан и у MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке (Графикон 12).

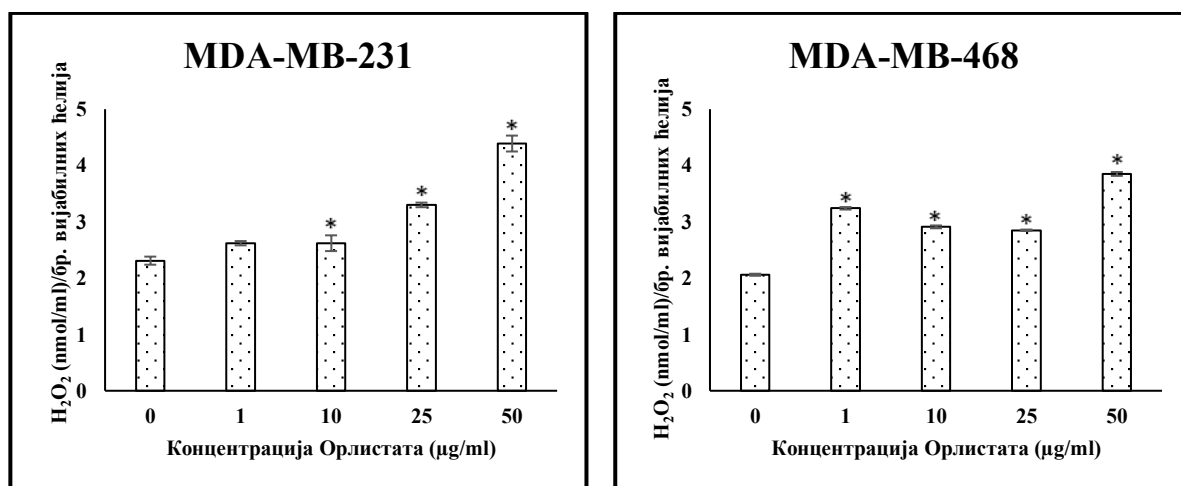


Графикон 12. Ефекат *O. minimum* на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке на концентрацију супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot -}$), 24 часа након третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

4.2. Одређивање концентрације водоник пероксида

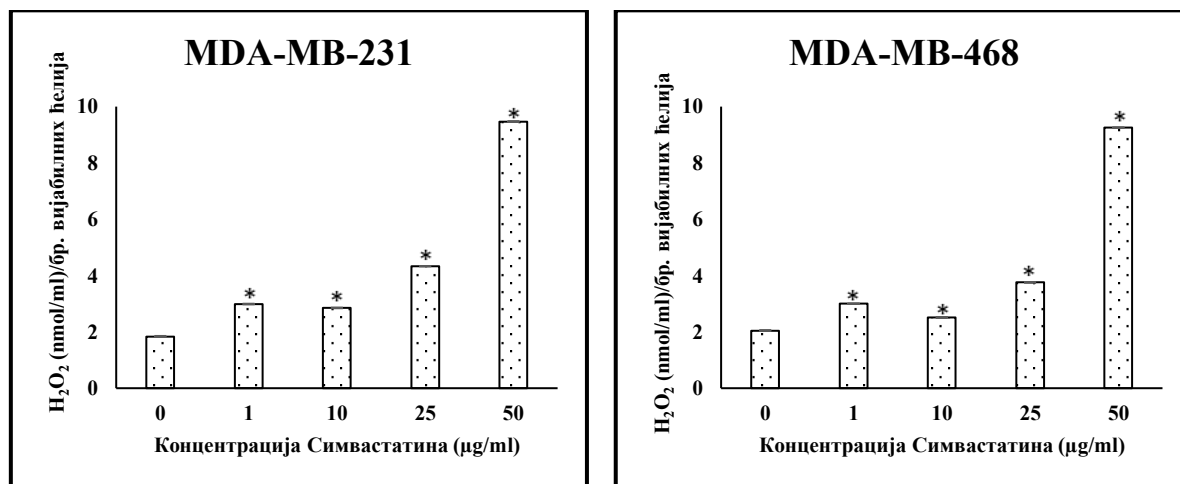
Концентрација H_2O_2 у контролним MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке као и у ћелијама третираним Орлистатом, Симвастатином и *O. minimum* одређена је спектрофотометријским тестом, 24 часа од примене третмана. Резултати су приказани преко процента вијабилних ћелија из MTT теста (nmol/ml).

Ефекат **Орлистата** на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелије карцинома дојке на концентрацију H_2O_2 је приказан на Графикону 13. На основу приказаних резултата може се закључити да Орлистат статистички значајно повећава концентрацију H_2O_2 код обе ћелијске линије карцинома дојке у односу на контролне вредности. Дозно-зависан ефекат у деловању третмана се уочава код MDA-MB-231 ћелија карцинома дојке.



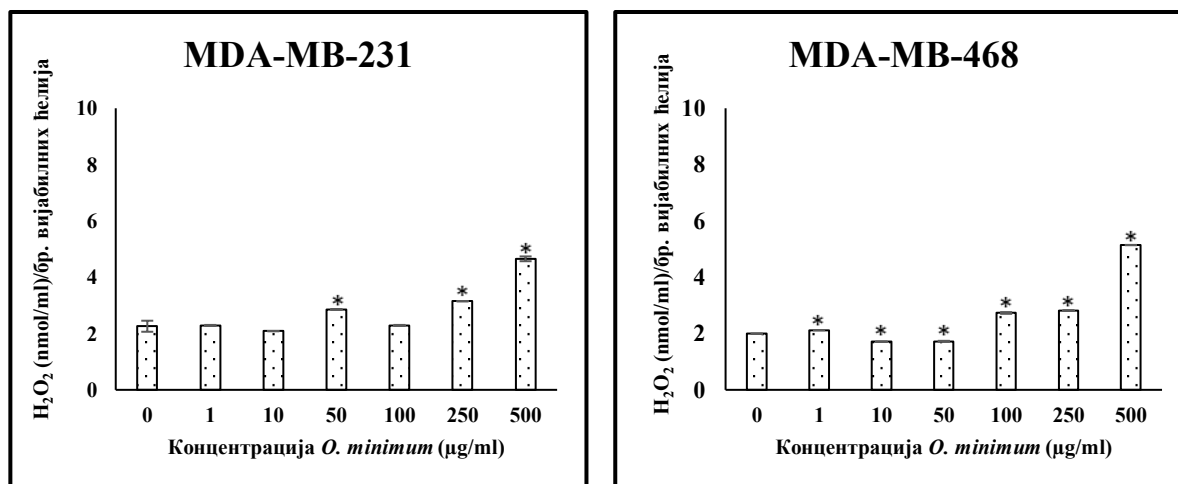
Графикон 13. Ефекат Орлистата на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке на концентрацију водоник пероксида (H_2O_2), 24 часа након примене третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

Након примене **Симвастатина** концентрација H_2O_2 се статистички значајно повећава у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке у односу на контролне вредности. Нема дозно зависног ефекта у тестиралим ћелијским линијама (Графикон 14).



Графикон 14. Ефекат Симвастатина на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке на концентрацију водоник пероксида (H_2O_2), 24 часа након примене третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

На Графикону 15 је приказан ефекат ***O. minimum*** на концентрацију H_2O_2 у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке. На основу приказаних резултата запажа се да је концентрација H_2O_2 је статистички значајно повишена у дозама од 100 до 500 µg/ml у оба типа тестиралим ћелија карцинома дојке у односу на контролне вредности. У нижим тестиралим дозама, концентрација H_2O_2 је углавном благо снижена у поређењу са контролним вредностима код обе ћелијске линије.

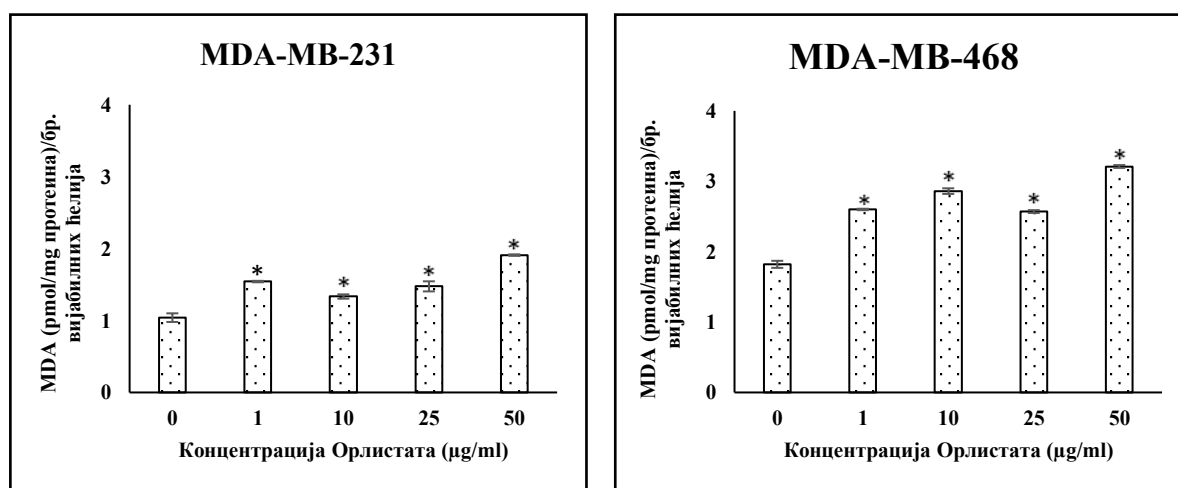


Графикон 15. Ефекат *O. minimum* на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке на концентрацију водоник пероксида (H_2O_2), 24 часа након примене третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

4.3. Одређивање концентрације малондиалдехида

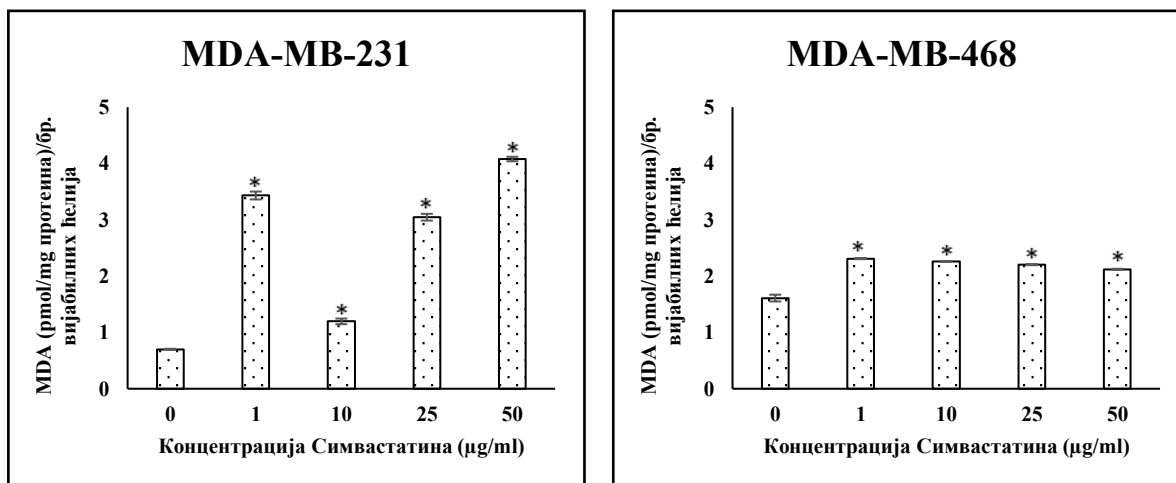
Концентрација малондиалдехида (MDA) у контролним ћелијама и MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке третираним Орлистатом, Симвастатином и *O. minimum*, одређена је спектрофотометријски TBARS тестом, 24 часа од примене третмана. Резултати су приказани коришћењем резултата који означавају проценат вијабилних ћелија из MTT теста (pmol/mg протеина).

На Графикону 16 је приказан ефекат **Орлистата** на MDA концентрацију у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке. Концентрација MDA је статистички значајно повишена код обе тестиране ћелијске линије поређењу са контролним вредностима. Резултати нису показали дозно-зависно повећање концентрације тестираног параметра.



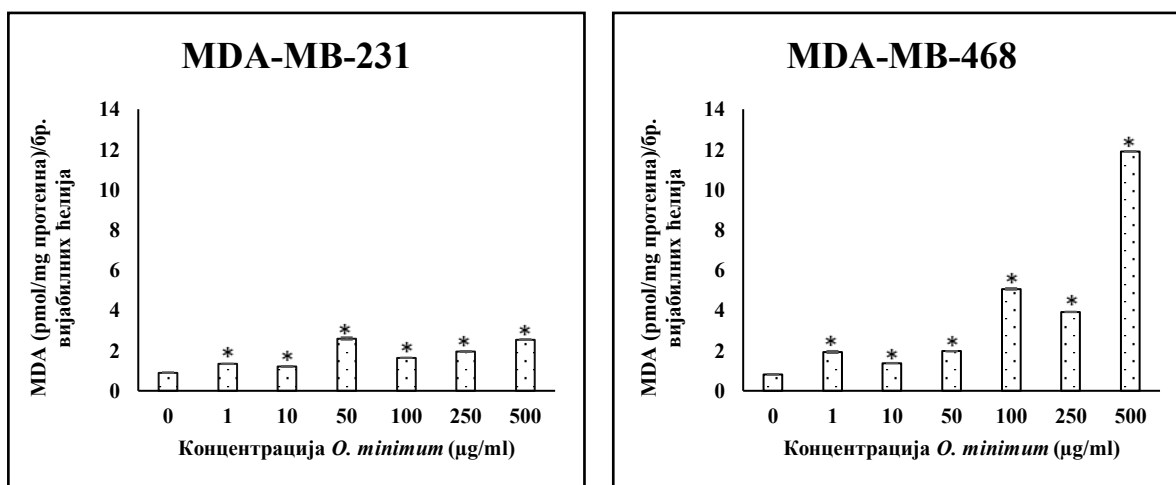
Графикон 16. Ефекат Орлистата на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијској линији карцинома дојке на концентрацију малондиалдехида (MDA), 24 часа након примене третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

Резултати сугеришу да **Симвастатин** значајно повећава концентрацију MDA у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке у односу на контролне вредности, што је и приказано на Графику 17. Није евидентирано дозно-зависно повећање праћеног параметра редокс статуса у испитиваним ћелијама.



Графикон 17. Ефекат Симвастатина на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијској линији карцинома дојке на концентрацију малондиалдехида (MDA), 24 часа након примене третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

Ефекат ***O. minimum*** на концентрацију MDA у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке приказан је на Графикону 18. Резултати су показали да ***O. minimum*** статистички значајано повећава концентрацију MDA у тестираним ћелијама карцинома дојке у поређењу са контролним вредностима.

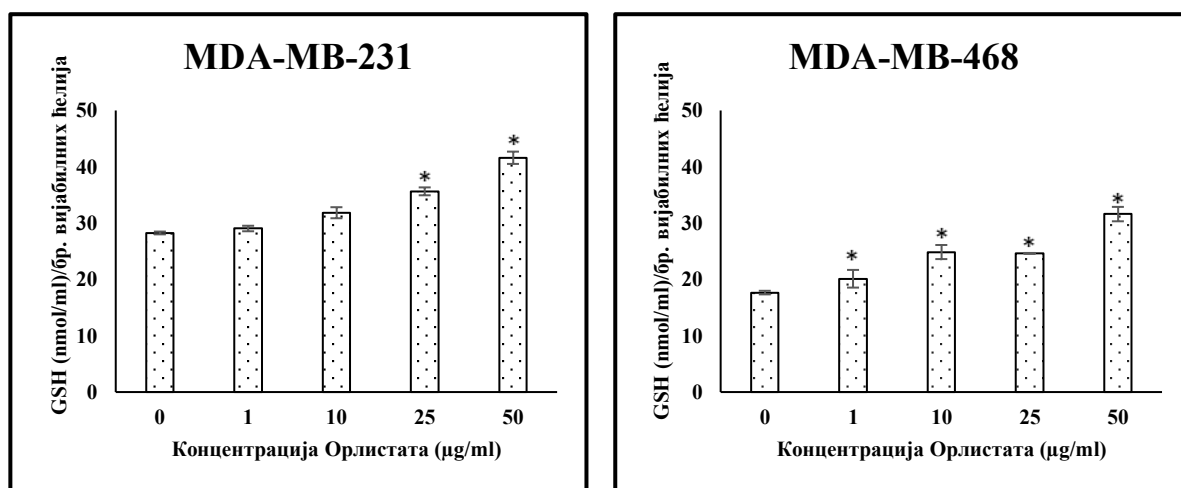


Графикон 18. Ефекат *O. minimum* на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијској линији карцинома дојке на концентрацију малондиалдехида (MDA), 24 часа након примене третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

4.4. Одређивање концентрације укупног глутатиона

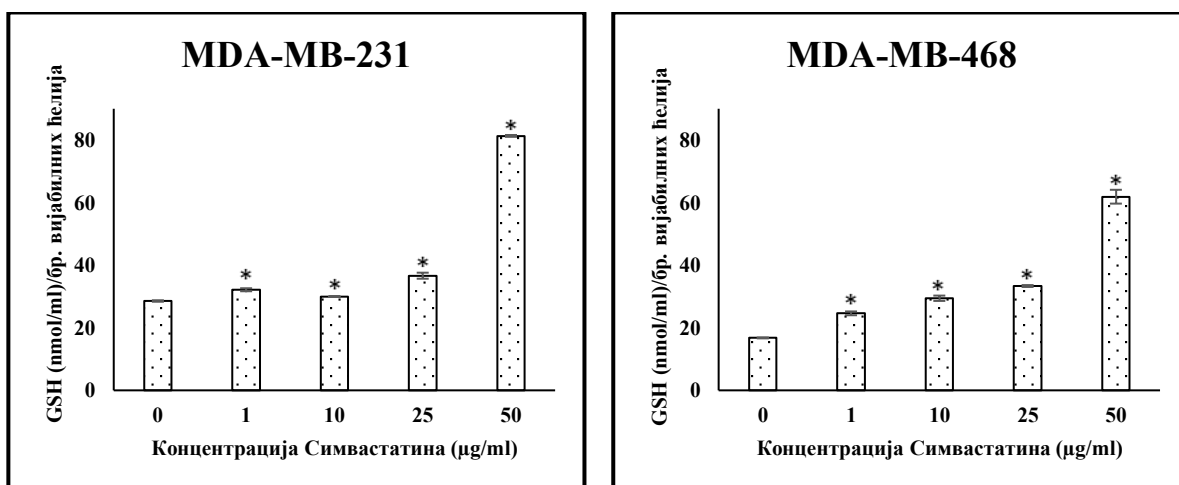
Глутатион (GSH) је компонента антиоксидационог заштитног система и његова концентрација указује на изложеност ћелија оксидативном стресу. Концентрација GSH је одређена спектрофотометријском методом, а резултати су изражени преко процента вијабилних ћелија из MTT теста (nmol/ml) након 24 часа од примене третмана.

Ефекат *Орлистата* на концентрацију GSH у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке је приказан на Графикону 19. Резултати показују да Орлистат значајно повећава концентрацију GSH у највишим тестираним дозама (25 и 50 $\mu\text{g/ml}$) у MDA-MB-231 ћелијама, док је код MDA-MB-468 ћелија повишена концентрација тестираног параметра у свим дозама у поређењу са контролним вредностима.



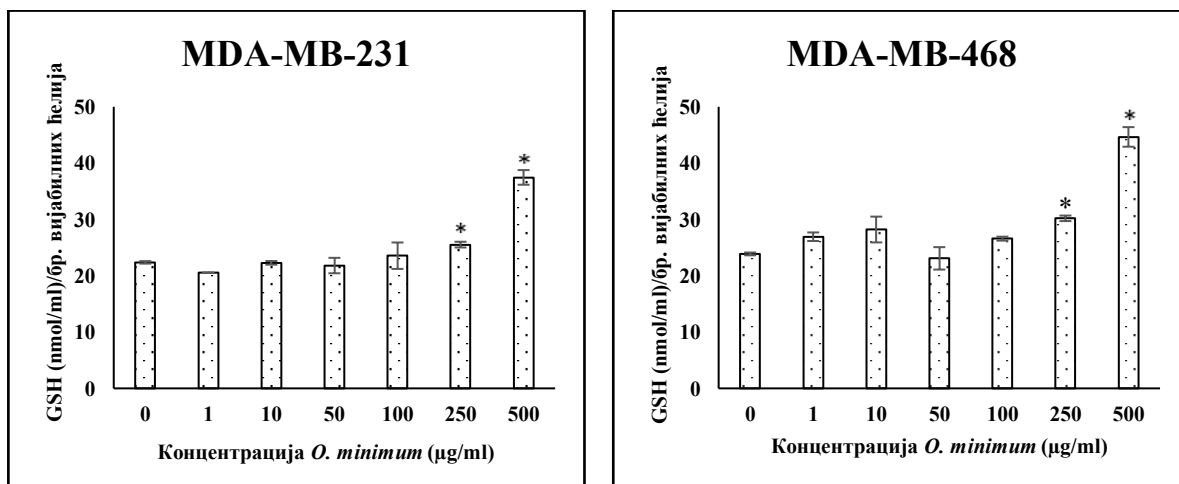
Графикон 19. Ефекат Орлистата на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијској линији карцинома дојке на концентрацију укупног глутатиона (GSH), 24 часа након примене третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

Ефекат **Симвастатина** на концентрацију GSH у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке приказан је на Графикону 20. На основу приказаних резултата Симвастатин статистички значајно повећава концентрацију GSH у тестираним ћелијама карцинома дојке у односу на контролне вредности. Симвастатин има дозно-зависан ефекат само код MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке.



Графикон 20. Ефекат Симвастатина на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијској линији карцинома дојке на концентрацију укупног глутатиона (GSH), 24 часа након примене третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

Резултати су показали да ***O. minimum*** значајно повећава концентрацију GSH у MDA-MB-231 ћелијама само у високим тестираним дозама (250 и 500 µg/ml), док је у нижим концентрацијама стабилан у односу на контролне вредности (Графикон 21). Концентрација GSH у MDA-MB-468 ћелијама је статистички значајно повишена у свим тестираним дозама у односу на контролне вредности.



Графикон 21. Ефекат *O. minimum* на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијској линији карцинома дојке на концентрацију укупног глутатиона (GSH), 24 часа након примене третмана. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

5. Концентрација укупних липида

Концентрација укупних липида је одређена спектрофотометријски Сулфованилин колориметријском методом у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 часа од примене третмана. Резултати су приказани у $\mu\text{g/ml}$.

Ефекат **Орлистата** на концентрацију укупних липида у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 часа од примене третмана приказан је у Табели 11. На основу добијених резултата закључује се да Орлистат статистички значајно дозно-зависно снижава концентрацију укупних липида у тестираним ћелијама карцинома дојке у односу на контролне вредности.

Табела 11. Концентрација укупних липида у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 часа од примене Орлистата.

Ћелијска линија	Орлистат ($\mu\text{g/ml}$)		
	0	1	25
MDA-MB-231	2.41 ± 0.14	$1.62 \pm 0.02^*$	$1.46 \pm 0.001^*$
MDA-MB-468	1.72 ± 0.023	$1.55 \pm 0.037^*$	$1.43 \pm 0.014^*$

Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. $*p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

Концентрација укупних липида у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 часа од примене **Симвастатина** је статистички значајно снижена у односу на контролне вредности (Табела 12). Дозно-зависни ефекат Симвастатина на концентрацију укупних липида је детектован само у MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке.

Табела 12. Концентрација укупних липида у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 часа од примене Симвастатина.

Ћелијска линија	Симвастатин ($\mu\text{g/ml}$)		
	0	1	25
MDA-MB-231	2.04 ± 0.028	$1.81 \pm 0.011^*$	$1.85 \pm 0.018^*$
MDA-MB-468	1.67 ± 0.053	$1.33 \pm 0.095^*$	$1.24 \pm 0.022^*$

Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. $*p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

У Табели 13 су приказани резултати концентрације укупних липида у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама након примене **O. minimum**. На основу приказаних резултата закључује се да *O. minimum* значајно снижава концентрацију укупних липида у обе тестиране ћелијске линије карцинома дојке у односу на контролне вредности. Дозно-зависан ефекат *O. minimum* на концентрацију укупних липида је забележен само код MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке.

Табела 13. Концентрација укупних липида у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 часа од примене *O. minimum*.

Ћелијска линија	<i>Ocimum minimum</i> ($\mu\text{g/ml}$)		
	0	10	100
MDA-MB-231	2.03 $\pm$ 0.038	1.87 $\pm$ 0.016*	1.92 $\pm$ 0.013*
MDA-MB-468	1.72 $\pm$ 0.053	1.49 $\pm$ 0.064*	1.45 $\pm$ 0.09*

Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

6. Релативна експресија информационе РНК

У овом поглављу приказани су резултати експресије гена укључених у процесе биосинтезе масних киселина (*ACLY*, *ACC*, *FASN*, *MAGL*) и ангиогенезе (*HIF-1 α* , *MMP-9*, *VEGF-A*, *CXCL-12*) у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке. Ћелије карцинома дојке су третиране: Орлистатом и Симвастатином (у концентрацијама од 1 и 25 $\mu\text{g/ml}$) и *O. minimum* (у концентрацијама од 10 и 100 $\mu\text{g/ml}$). Релативна генска експресија је праћена на третираним ћелијама а резултати су анализирани 24 сата од примене третмана коришћењем $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ математичке формуле.

6.1. Релативна експресија информационе РНК за гене процеса биосинтезе масних киселина

Орлистат инхибира релативну експресију иРНК гена који учествују у синтези масних киселина у обе ћелијске линије карцинома дојке (Табела 14). Промене на нивоу експресија иРНК су статистички значајне у односу на контролне вредности.

Табела 14. Ефекат *Орлистата* на експресију иРНК гена укључених у процес биосинтезе масних киселина (*ACLY*, *ACC*, *FASN*) у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, након 24 часа од третмана.

Ћелијска линија	Орлистат ($\mu\text{g/ml}$)			
		<i>ACLY</i>	<i>ACC</i>	<i>FASN</i>
MDA-MB-231	0	1	1	1
	1	0.73 $\pm$ 0.001*	0.0009 $\pm$ 0.00001*	0.09 $\pm$ 0.004*
	25	0.35 $\pm$ 0.001*	0.00001 $\pm$ 0.000003*	0.80 $\pm$ 0.009*
MDA-MB-468	1	0.042 $\pm$ 0.0006*	0.89 $\pm$ 0.005*	0.15 $\pm$ 0.005*
	25	0.049 $\pm$ 0.0004*	0.97 $\pm$ 0.008*	0.47 $\pm$ 0.004*

Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ СТАНДАРДНА ГРЕШКА из три независна експеримента; * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролу (*β -actin* је референтни ген за нормализацију генске експресије).

Након примене **Симвастатина** релативна експресија иРНК гена укључених у процес синтезе масних киселина (*ACLY*, *ACC*, *FASN*) у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке се статистички значајно снижава у односу на контролне вредности (Табела 15).

Табела 15. Ефекат *Симвастатина* на експресију иРНК гена укључених у процес синтезе масних киселина (*ACLY*, *ACC*, *FASN*) у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, након 24 часа од примене третмана.

Ћелијска линија	<i>Симвастатин</i> ($\mu\text{g/ml}$)			
		<i>ACLY</i>	<i>ACC</i>	<i>FASN</i>
MDA-MB-231	0	1	1	1
	1	0.25 $\pm$ 0.001*	0.0001 $\pm$ 0.00001*	0.47 $\pm$ 0.002*
	25	0.68 $\pm$ 0.001*	0.00008 $\pm$ 0.000001*	0.92 $\pm$ 0.001*
MDA-MB-468	1	0.031 $\pm$ 0.001*	0.9 $\pm$ 0.002*	0.27 $\pm$ 0.001*
	25	0.21 $\pm$ 0.002*	0.32 $\pm$ 0.001*	0.52 $\pm$ 0.001*

Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка из три независна експеримента; * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролу (β -actin је референтни ген за нормализацију генске експресије).

У Табели 16 су приказане вредности релативне експресије иРНК гена укључених у процес синтезе масних киселина након примене *O. minimum* на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке. Биљни третман индукује статистички значајно смањење експресије *ACLY*, *ACC*, *FASN* гена у обе испитиване ћелијске линије у односу на контролне вредности.

Табела 16. Ефекат екстракта биљке *O. minimum* на експресију иРНК гена укључених у метаболизам масних киселина (*ACLY*, *ACC*, *FASN*) у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, након 24 часа од примене третмана.

Ћелијска линија	<i>O. minimum</i> ($\mu\text{g/ml}$)			
		<i>ACLY</i>	<i>ACC</i>	<i>FASN</i>
MDA-MB-231	0	1	1	1
	10	0.008 $\pm$ 0.0002*	0.004 $\pm$ 0.0001*	0.42 $\pm$ 0.02*
	100	0.022 $\pm$ 0.0015*	0.003 $\pm$ 0.0002*	0.33 $\pm$ 0.01*
MDA-MB-468	10	0.25 $\pm$ 0.001*	0.15 $\pm$ 0.01*	0.004 $\pm$ 0.0008*
	100	0.02 $\pm$ 0.0001*	0.72 $\pm$ 0.01*	0.118 $\pm$ 0.007*

Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка из три независна експеримента; * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролу (β -actin је референтни ген за нормализацију генске експресије).

6.2. Релативна експресија информационе РНК за гене процеса ангиогенезе

Релативна експресија иРНК гена укључених у процес ангиогенезе након примене **Орлистата** у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке је приказана у Табели 17. Орлистат снижава експресију тестираних гена у обе ћелијске линије карцинома дојке. Промене на нивоу генске експресије су статистички значајне у односу на контролне вредности.

Табела 17. Ефекат *Орлистата* на експресију иРНК гена укључених у процес ангиогенезе (*HIF-1α*, *MMP-9*, *VEGF-A*, *CXCL-12*) у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, након 24 часа од третмана.

Ћелијска линија	Орлистат (μg/ml)				
		<i>HIF-1α</i>	<i>VEGF-A</i>	<i>MMP-9</i>	<i>CXCL-12</i>
MDA-MB-231	0	1	1	1	1
	1	0.03±0.001*	0.47±0.004*	0.002±0.0001*	0.03±0.002*
	25	0.048±0.0005*	0.33±0.006*	0.008±0.0001*	0.02±0.005*
MDA-MB-468	1	0.087±0.001*	0.053±0.002*	0.0001±0.00001*	0.001±0.0002*
	25	0.11±0.010*	0.13±0.003*	0.0009±0.00001*	0.006±0.0004*

Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента; * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролу (*β-actin* је референтни ген за нормализацију генске експресије).

Симвастатин утиче на промену нивоа експресије иРНК гена укључених у процес ангиогенезе (*HIF-1α*, *MMP-9*, *VEGF-A*, *CXCL-12*) у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, а резултати су приказани у Табели 18. Сви праћени параметри су статистички значајно снижени у тестираним карциномским ћелијама у односу на контролне вредности.

Табела 18. Ефекат *Симвастатина* на експресију иРНК гена укључених у процес ангиогенезе (*HIF-1α*, *MMP-9*, *VEGF-A*, *CXCL-12*) у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, након 24 часа од третмана.

Ћелијска линија	Симвастатин (μg/ml)				
		<i>HIF-1α</i>	<i>VEGF-A</i>	<i>MMP-9</i>	<i>CXCL-12</i>
MDA-MB-231	0	1	1	1	1
	1	0.007±0.005*	0.48±0.004*	0.13±0.002*	0.004±0.002*
	25	0.033±0.0005*	0.62±0.006*	0.31±0.008*	0.01±0.005*
MDA-MB-468	1	0.18±0.001*	0.14±0.002*	0.19±0.0001*	0.027±0.0002*
	25	0.30±0.010*	0.36±0.003*	0.007±0.0009*	0.037±0.0004*

Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента; * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролу (*β-actin* је референтни ген за нормализацију генске експресије).

Ефекат ***O. minimum*** на ниво релативне експресије иРНК гена укључених у процес ангиогенезе (*HIF-1α*, *MMP-9*, *VEGF-A*, *CXCL-12*) је приказан у Табели у 19. На основу приказаних резултата *O. minimum* статистички значајно смањује експресију гена у обе ћелијске линије карцинома дојке у односу на контролне вредности.

Табела 19. Ефекат екстракта биљке *O. minimum* на експресију иРНК гена укључених у процес ангиогенезе (*HIF-1 α* , *MMP-9*, *VEGF-A*, *CXCL-12*) у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, након 24 часа од третмана.

Ћелијска линија	<i>Ocimum minimum</i> ($\mu\text{g/ml}$)				
		<i>HIF-1α</i>	<i>MMP-9</i>	<i>VEGF-A</i>	<i>CXCL-12</i>
MDA-MB-231	0	1	1	1	1
	10	0.018 $\pm$ 0.002*	0.011 $\pm$ 0.02*	0.55 $\pm$ 0.009*	0.015 $\pm$ 0.034*
	100	0.028 $\pm$ 0.003*	0.037 $\pm$ 0.01*	0.28 $\pm$ 0.002*	0.035 $\pm$ 0.0007*
MDA-MB-468	10	0.072 $\pm$ 0.0015*	0.002 $\pm$ 0.0008*	0.0017 $\pm$ 0.003*	0.00051 $\pm$ 0.000045*
	100	0.014 $\pm$ 0.001*	0.24 $\pm$ 0.007*	0.0023 $\pm$ 0.0008*	0.130 $\pm$ 0.0004*

Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка из три независна експеримента; * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролу (*β -actin* је референтни ген за нормализацију генске експресије).

7. Експресија протеина

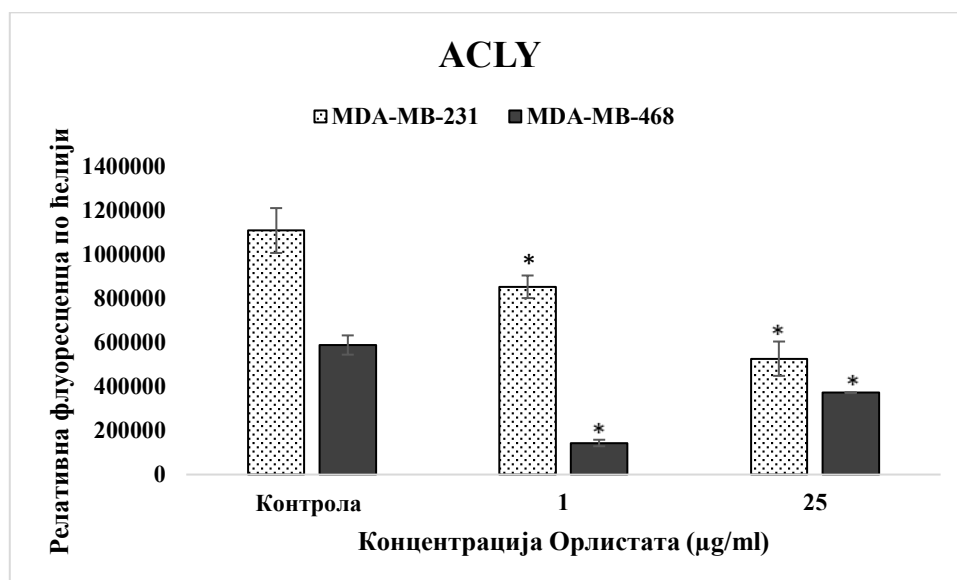
У овом поглављу приказани су резултати протеинске експресије параметара укључених у процес метаболизма масних киселина (ACLY, ACC, FASN) и ангиогенезе (VEGF, MMP-9 и CXCR-4) у ћелијама карцинома дојке (MDA-MB-231 и MDA-MB-468) третираним Орлистатом, Симвастатином (1 и 25 $\mu\text{g/ml}$) и *O. minimum* (10 и 100 $\mu\text{g/ml}$), 24 часа након примене третмана. Експресија протеина је детектована имунофлуоресцентном методом и квантификована помоћу ImageJ програма.

7.1. Експресија протеина укључених у биосинтезу масних киселина

Ефекат *Орлистата* на ниво протеинске експресије **ACLY**-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке приказан је на Графикону 22 и Слици 31. На основу приказаних резултата Орлистат статистички значајно снижава ниво испитиваног протеина у обе ћелијске линије карцинома дојке у односу на контролне вредности. Дозно-зависни ефекат Орлистата је запажен у MDA-MB-231 ћелијама карцинома дојке.

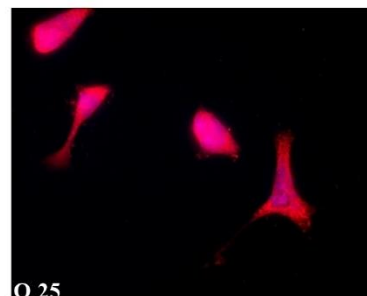
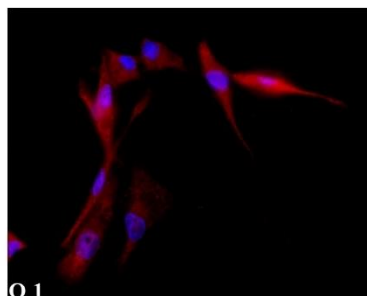
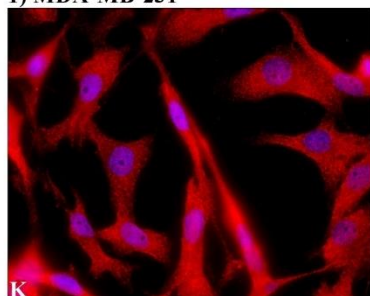
На микрографијама је приказан ефекат Орлистата на ниво протеинске експресије **ACC** у тестираним ћелијама карцинома дојке (Слика 32, Графикон 23). На основу резултата може се закључити да је Орлистат статистички значајно снизио ниво ACC протеина у ћелијама карцинома дојке у односу на контролне вредности. Дозно-зависно смањење експресије тестираног параметра је присутно код MDA-MB-231 ћелија карцинома дојке.

На Графикону 24 и Слици 33 је приказан ефекат Орлистата на експресију **FASN** протеина у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке. Анализирањем резултата флуоресценције, Орлистат статистички значајно, дозно-зависно снижава ниво протеинске експресије FASN код обе ћелијске линије карцинома дојке у односу на контролне вредности.

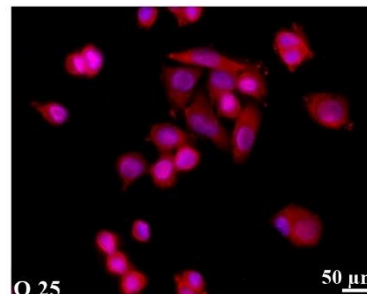
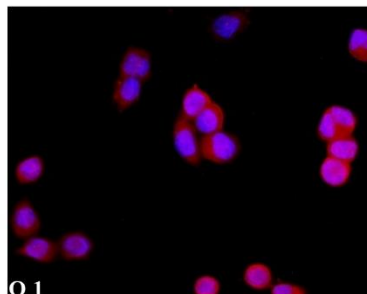
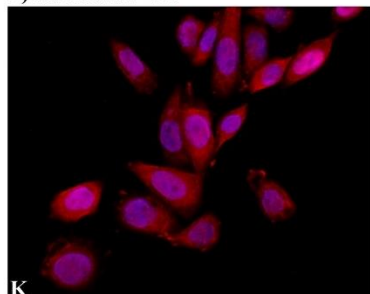


Графикон 22. Ниво протеинске експресије ACLY-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Орлистата. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

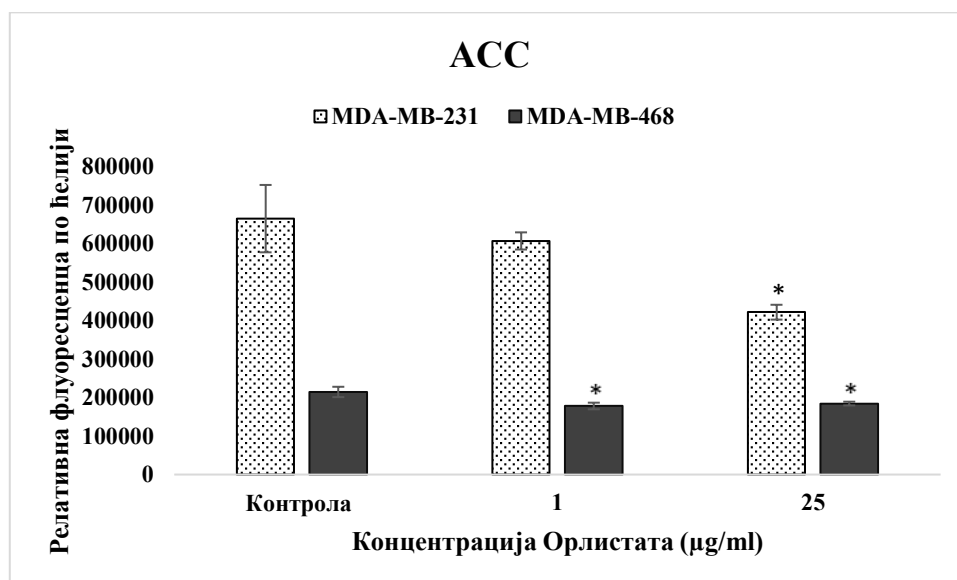
1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

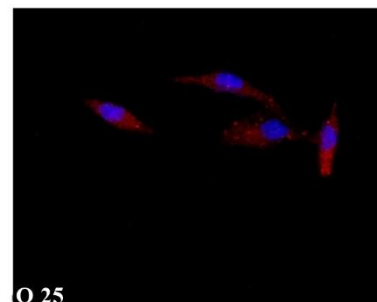
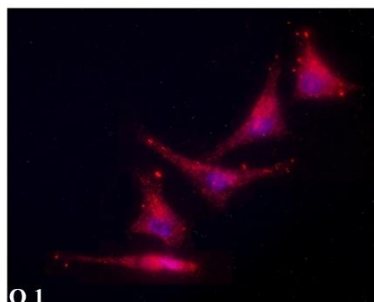
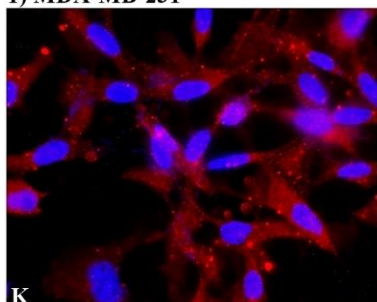


Слика 31. Протеинска експресија ACLY-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Орлистата, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI), ACLY је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

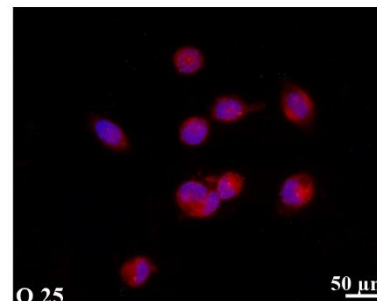
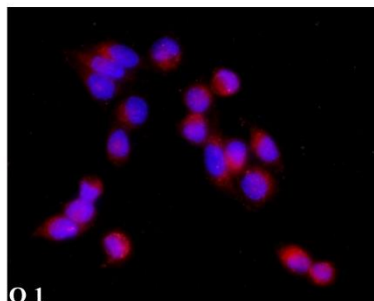
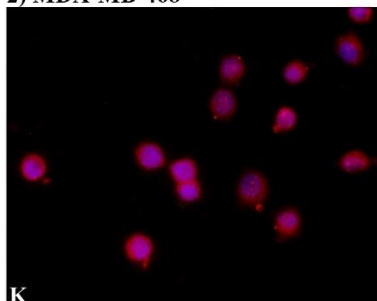


Графикон 23. Ниво протеинске експресије ACC-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Орлистата. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

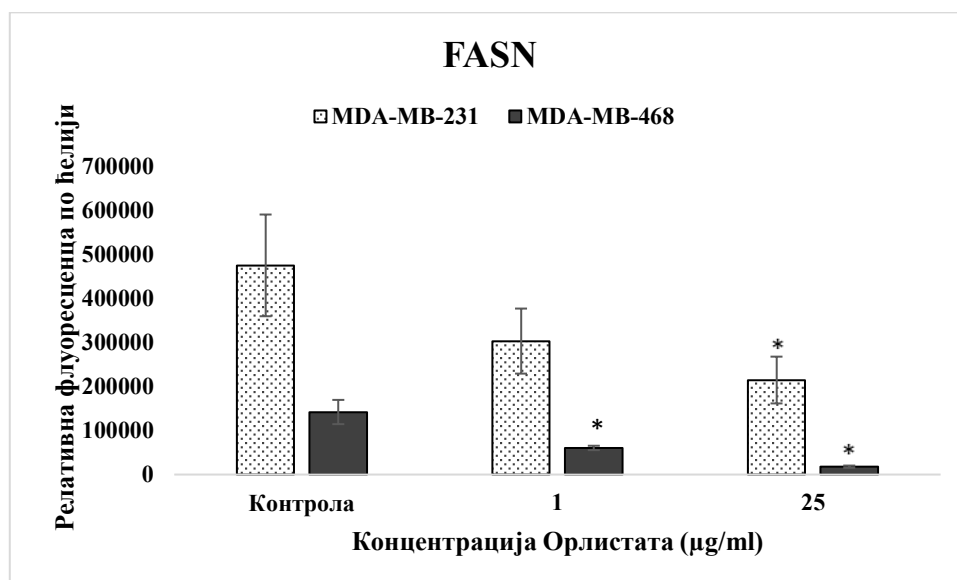
1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

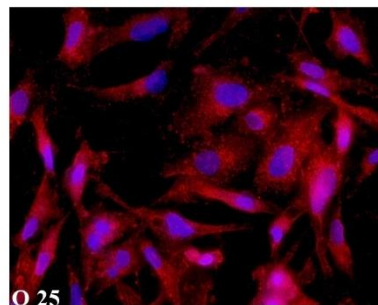
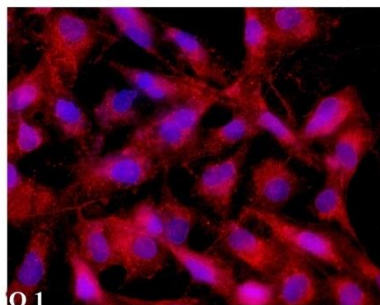
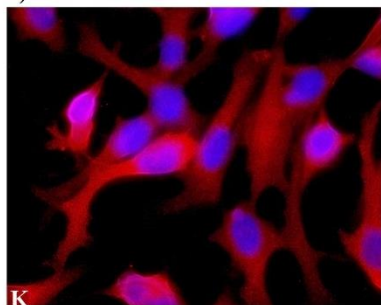


Слика 32. Протеинска експресија ACC-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Орлистата, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI), ACC је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

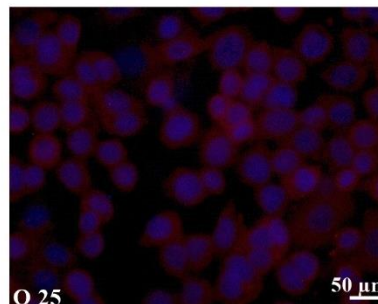
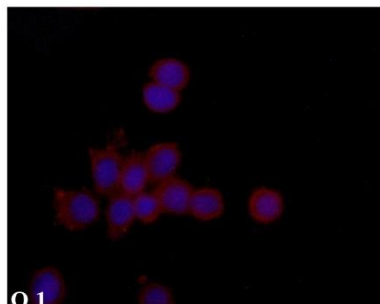
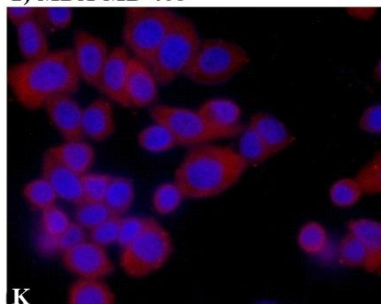


Графикон 24. Ниво протеинске експресије FASN у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Орлистата, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

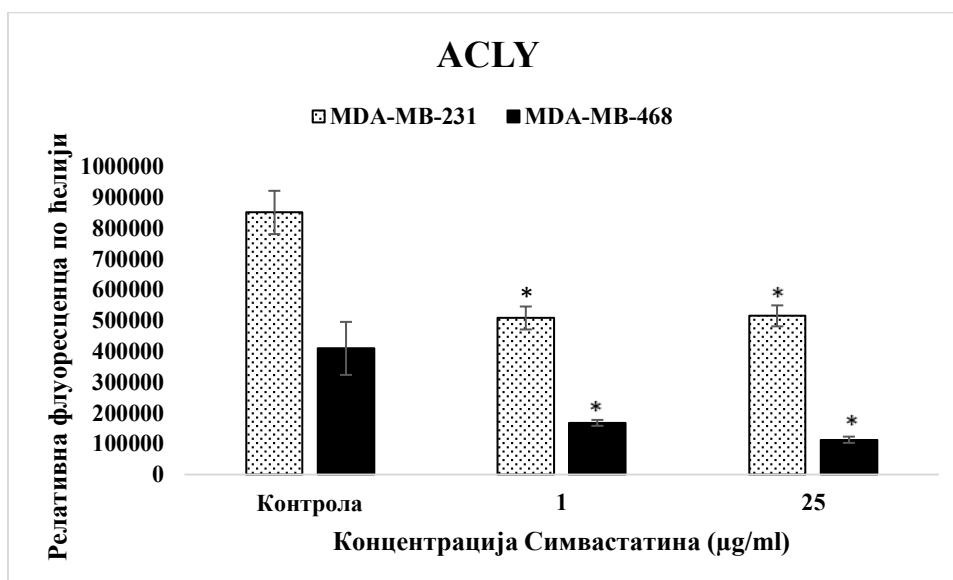


Слика 33. Протеинска експресија FASN-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Орлистата, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI), FASN је црвено обојен (секундарно антителио конјуговано са Cy3).

Ефекат **Симвастатина** на ниво протеинске експресије **ACLY** у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке је приказан на Графикону 25 и Слици 34. Симвастатин статистички значајно снижава експресију овог протеина у ћелијама карцинома дојке у односу на контролне вредности. Дозно-зависан ефекат Симвастатина је забележен код MDA-MB-468 ћелија карцинома дојке.

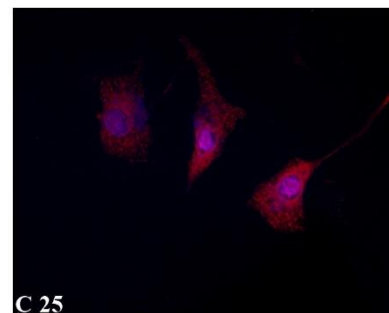
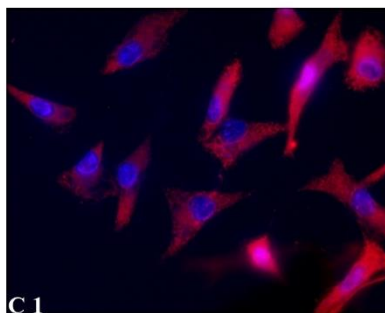
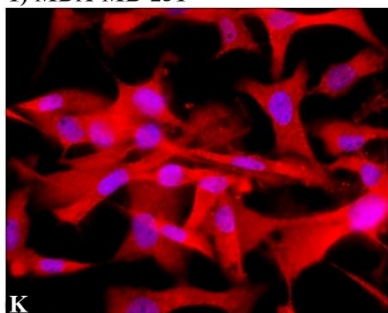
На микрографијама је приказана протеинска експресија **ACC**-а под утицајем Симвастатина у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке. Анализом интензитета флуоресценције може се закључити да Симвастатин статистички значајно дозно-зависно снижава експресију **ACC**-а код обе ћелијске линије карцинома дојке у односу на контролне вредности (Графикон 26, Слика 35).

На Графикону 27 и Слици 36 је приказан ефекат Симвастатина на ниво протеинске експресије **FASN** у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке. На основу приказаних резултата закључује се да Симвастатин значајно смањује ниво протеинске експресије **FASN**-а обе ћелијске линије карцинома дојке у односу на контролне вредности.

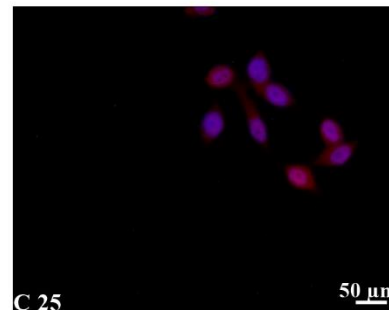
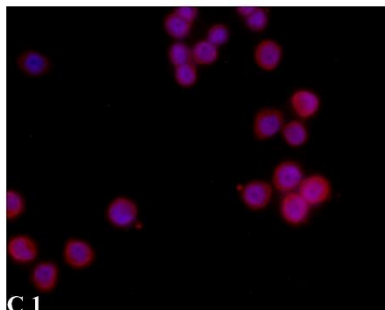
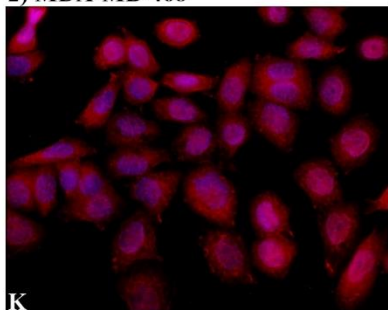


Графикон 25. Ниво протеинске експресије ACLY-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Симвастатина, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

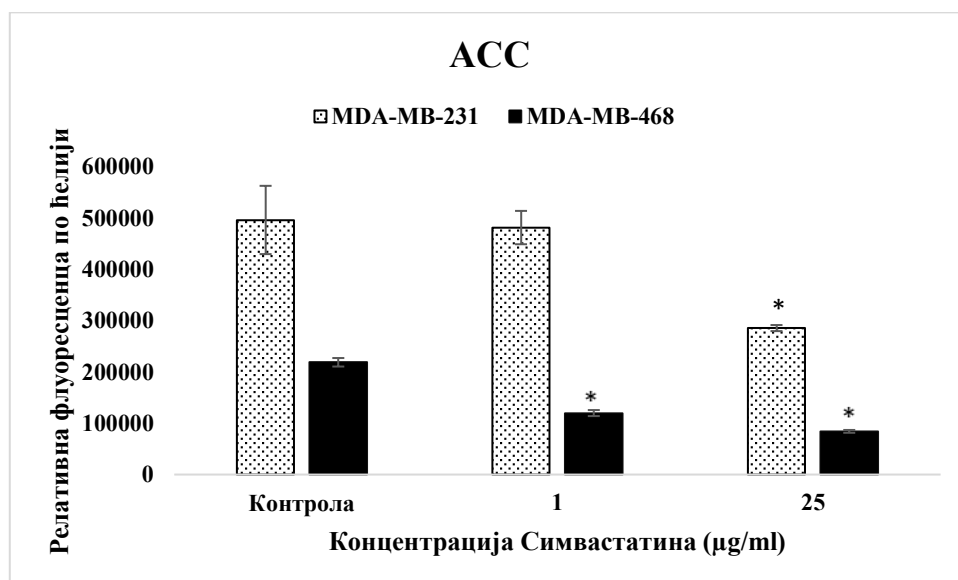
1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

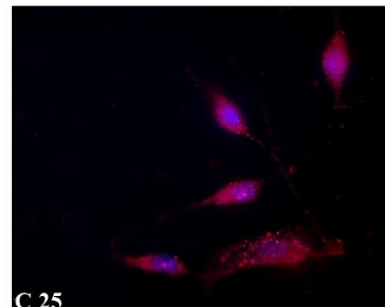
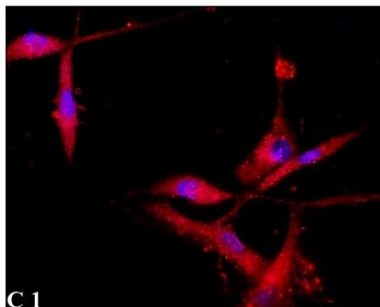
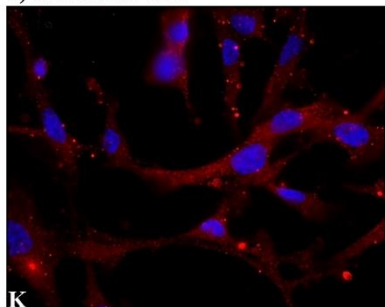


Слика 34. Протеинска експресија ACLY-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Симвастатина, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600х. Једра су обојена плаво (DAPI), ACLY је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

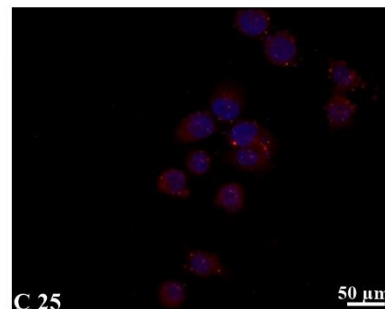
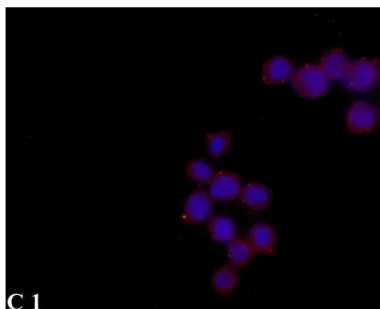
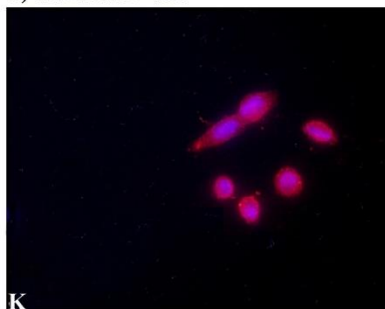


Графикон 26. Ниво протеинске експресије ACC-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Симвастатина, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

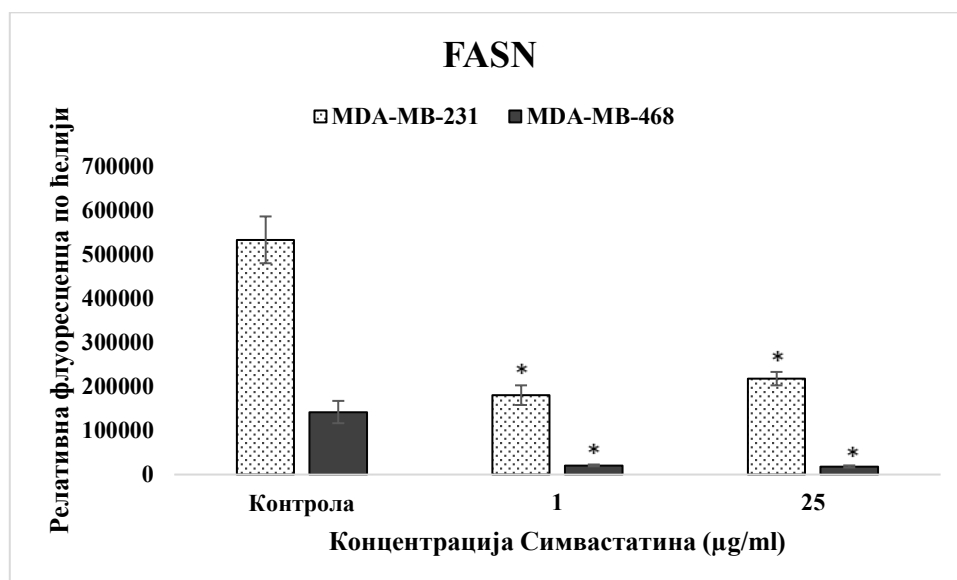
1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

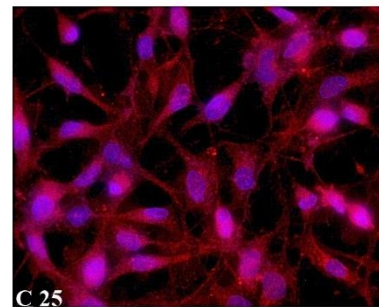
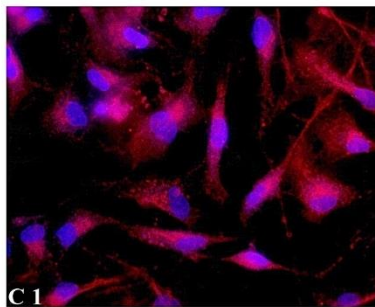
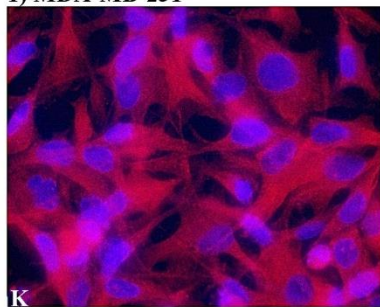


Слика 35. Протеинска експресија ACC-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Симвастатина, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI), ACC је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

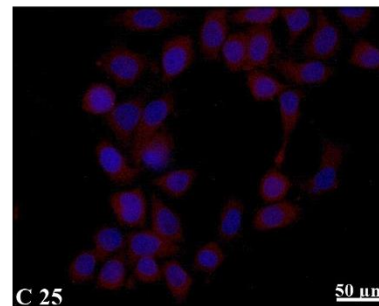
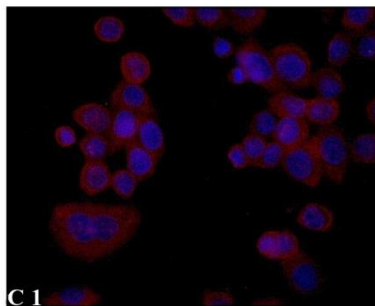
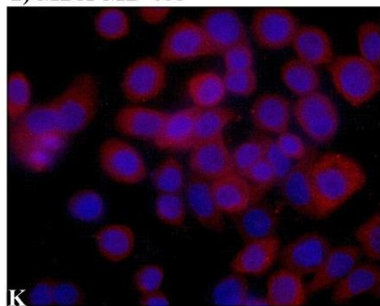


Графикон 27. Ниво протеинске експресије FASN-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Симвастатина, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

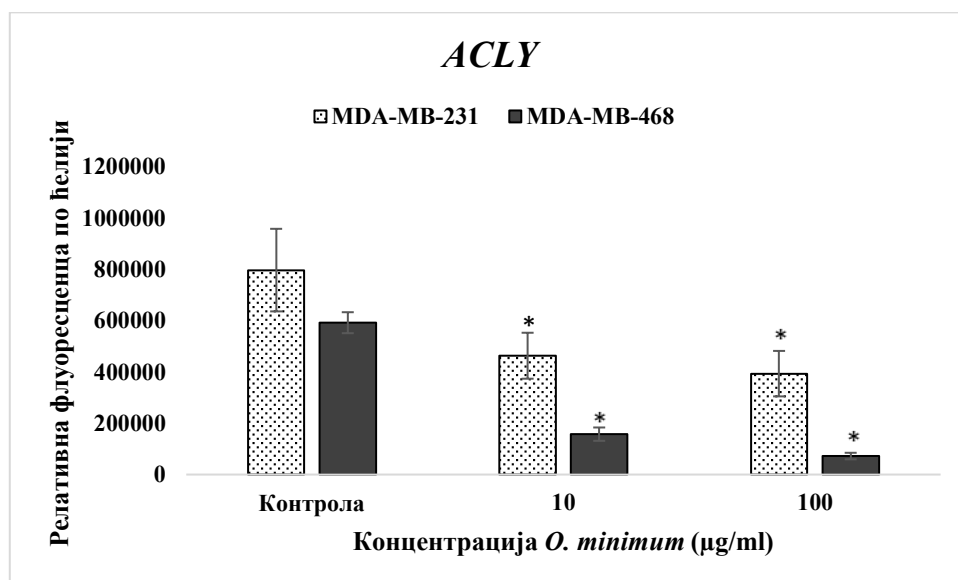


Слика 36. Протеинска експресија FASN-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Симвастатина, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI), FASN је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

Ефекат ***O. minimum*** на протеинску експресију **ACLY**-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке приказан је на Слици 37. На основу резултата који су добијени анализирањем микрографија, *O. minimum* статистички значајно дозно-зависно снижава протеинску експресију **ACLY**-а у ћелијским линијама карцинома дојке у односу на контролне вредности (Графикон 28).

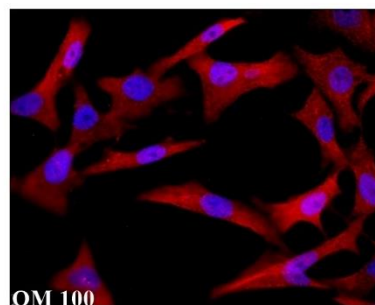
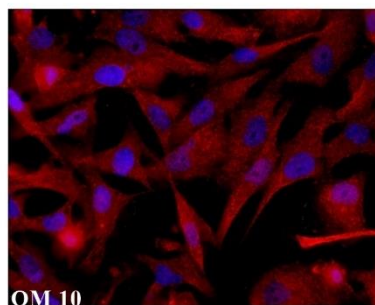
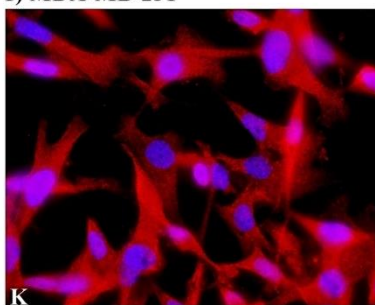
Анализом резултата флуоресценце, протеинска експресија **ACC**-а је статистички значајно снижена након примене *O. minimum* у обе тестиране ћелијске линије карцинома дојке у односу на контролне вредности (Слика 38, Графикон 29).

Интензитет протеинске експресије **FASN**-а након примене *O. minimum* на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелије карцинома дојке приказани су на Графикону 30 и Слици 39. Резултати јасно показују да је протеинска експресија тестираног параметра статистички значајно и дозно-зависно снижена код обе тестиране ћелијске линије.

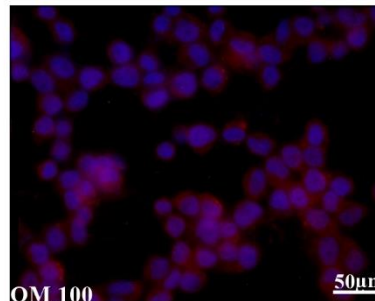
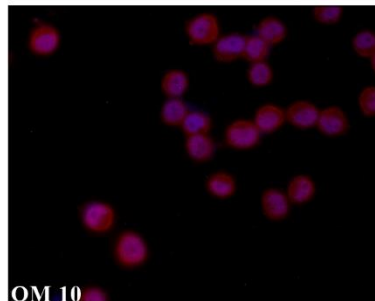
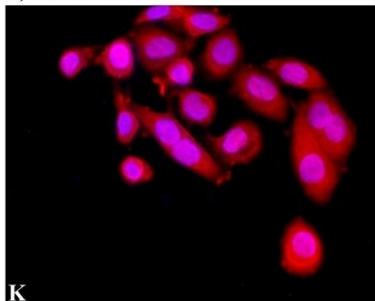


Графикон 28. Ниво протеинске експресије ACLY-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене *O. minimum*, у концентрацијама од 10 и 100 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

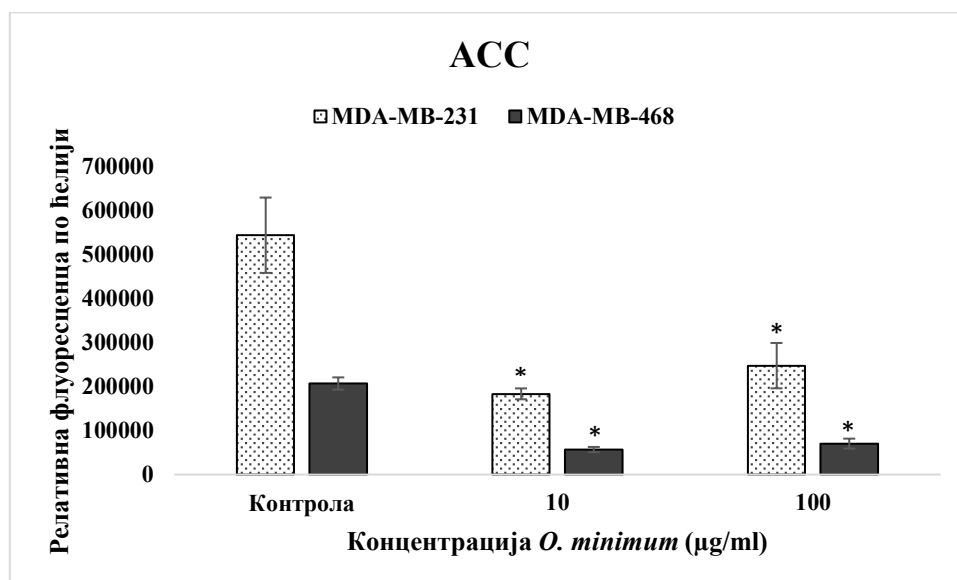
1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

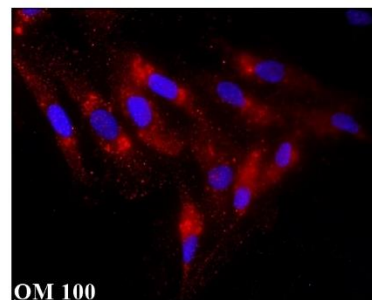
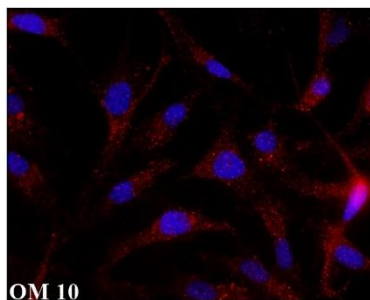
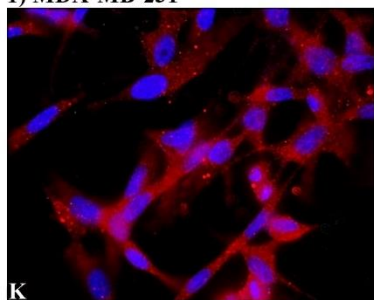


Слика 37. Протеинска експресија ACLY-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене *O. minimum*, у концентрацијама од 10 и 100 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу на увећању од 600x. Једра су обојена плаво (DAPI), ACLY је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

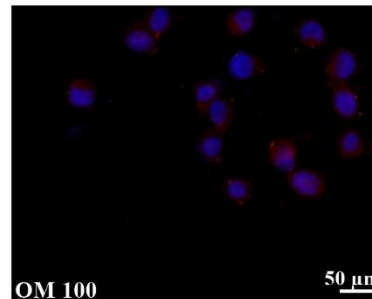
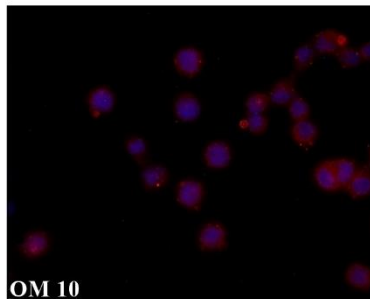
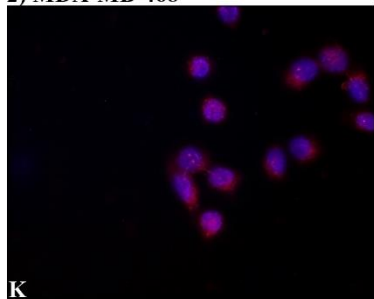


Графикон 29. Ниво протеинске експресије ACC-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене *O. minimum*, у концентрацијама од 10 и 100 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

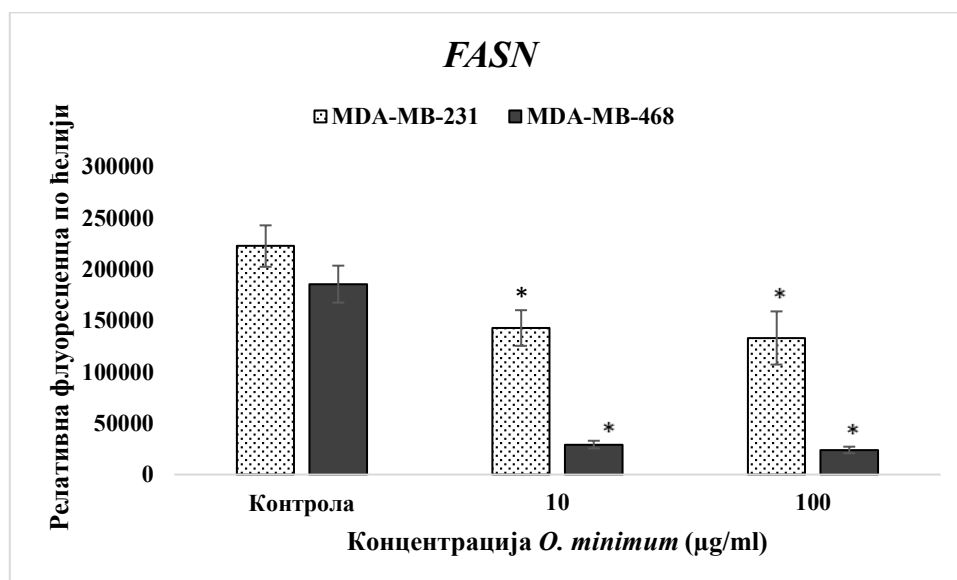
1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

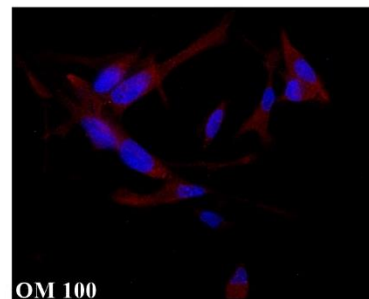
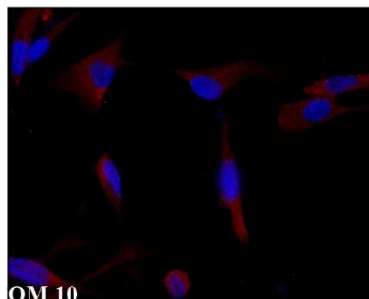
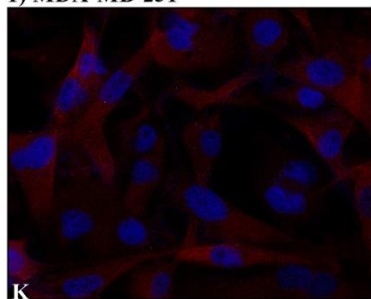


Слика 38. Протеинска експресија ACC-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене *O. minimum*, у концентрацијама од 10 и 100 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI), ACC је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

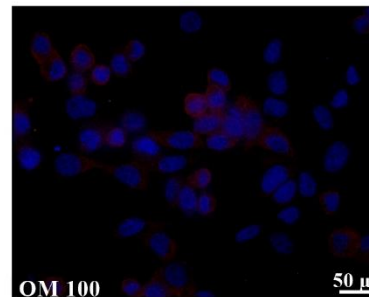
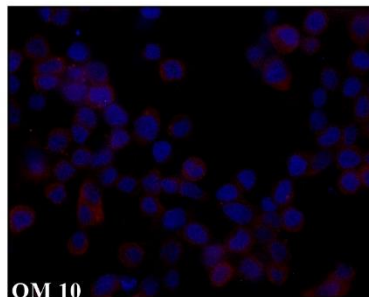
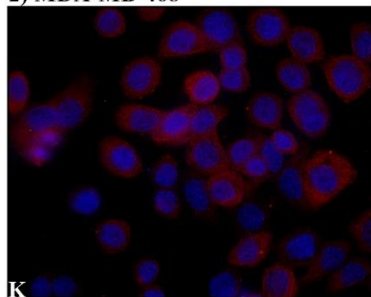


Графикон 30. Ниво протеинске експресије FASN-a у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене *O. minimum*, у концентрацијама од 10 и 100 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468



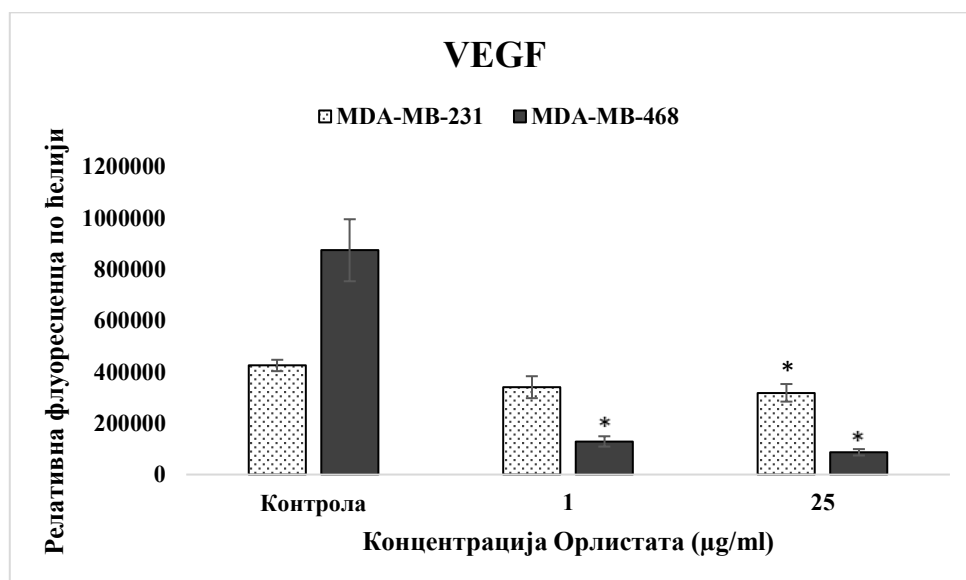
Слика 39. Протеинска експресија FASN у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене *O. minimum*, у концентрацијама од 10 и 100 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600х. Једра су обојена плаво (DAPI), FASN-a је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

7.2. Експресија протеина укључених у процес ангиогенезе

Ефекат **Орлистата** на ниво протеинске експресије **VEGF**-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке је приказан на Графикону 31. На основу резултата може се закључити да Орлистат статистички значајно смањује ниво протеинске експресије VEGF протеина на ћелијама карцинома дојке у односу на контролне вредности (Слика 40).

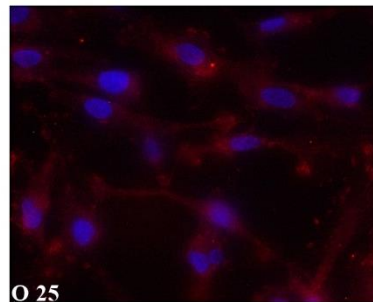
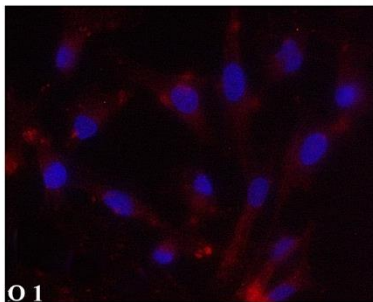
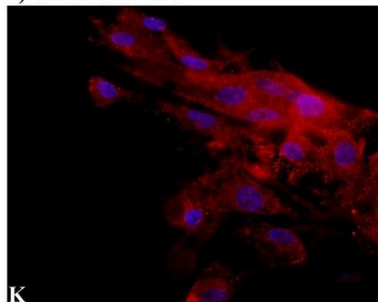
На Графикону 32 и Слици 41 приказан је ефекат Орлистата на ниво протеинске експресије **MMP-9** на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке. Орлистат значајно и дозно-зависно смањује експресију MMP-9 на ћелијама карцинома дојке у односу на контролне вредности.

Орлистат доводи до значајних промена на нивоу протеинске експресије **CXCR-4** рецептора на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке. Анализом интензитета флуоресценције може се закључити да Орлистат статистички значајно и дозно-зависно снижава ниво CXCR-4 протеина у ћелијама карцинома дојке у односу на контролне вредности (Слика 42, Графикон 33).

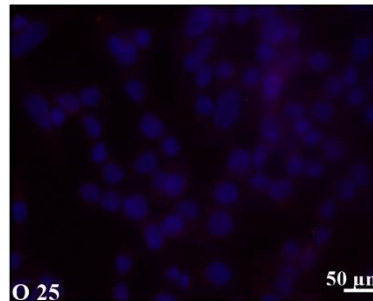
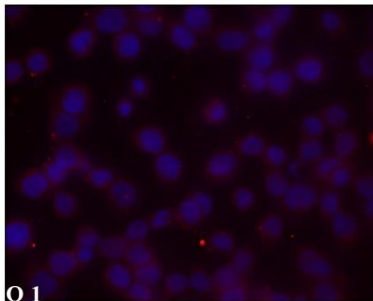
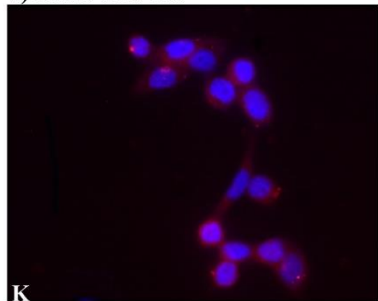


Графикон 31. Ниво протеинске експресије VEGF-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Орлистата, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

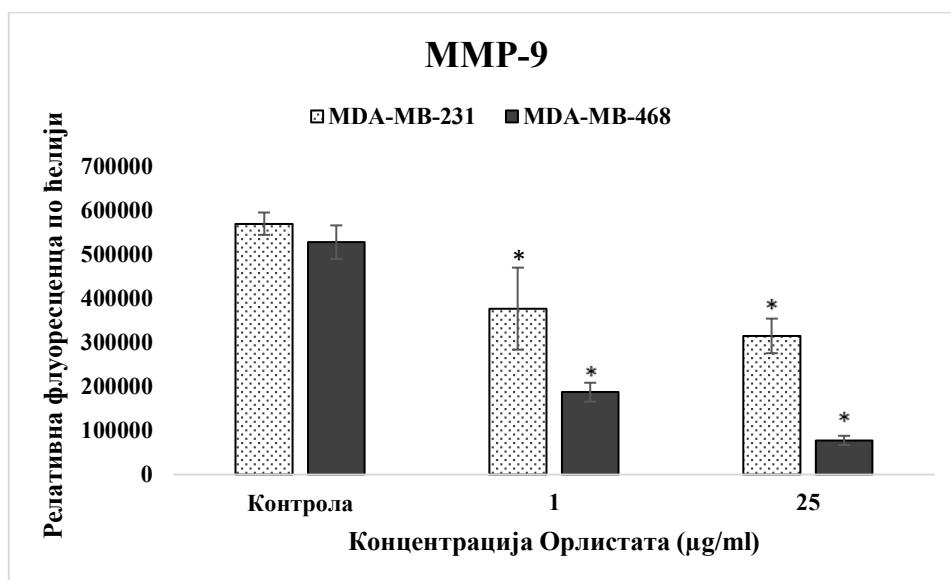
1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

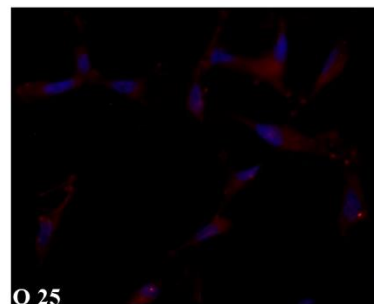
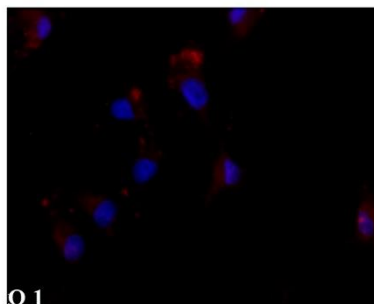
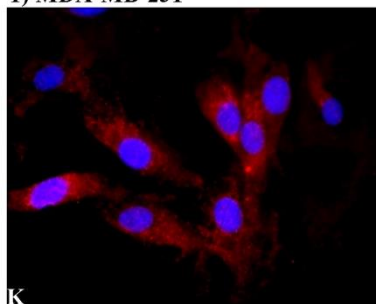


Слика 40. Протеинска експресија VEGF-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Орлистата, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600х. Једра су обојена плаво (DAPI), VEGF је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

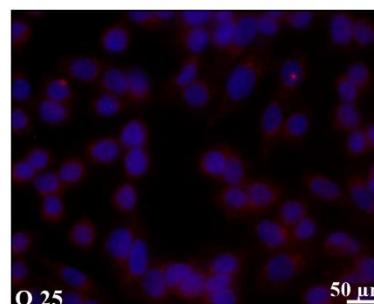
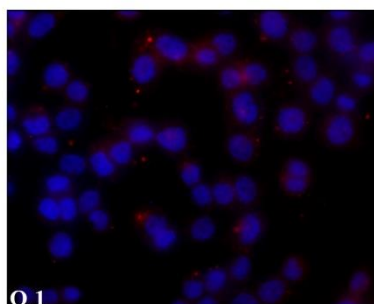
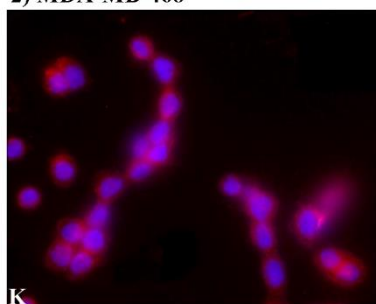


Графикон 32. Ниво протеинске експресије MMP-9 у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Орлистата, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

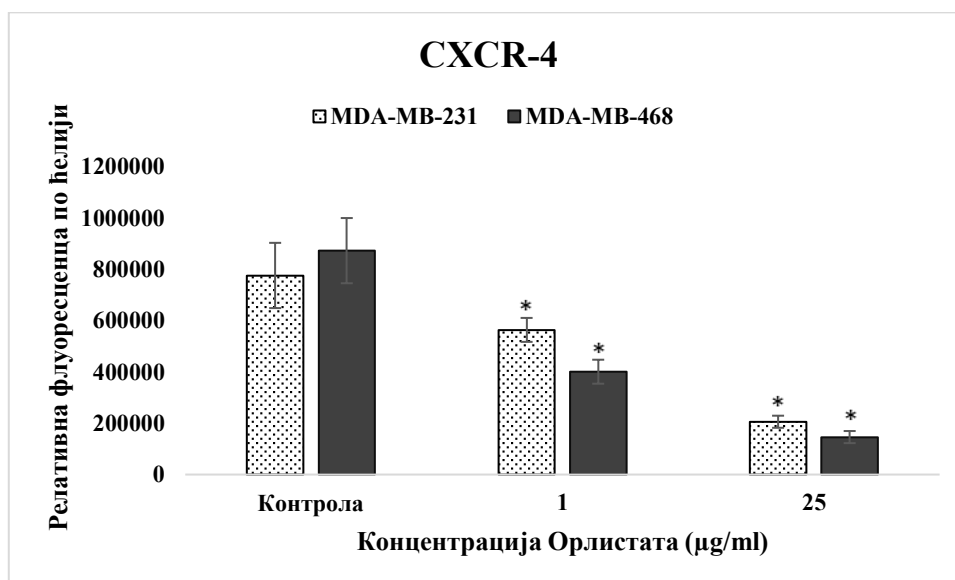
1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

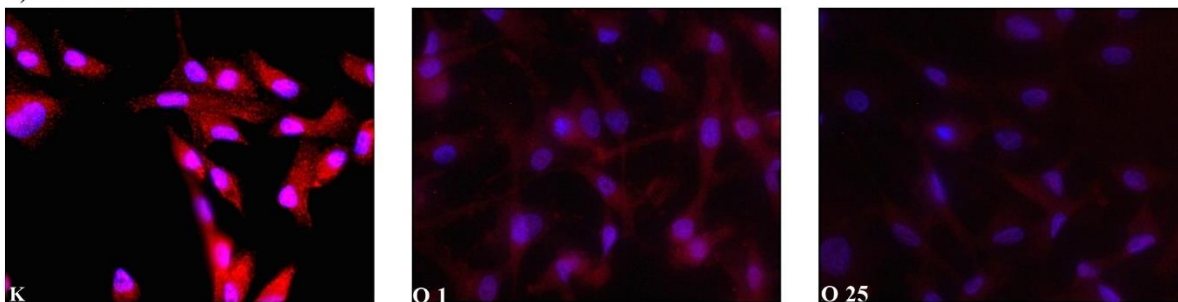


Слика 41. Протеинска експресија MMP-9 у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Орлистата, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI), MMP-9 је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

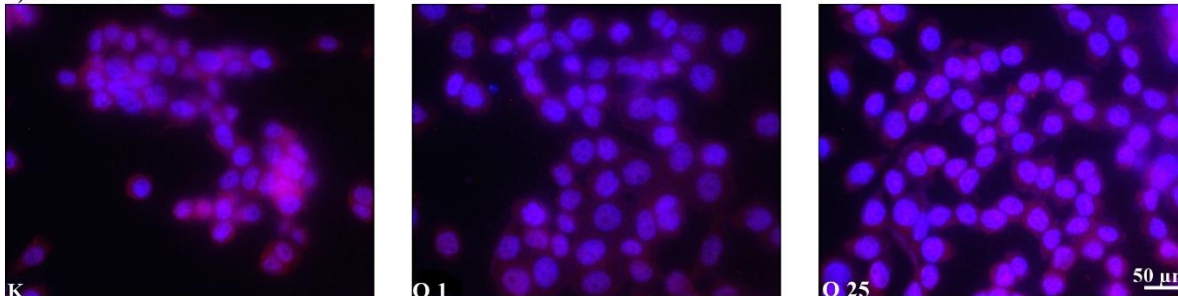


Графикон 33. Ниво протеинске експресије CXCR-4 у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Орлистата, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

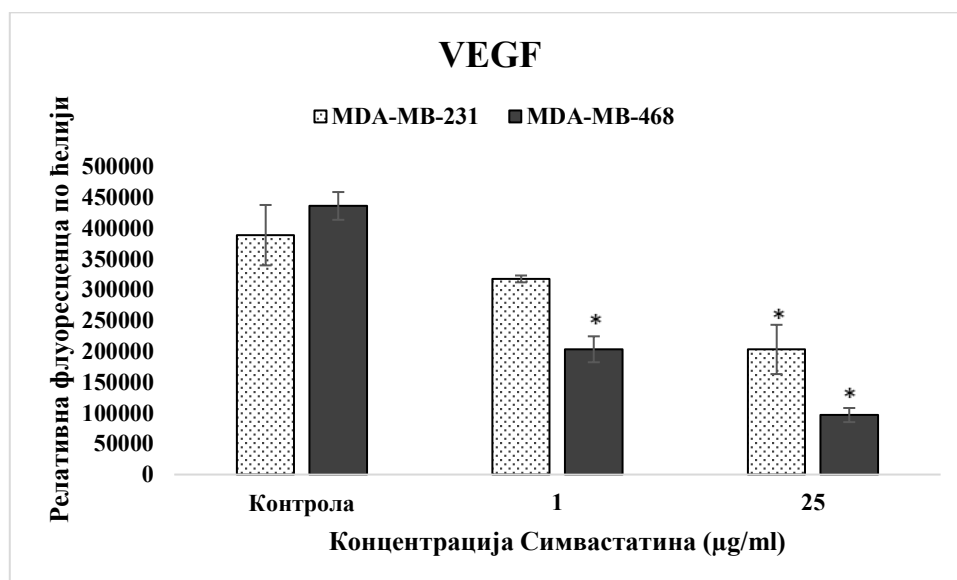


Слика 42. Протеинска експресија CXCR-4 у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Орлистата, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI), а рецептор CXCR-4 је представљен црвеном бојом (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

На Графикону 34 је приказан ефекат **Симвастатина** на ниво протеинске експресије VEGF-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке. На основу приказаних резултата мерених преко интензитета имунофлуоресценције, Симвастатин статистички значајно снижава експресију VEGF-а у тестираним ћелијама карцинома дојке у односу на контролне вредности (Слика 43).

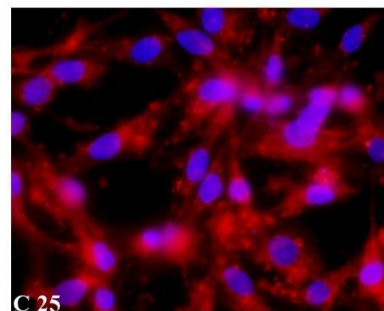
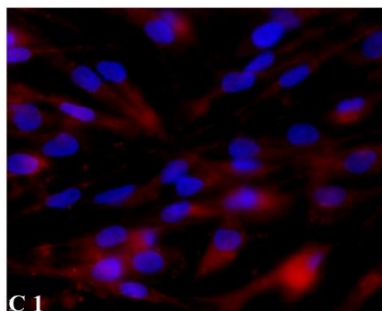
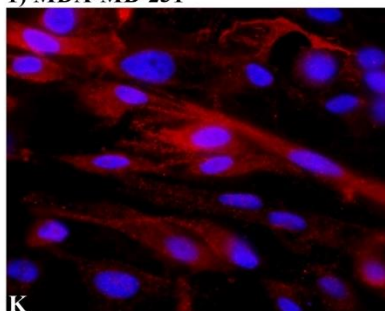
Ефекат Симвастатина на ниво протеинске експресије **ММР-9** у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке приказан је на Графикону 35 и Слици 44. Симвастатин значајно и дозно-зависно смањује протеинску експресију ММР-9 у обе ћелијске линије карцинома дојке у односу на контролне вредности.

Симвастатин значајно утиче на ниво протеинске експресије **CXCR-4** рецептора у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке (Графикон 36). На основу резултата добијених квантификацијом интензитета имунофлуоресценце (Слика 45), овај третман статистички значајно снижава ниво протеинске експресије CXCR-4 у ћелијама карцинома дојке у односу на контролне вредности.

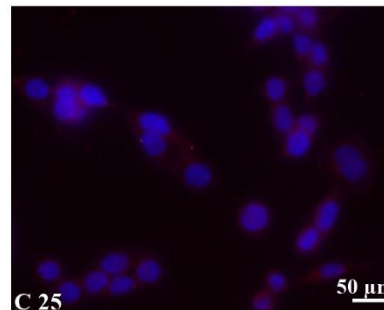
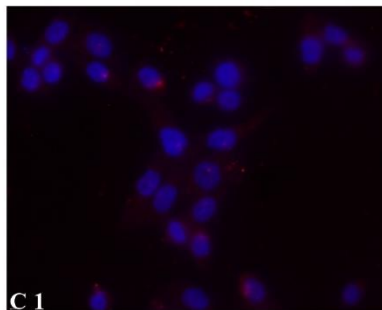
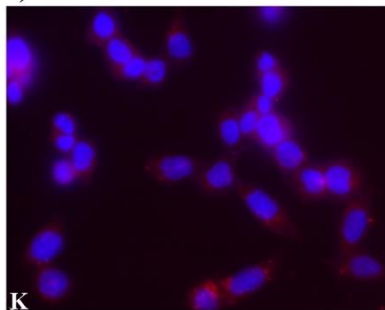


Графикон 34. Ниво протеинске експресије VEGF-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Симвастатина, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

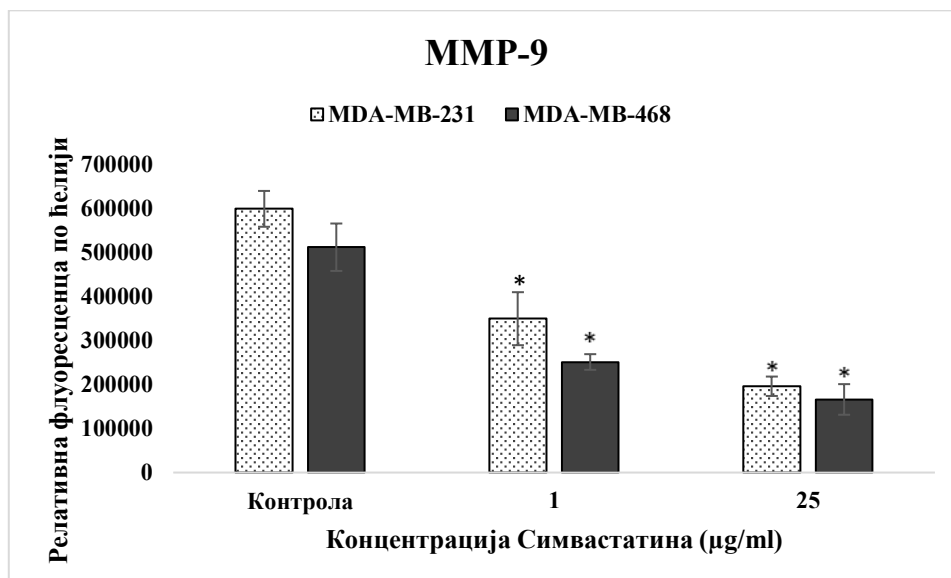
1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

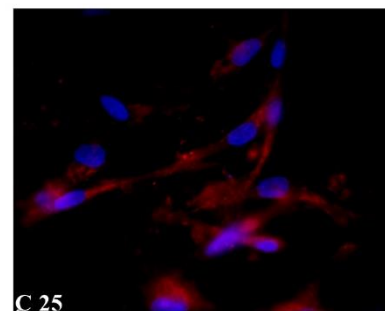
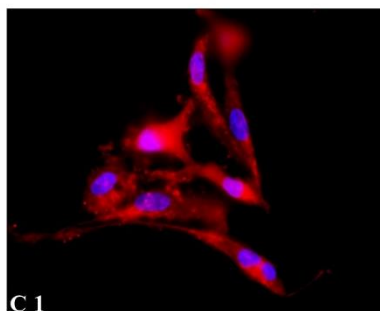
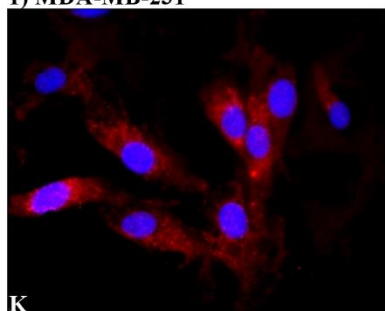


Слика 43. Протеинска експресија VEGF-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Симвастатина, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600х. Једра су обојена плаво (DAPI боја), VEGF је црвено обојен (секундарно антителио конјуговано са Cy3).

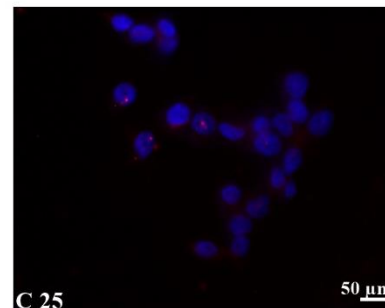
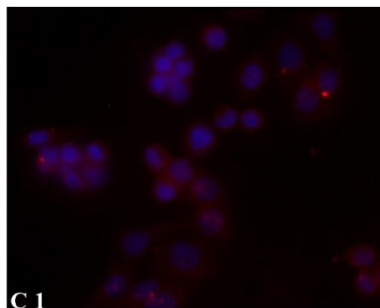
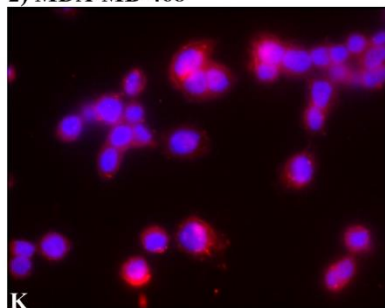


Графикон 35. Ниво протеинске експресије MMP-9 у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Симвастатина, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

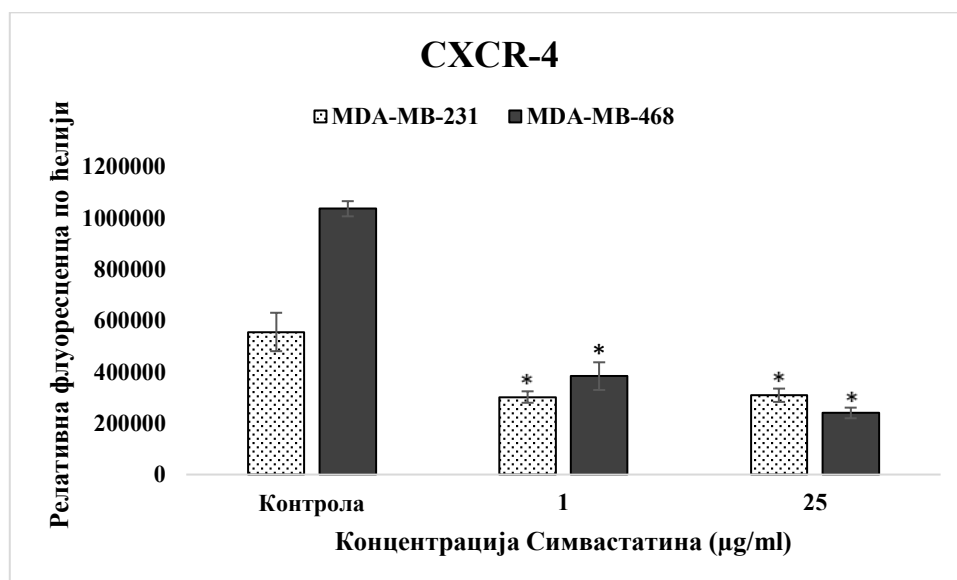
1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

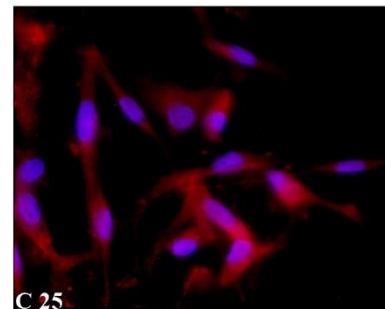
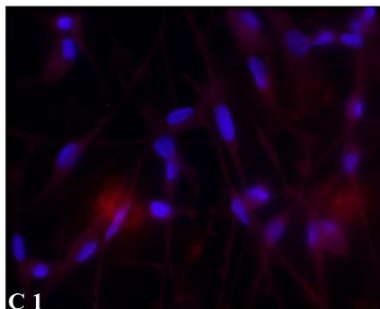
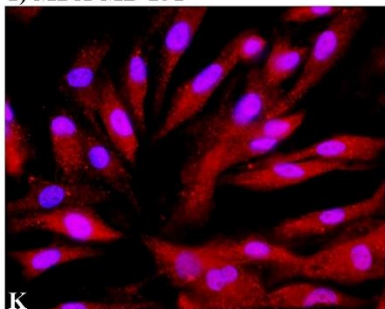


Слика 44. Протеинска експресија MMP-9 у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Симвастатина у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600х. Једра су обојена плаво (DAPI), MMP-9 је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

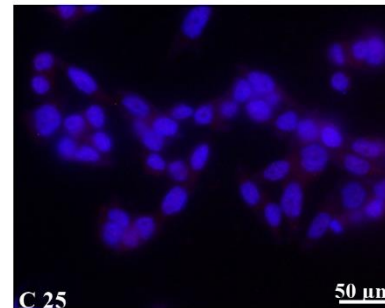
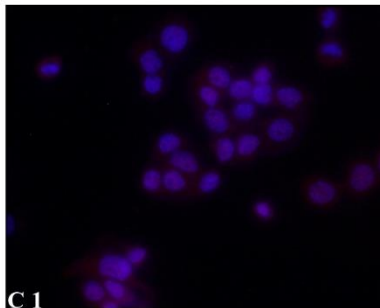
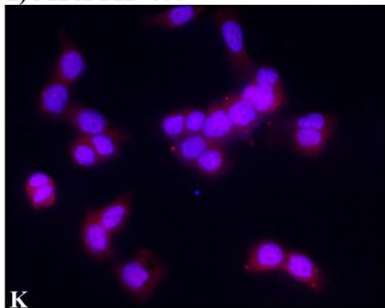


Графикон 36. Ниво протеинске експресије CXCR-4 у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Симвастатина, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

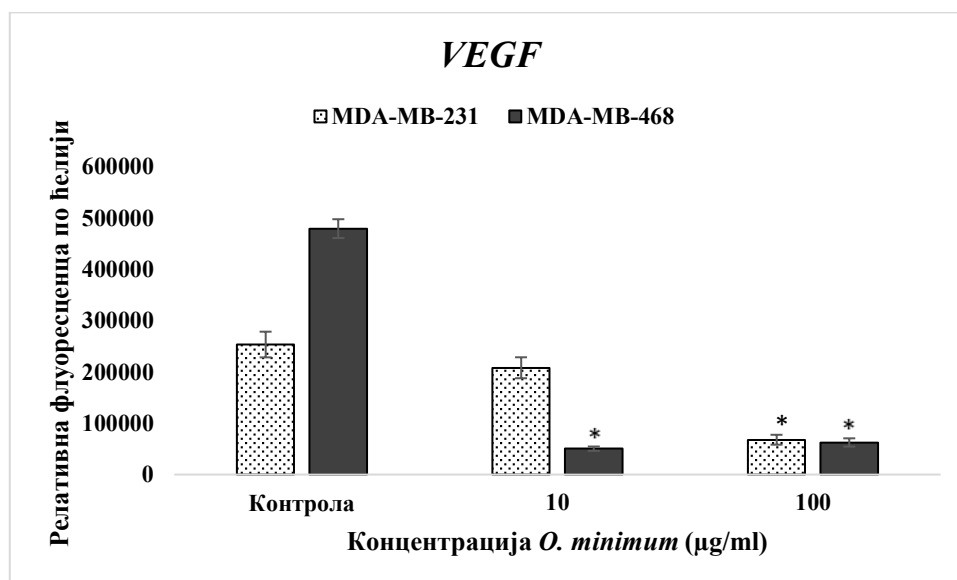


Слика 45. Протеинска експресија CXCR-4 у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене Симвастатина, у концентрацијама од 1 и 25 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600х. Једра су обојена плаво (DAPI), CXCR-4 је црвено обојен (секундарно антителио конјуговано са Cy3).

На Графикону 37 приказан је ефекат *O. minimum* на протеинску експресију VEGF-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке. Третман са *O. minimum* статистички значајно смањује протеинску експресију VEGF-а у обе ћелијске линије карцинома дојке у односу на контролне вредности (Слика 46). Дозно-зависни ефекат *O. minimum* је уочен код MDA-MB-231 ћелија карцинома дојке.

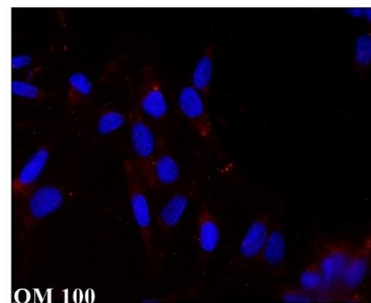
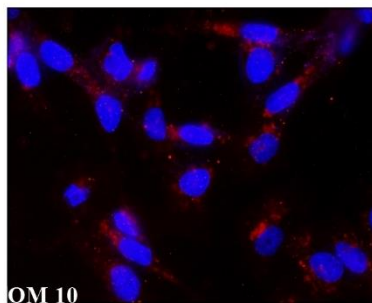
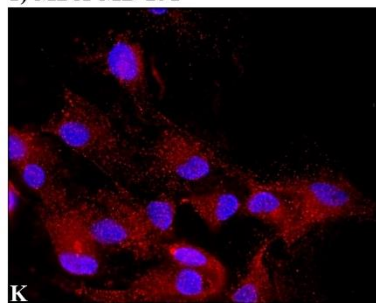
Ефекат *O. minimum* на протеинску експресију MMP-9 у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке је приказан на Графикону 38 и Слици 47. Резултати квантификације интензитета флуоресценције указују на статистички значајно дозно-зависно смањење протеинске експресије MMP-9 након примене *O. minimum* на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, у односу на контролне вредности.

На микрографијама је приказан ефекат *O. minimum* на протеинску експресију CXCR-4 рецептора у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке (Слика 48). Интензитет флуоресценције на микрографијама указује да *O. minimum* значајно смањује протеинску експресију CXCR-4 рецептора у ћелијама карцинома дојке у односу на контролне вредности (Графикон 39).

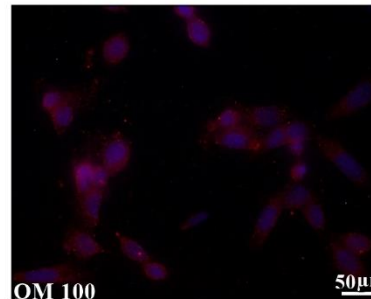
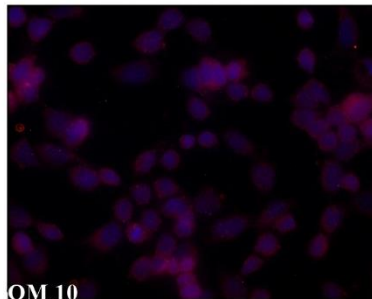
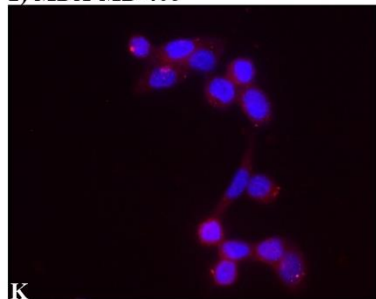


Графикон 37. Ниво протеинске експресије VEGF-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене *O. minimum*, у концентрацијама од 10 и 100 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

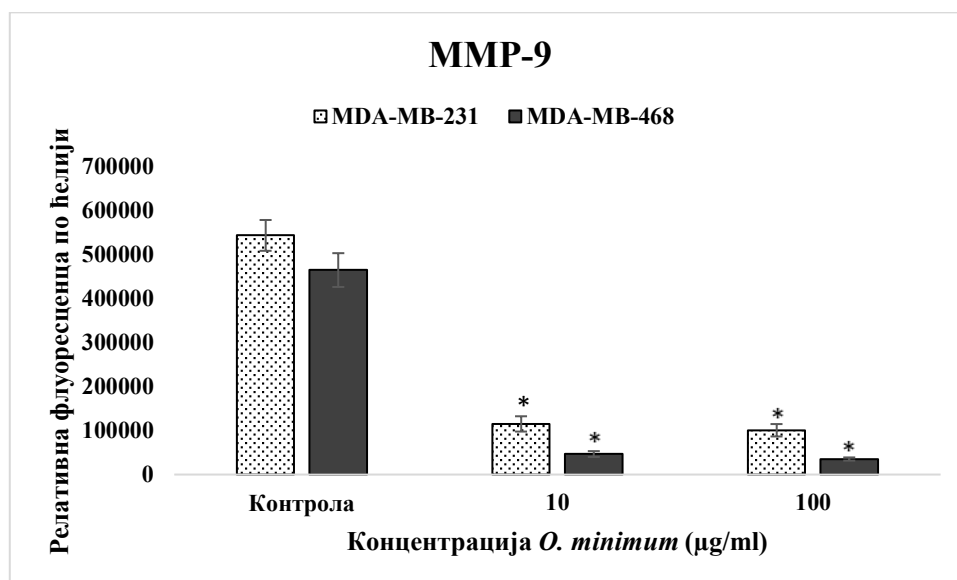
1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

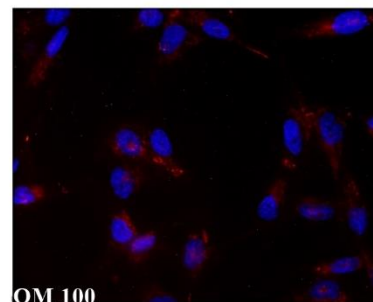
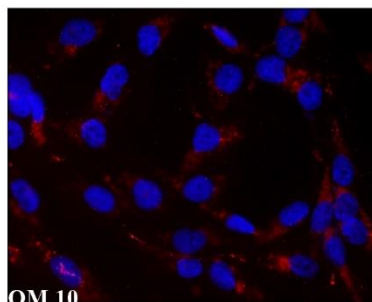
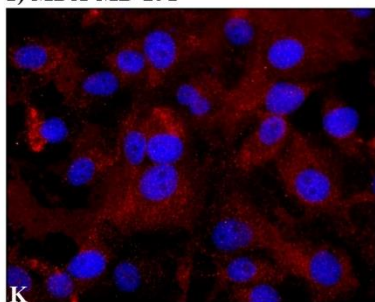


Слика 46. Протеинска експресија VEGF-а у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене *O. minimum*, у концентрацијама од 10 и 100 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI), VEGF рецептор је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

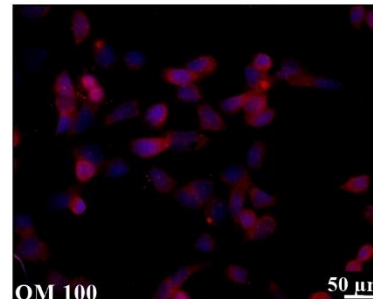
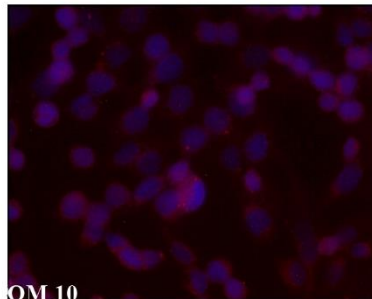
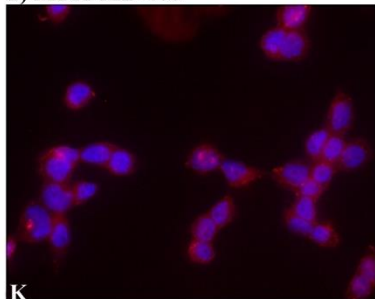


Графикон 38. Ниво протеинске експресије MMP-9 у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене *O. minimum*, у концентрацијама од 10 и 100 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

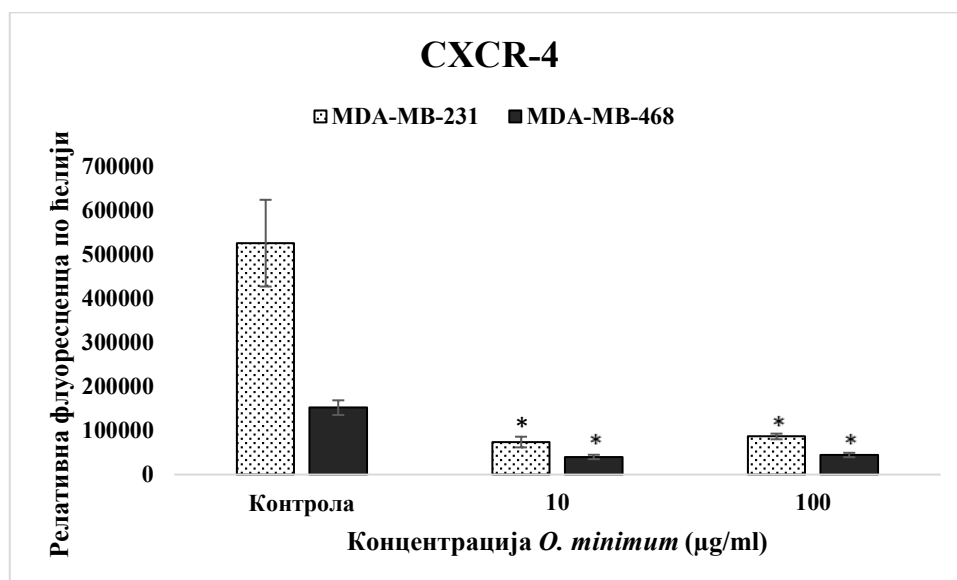
1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

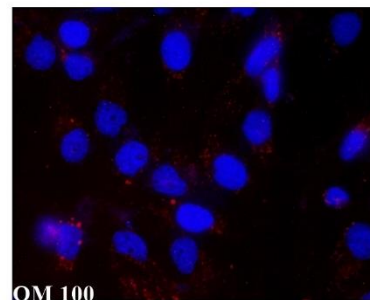
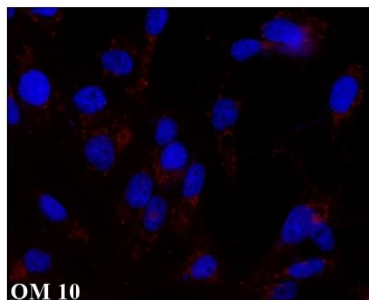
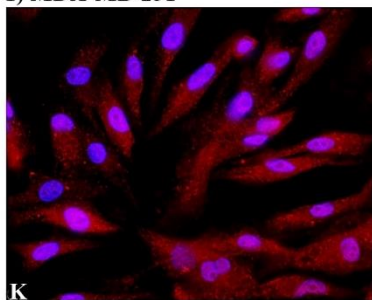


Слика 47. Протеинска експресија MMP-9 у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене *O. minimum*, у концентрацијама од 10 и 100 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI), MMP-9 је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

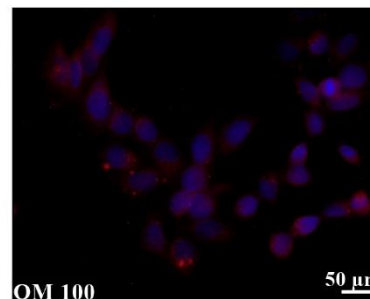
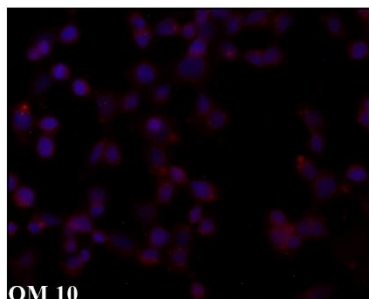
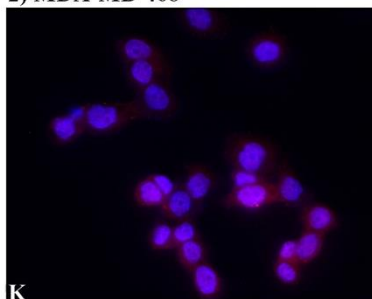


Графикон 39. Ниво протеинске експресије CXCR-4 у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене *O. minimum*, у концентрацијама од 10 и 100 µg/ml. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. Релативни интензитет флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је ImageJ програмом. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика у односу на контролне вредности.

1) MDA-MB-231



2) MDA-MB-468

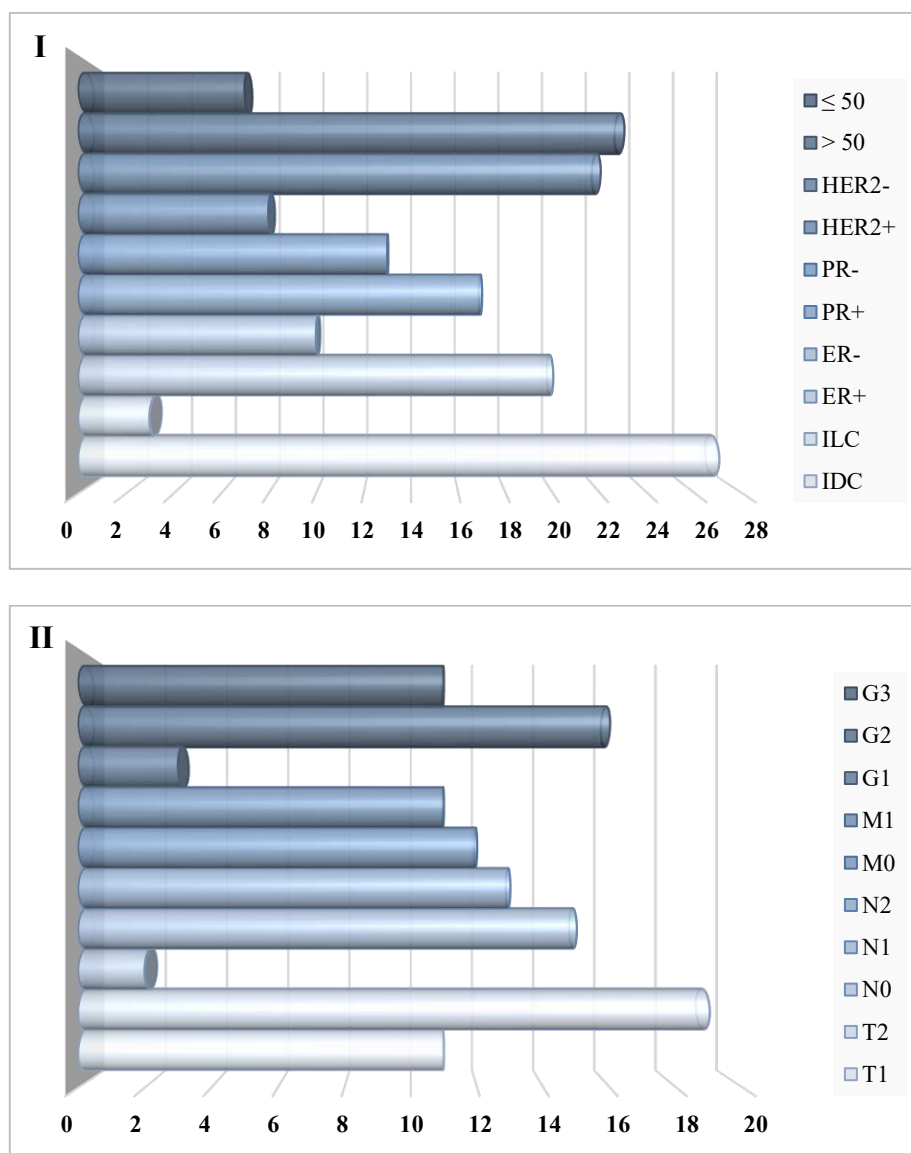


Слика 48. Протеинска експресија CXCR-4 у MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке, 24 h након примене *O. minimum*, у концентрацијама од 10 и 100 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI), CXCR-4 је црвено обојен (секундарно антителио конјуговано са Cy3).

8. Молекуларни параметри биосинтезе масних киселина код пацијената са карциномом дојке

Биосинтеза масних киселина у ћелијама карцинома укључује сложене молекуларне процесе који подразумевају *de novo* синтезу, транспорт и деградацију. Репрограмирање биосинтезе масних киселина је типична карактеристика малигних тумора. Ћелије карцинома за разлику од здравих, синтетишу масне киселине у већем проценту да би одржале константан пролиферативни потенцијал. Процес биосинтезе масних киселина је уско повезан са агресивним фенотипом карцинома дојке. Најпознатији регулатори овог процеса су *ACLY* и *FASN*.

Са циљем идентификације нових тумор маркера код пацијената оболелих од карцинома дојке праћена је генска и протеинска експресија најзначајнијих параметара процеса биосинтезе масних киселина. *De novo* синтеза масних киселина у карциномима омогућава додатну енергију која стимулише прогресију и метастазирање карцинома. У студију су укључене пацијенткиње са клиничко-патолошким карактеристикама приказаним на Графикону 40.

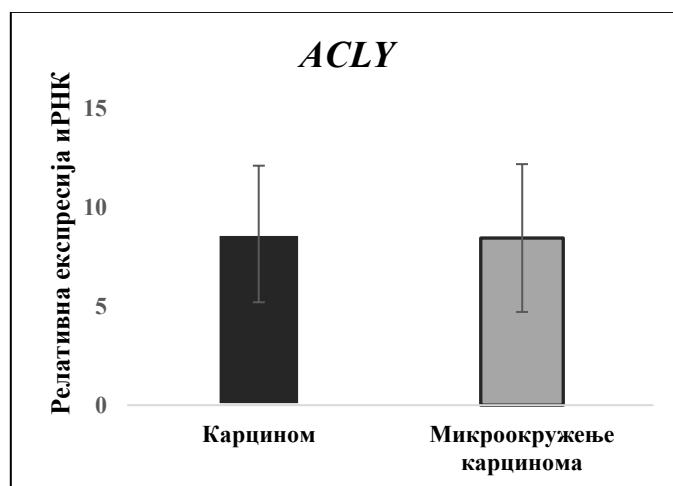


Графикон 40. Клиничко-патолошке карактеристике пацијената са карциномом дојке. **I** - Тип карцинома (Дуктални инвазивни карцином дојке – IDC; Лобуларни инвазивни карцином дојке – ILC); Статус рецептора – (ER+, ER-, PR+, PR-, HER2+, HER2-); Старост пацијената (> 50 година, ≤ 50 година). **II** - Величина тумора Т – (T1 – тумор ≤ 2 cm; T2 – тумор 2-5 cm); Захваћеност лимфних нодуса N – (N0 – Нема метастаза; N1 – Метастазе присутне у 1-3 чвора у аксили; N2 – Метастазе присутне у 4-9 чвора у аксили); Присуство метастаза М – (M0 – нема удаљених метастаза; M1 – присутне метастазе); Хистолошки градус G – (G1 – добро диференцирани тумори; G2 – умерено диференцирани тумори; G3 – слабо диференцирани тумори). Укупно је анализирано 30 узорака ткива карцинома дојке и 30 узорака ткива из микроокружења.

8.1. Релативна експресија иРНК *ACLY* гена

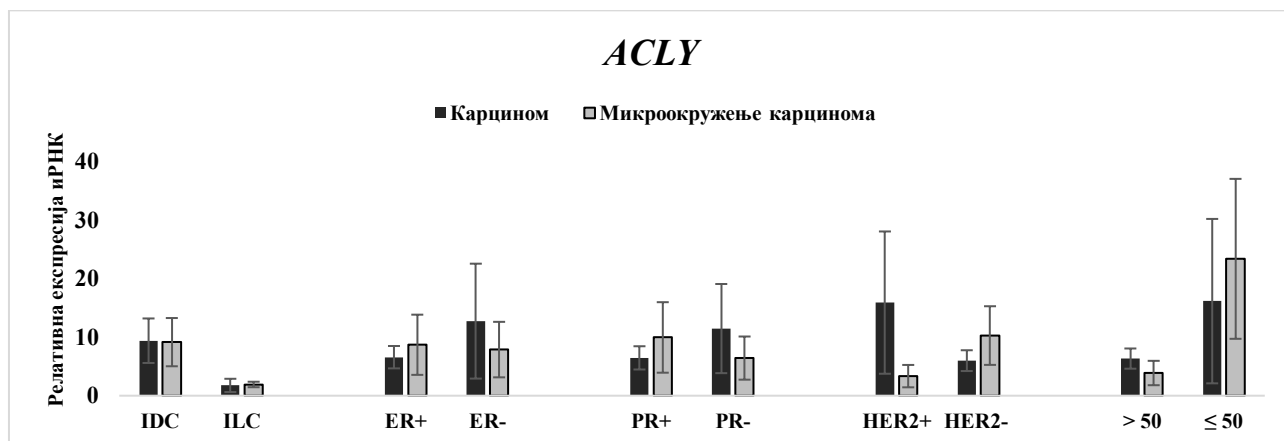
АТР-цитрат лиаза је важан ген који се први активира у процесу биосинтезе масних киселина. Све је више литературних података који говоре да је *ACLY* укључен у процесе регулације пролиферације, миграције и метастазирања код карцинома дојке. С обзиром на улогу *ACLY* у прогресији карцинома дојке, неопходна су додатна истраживања са тенденцијом његове примене као тумор маркера.

Дистрибуција релативне експресије иРНК *ACLY* гена у ткиву карцинома дојке и ткиву микроокружења карцинома приказана је на Графикону 41. На основу приказаних резултата јасно је да је овај ген подједнако експримиран како у узорцима ткива карцинома дојке тако и у узорцима ткива из микроокружења.



Графикон 41. Релативна експресија иРНК *ACLY* гена у ткиву карцинома дојке и микроокружењу. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента.

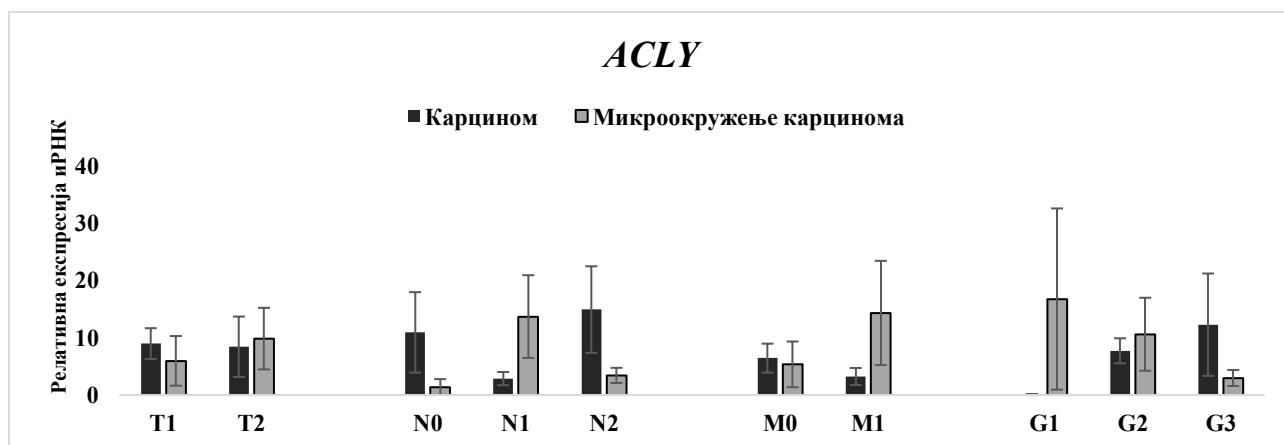
На Графикону 42 је приказана релативна експресија иРНК *ACLY* гена у односу на клиничко-патолошке карактеристике пацијената (тип карцинома, статус хормонских рецептора и старост). Ниво експресије иРНК *ACLY* гена је различит у зависности од посматраних клиничко-патолошких параметара у оба типа испитиваних узорака. Разлике у релативној експресији иРНК *ACLY* гена у узорцима ткива карцинома и микроокружења нису статистички значајне.



Графикон 42. Релативна експресија иРНК *ACLY* гена у ткиву карцинома дојке и микроокружењу у односу на клиничко-патолошке карактеристике пацијената. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка из три независна експеримента.

Ниво релативне експресије иРНК *ACLY* гена је виши код пацијената са дијагнозом дукталног карцинома дојке у поређењу са пацијентима код којих је детектован лобуларни тип карцинома. Код пацијената са $ER^-/PR^-/HER2^+$ подтипом карцинома дојке релативна експресија иРНК *ACLY* гена је повишена у узорцима карцинома у односу на узорке ткива из микроокружења. Док је код пацијената са $ER^+/PR^+/HER2^-$ подтипом повишена експресија тестираног параметра у узорцима ткива из микроокружења. Код пацијената старијих од 50 година релативна експресија иРНК *ACLY* гена је виша у узорцима ткива карцинома, док је код млађих жена експресија истог параметра виша у узорцима ткива из микроокружења (Графикон 42).

На Графикону 43 приказана је релативна експресија иРНК *ACLY* гена у односу на TNM класификацију и хистолошки градус за испитане узорке ткива карцинома дојке и ткива из микроокружења. На основу представљених резултата није уочена статистичка значајност између испитаних параметара али су промене у нивоима релативне експресије иРНК *ACLY* гена очигледне.



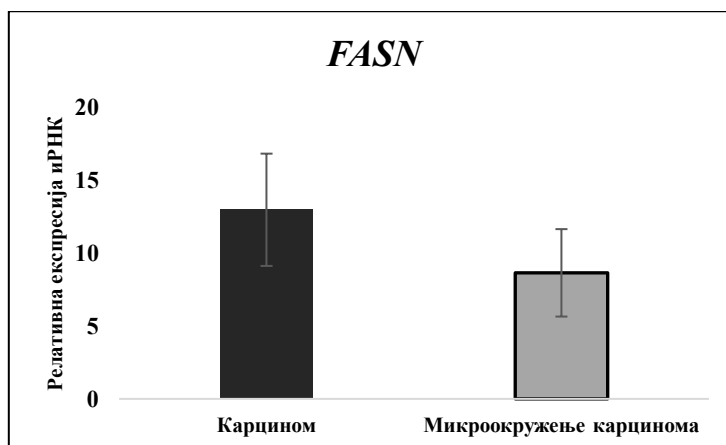
Графикон 43. Релативна експресија иРНК *ACLY* гена у ткиву карцинома дојке и микроокружењу у односу на TNM класификацију и хистолошки градус. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка из три независна експеримента.

Релативна експресија иРНК *ACLY* гена се повећава са растом карцинома (T2) у узорцима ткива из микроокружења. Код узорака ткива мањих димензија (T1) виша је релативна експресија *ACLY* гена у узорцима карциномског ткива у односу на узорке из микроокружења карцинома. Са појавом секундарних депозита у 1-3 аксиларна лимфна нодуса (N1), експресија иРНК *ACLY* гена је виша за 4.77 пута у узорцима ткива из микроокружења карцинома дојке у поређењу са експресијом у карциномском ткиву. Са порастом броја захваћених лимфних нодуса (N2), доминантну улогу у продукцији овог гена преузима карциномско ткиво, при чему је експресија тестираног гена виша за 4.36 пута у односу на узорке ткива из микроокружења. Код пацијената код којих нису детектоване промене у лимфним нодусима (N0), релативна експресија иРНК *ACLY* гена је за 7.77 пута виша у узорцима ткива карцинома у поређењу са експресијом у узорцима из микроокружења. Код пацијената код којих је детектовано присуство регионалних метастаза (M1), виша је релативна експресија иРНК *ACLY* гена у узорцима ткива из микроокружења карцинома за 4.43 пута у односу на релативну експресију у узорцима ткива пореклом директно из карцинома. У односу на степен диференцираности карциномских ћелија (G1-G3), релативна експресија иРНК *ACLY* гена расте у узорцима ткива карцинома дојке, док истовремено опада у узорцима ткива из микроокружења. Важно је напоменути да је код G1 типа релативна експресија иРНК *ACLY* гена за 167.9 пута виша у узорцима ткива из микроокружења у поређењу са узорцима карциномског ткива.

8.2. Релативна експресија иРНК *FASN* гена

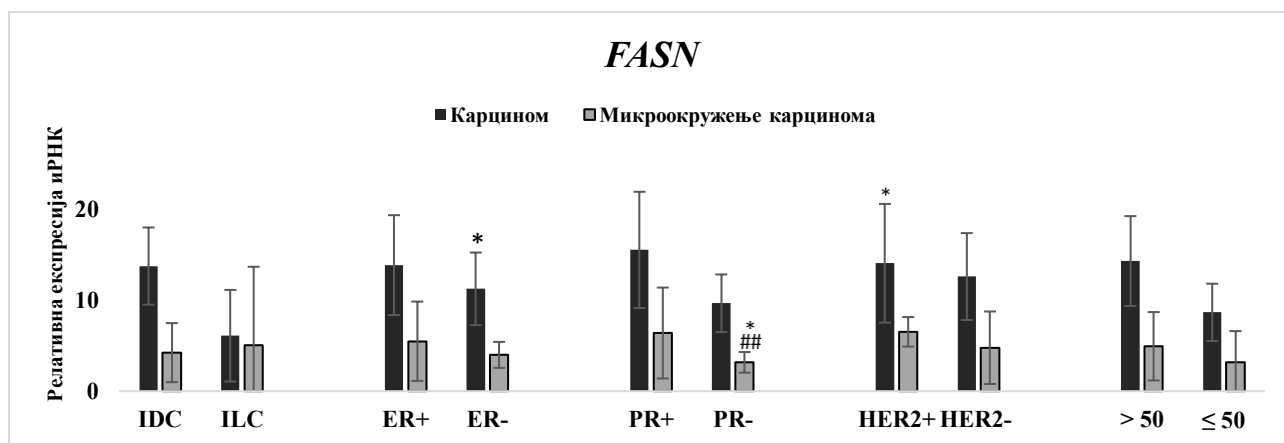
Синтетаза масних киселина је примарни ген за *de novo* ендогену синтезу масних киселина. Масне киселине које синтетише овај ген не само да обезбеђују енергију, већ и учествују у трансдукцији и регулацији различитих сигналних молекула код карцинома дојке. За разлику од здравих ћелија које користе масне киселине у веома малом проценту, ћелије преканцерозних лезија и ћелије карцинома саме синтетишу и користе високе концентрације масних киселина независно од хормонске регулације. Као резултат појачане метаболичке активност ових ћелија, повећава се и експресија *FASN*-а на генском и протеинском нивоу. Прекомерна експресија и хиперактивација овог гена је одговорна за настанак биолошки агресивних типова карцинома дојке. Узимајући у обзир наведено, *FASN* може бити потенцијалан тумор маркер код карцинома дојке.

Релативна експресија иРНК *FASN* гена у узорцима ткиву карцинома дојке и узорцима из микроокружења карцинома приказана је на Графикону 44. Релативна експресија иРНК *FASN* гена виша у узорцима ткива карцинома дојке у односу на узорке из микроокружења.



Графикон 44. Релативна експресија иРНК *FASN* гена у ткиву карцинома дојке и микроокружењу карцинома. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка из три независна експеримента.

На Графикону 45 приказана је релативна експресија иРНК *FASN* гена у узорцима ткива карцинома дојке и ткива из микроокружења у односу на клиничко-патолошке карактеристике (тип карцинома, статус хормонских рецептора и старост). Релативна експресија иРНК *FASN* гена је виша у узорцима ткива карцинома у поређењу са узорцима из микроокружења код свих праћених параметара класификације.



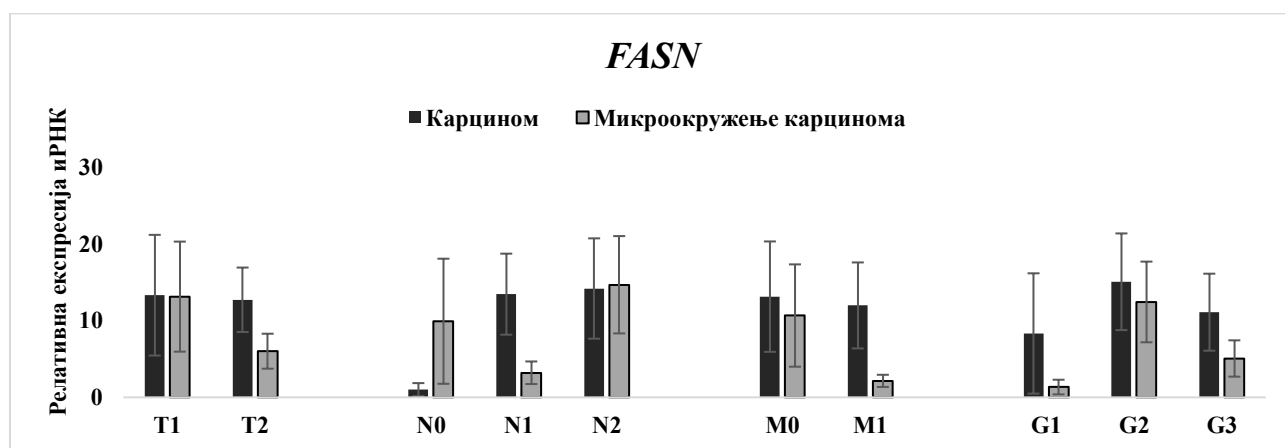
Графикон 45. Релативна експресија иРНК *FASN* гена у ткиву карцинома дојке и микроокружењу карцинома у односу на клиничко-патолошке карактеристике пацијената. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика између карцинома и микроокружења; ## $p < 0.05$ статистички значајна разлика између узорак ткива из микроокружења у односу на карактеристике.

Код пацијената са дукталним и лобуларним типом карцинома релативна експресија иРНК *FASN* гена је виша у узорцима ткива карцинома у поређењу са узорцима из микроокружења. Промене у нивоу релативне експресије иРНК *FASN* гена су изражајније код узорак дукталног карцинома дојке, при чему је експресија тестираног гена за 3.24 пута виша у узорцима карциномског ткива у поређењу са узорцима из микроокружења.

Код ER⁺/PR⁺/HER2⁺ подтипа карцинома дојке виша је експресија *FASN*-а у узорцима карцинома у поређењу са узорцима из микроокружења. Код HER2⁺ подтипа карцинома, релативна експресија иРНК испитаног гена је 2.64 пута виша у узорцима ткива карцинома у односу на узорке из микроокружења. Постоји статистички значајна разлика у релативној експресији иРНК *FASN* гена између узорак карцинома и узорак из микроокружења код HER2⁺ подтипа карцинома дојке.

Код ER⁻/PR⁻/HER2⁻ подтипа карцинома дојке, виша је релативна експресија иРНК *FASN* гена у карциномском ткиву у односу на ткиво које потиче из микроокружења. Релативна експресија иРНК *FASN* гена је за 2.82 пута виша код ER⁻ подтипа у односу на исте узорке из микроокружења, при чему постоји и статистички значајна разлика између ова два типа узорак. Код PR⁻ подтипа релативна експресија иРНК *FASN* гена је 3.05 виша у узорцима ткива карцинома у односу на узорке из микроокружења. Такође, постоји статистички значајна разлика у релативној експресији иРНК *FASN* гена између узорак ткива карцинома дојке и микроокружења као и само између узорак из микроокружења карцинома. Релативна експресија иРНК *FASN* гена је виша у узорцима ткива карцинома код старијих пацијената у односу на оне које су у току хируршког захвата имале мање од 50 година.

На Графикону 46 приказана је релативна експресија иРНК *FASN* гена у односу на TNM класификацију и хистолошки градус за испитане узорке карцинома дојке. На основу представљених резултата није уочена статистичка значајност између параметара, али су разлике у нивоу релативне експресије иРНК *FASN* гена у узорцима ткива карцинома и микроокружења очигледне.



Графикон 46. Релативна експресија иРНК *FASN* гена у ткиву карцинома дојке и микроокружењу карцинома у односу на TNM класификацију и хистолошки градус. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка из три независна експеримента.

Дистрибуција релативне експресије иРНК *FASN* гена је готово идентична у узорцима карцинома и узорцима ткива из микроокружења који су мањи од два cm (T1). Са повећањем величине тумора мења се релативна експресија иРНК *FASN* гена, тако да је 2.11 пута виша у узорцима карцинома величине T2 у односу на узорке из микроокружења.

Следећи ниво TNM класификације се односи на релативну експресију иРНК *FASN* гена у односу на статус захваћености лимфних нодуса. Резултати су показали да се експресија *FASN* гена повећава сразмерно степену захваћености лимфних нодуса код узорак ткива карцинома дојке. Код пацијената код којих нема карциномских ћелија у лимфним нодусима (N0), релативна експресија иРНК *FASN* гена је 9.85 пута виша у узорцима ткива из микроокружења у односу на узорке карцинома. Код пацијената са присутним метастазама у 1-3 лимфна чвора (N1) релативна експресија иРНК *FASN* гена је 4.20 пута виша у узорцима ткива карцинома у односу на узорке из микроокружења. Са повећањем броја захваћених лимфних нодуса (N2) релативна експресија иРНК овог гена се изједначава у оба типа тестираних узорак.

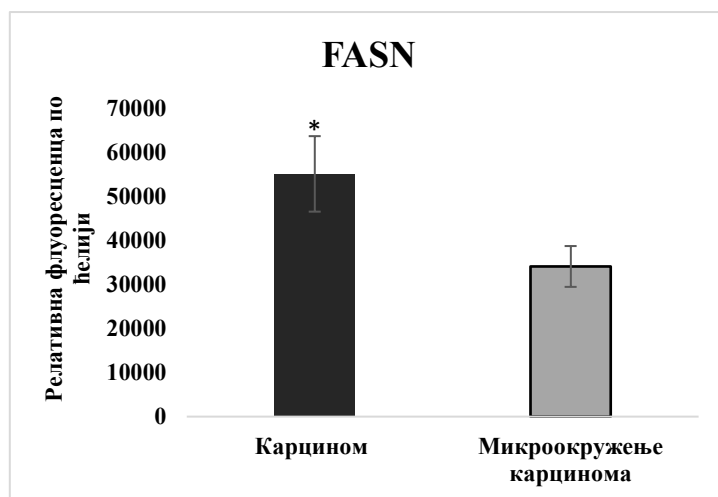
У односу на присуство секундарних метастатских депозита, релативна експресија иРНК *FASN* гена је повишена у узорцима ткива карцинома у поређењу са узорцима ткива из микроокружења. Посебно је потребно нагласити да је релативна експресија иРНК *FASN* гена за 5.56 пута виша у узорцима ткива карцинома у односу на узорке из микроокружења код пацијената код којих су присутни секундарни метастатски депозити (M1).

Када је у питању ниво релативне експресије иРНК *FASN* гена у односу на хистолошки градус, резултати експресије су показали да карциномско ткиво експримира више *FASN* гена у односу на микроокружење карцинома код свих типова градуса (G1-G3). Код G1 хистолошке групе је највећи тренд у повећању релативне експресије иРНК *FASN* гена и то за 6.18 пута више у узорцима ткива карцинома у односу на узорке ткива из микроокружења.

8.3. Протеинска експресија FASN-а

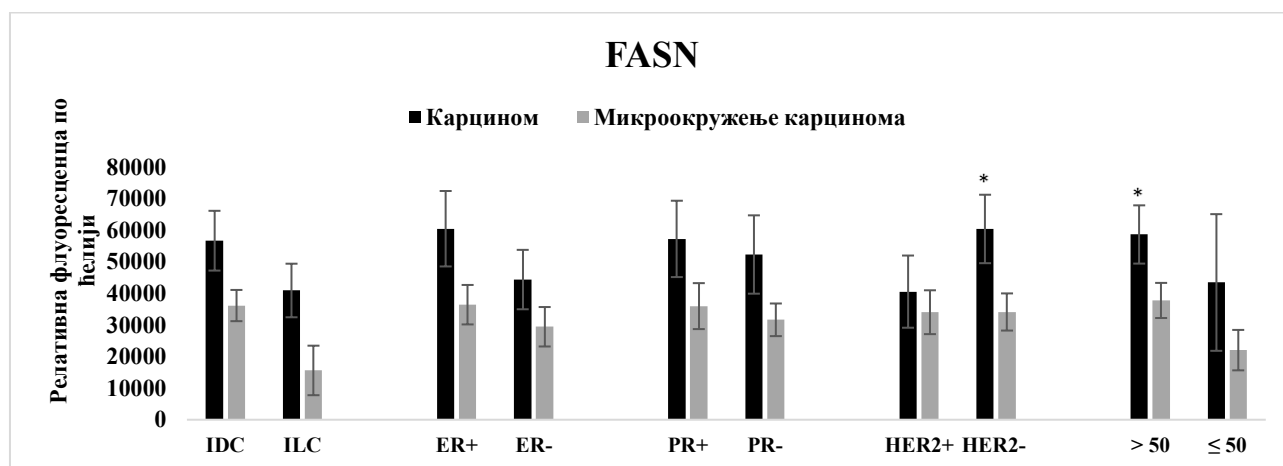
Протеинска експресија FASN-а је детектована методом имунофлуоресценце из парафинских исечака ткива пацијената са карциномом дојке. Микрографије за сваког пацијента су снимане помоћу флуоресцентног микроскопа и након тога квантификоване помоћу ImageJ програма. Добијени резултати су представљени графички, а репрезентативне микрографије свих пацијената су приказане на Сликама 49 и 50.

На Графикону 47 је приказана протеинска експресија FASN-а у ткиву карцинома дојке и микроокружењу карцинома. Ниво тестираног протеина је статистички значајно повишен у карциномском ткиву у односу на узорке из микроокружења карцинома.



Графикон 47. Протеинска експресија FASN-а у ткиву карцинома дојке и микроокружењу карцинома. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика између карцинома и микроокружења карцинома.

На Графикону 48 је приказана протеинска експресија FASN-a у ткиву карцинома дојке и микроокружењу карцинома у односу на клиничко-патолошке карактеристике пацијената (тип карцинома, статус хормонских рецептора и старост). На основу приказаних резултата, протеинска експресија FASN-a је повишена у узорцима ткива карцинома у поређењу са узорцима из микроокружења без обзира на параметре класификације.



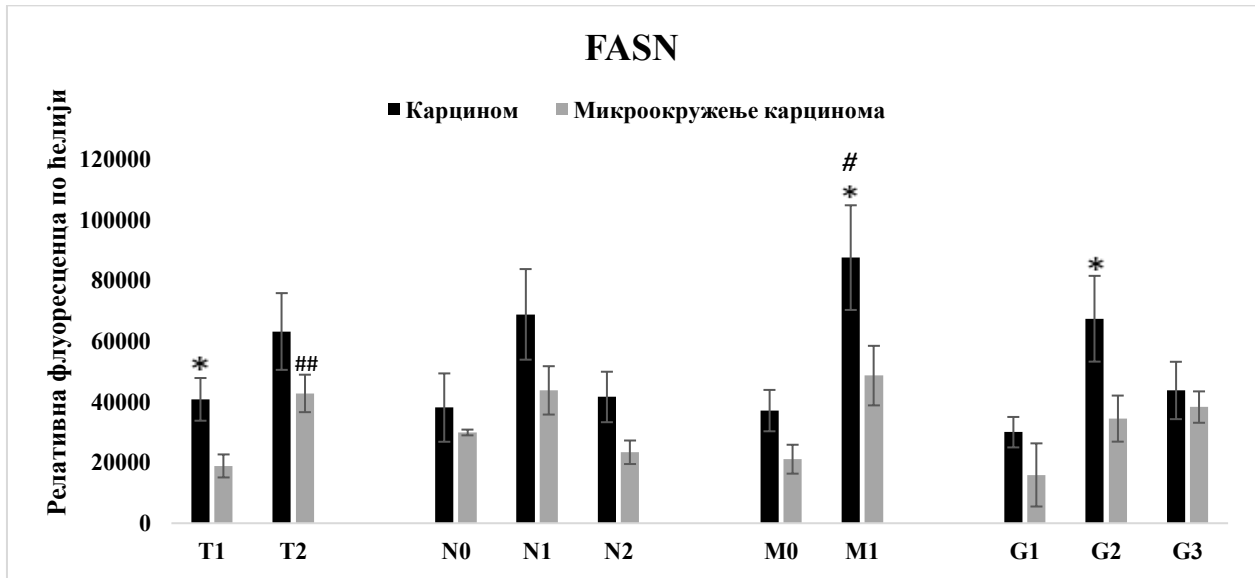
Графикон 48. Протеинска експресија FASN-a у ткиву карцинома дојке и микроокружењу карцинома у односу на клиничко-патолошке карактеристике пацијената. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика између карцинома и микроокружења карцинома.

Протеинска експресија FASN-a је повишена у узорцима ткива дукталног и лобуларног карцинома у поређењу са узорцима ткива из микроокружења.

Код пацијената са ER⁺, PR⁺, HER2⁺ подтипом карцинома дојке повишена је протеинска експресија у узорцима ткива карцинома у поређењу са узорцима ткива из микроокружења. Исти тренд повећања протеинске експресије тестираног параметра је детектован код пацијената са ER⁻, PR⁻, HER2⁻ подтипом карцинома дојке. Посебно је потребно истаћи да је код HER2⁻ подтипа протеинска експресија FASN-a виша за 1.77 пута у узорцима карцинома у односу на узорке ткива из микроокружења, при чему постоји статистички значајана разлика у резултату између ова два типа тестираних узорака.

Протеинска експресија FASN-a је виша за 1.55 пута код узорака ткива карцинома старијих пацијенткиња у односу на ткиво из микроокружења, у односу на оне пацијенткиње које су у тренутку постављања дијагнозе имале мање од 50 година. Статистички је значајна разлика између протеинске експресија узорака ткива карцинома у односу на узорке из микроокружења.

На Графикону 49 су приказани резултати протеинске експресије FASN-a у односу на TNM класификацију и хистолошки градус. Код карцинома мањих од два cm (T1) протеинска експресија FASN-a је 2.16 пута виша у узорцима ткива карцинома у односу на узорке ткива из микроокружења. Такође, код ове групе постоји статистички значајна разлика у протеинској експресији FASN-a између узорака ткива карцинома и микроокружења. Код T2 групе, протеинска експресија FASN-a је 1.48 пута виша у узорцима карцинома у односу на узорке из микроокружења, при чему постоји статистички значајна разлика између тестираних узорака ткива из микроокружења.

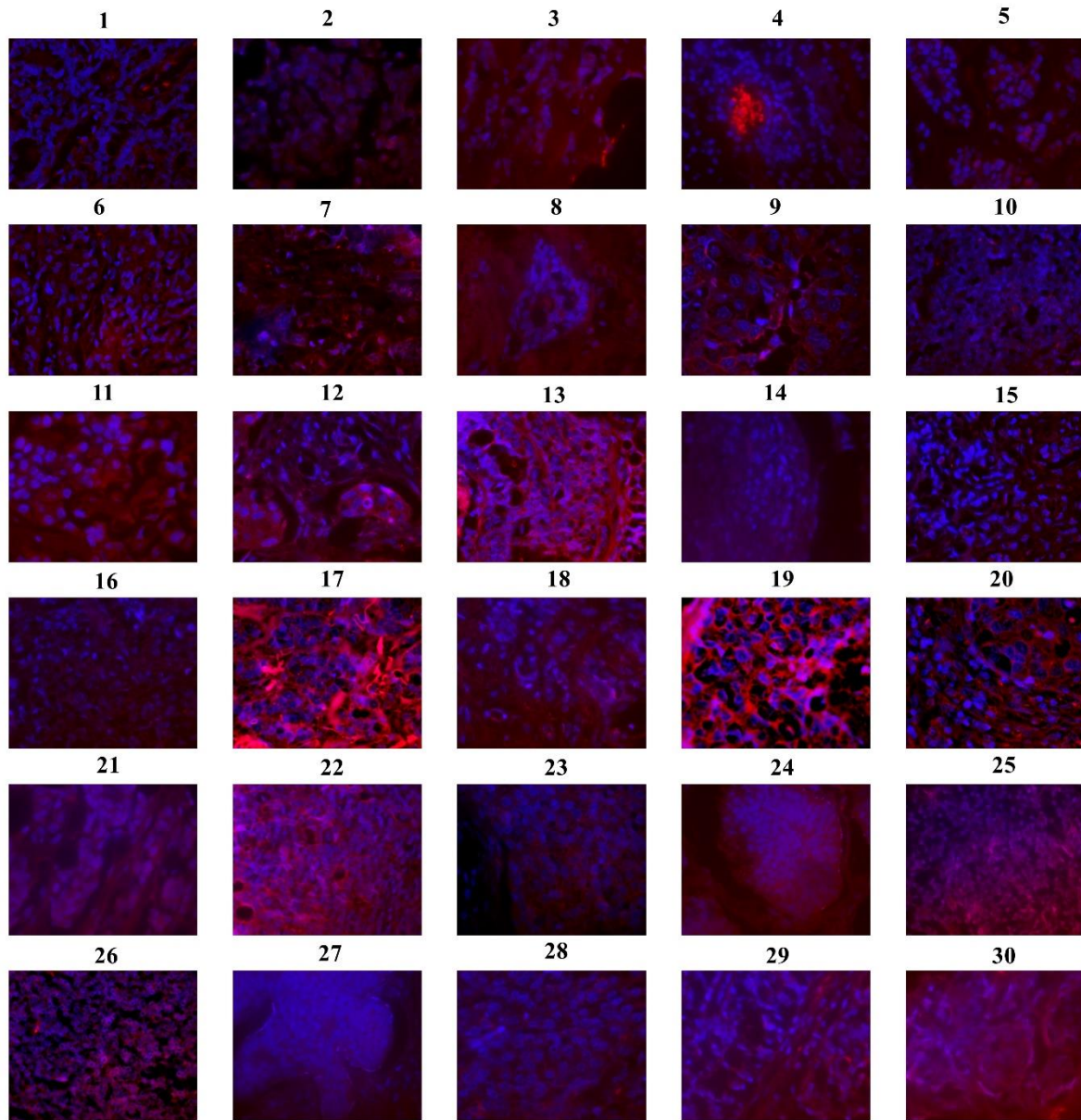


Графикон 49. Протеинска експресија FASN-а у ткиву карцинома дојке и микроокружењу карцинома у односу на TNM класификацију и хистолошки градус пацијената. * $p < 0.05$ статистички значајна разлика између карцинома и микроокружења карцинома; # $p < 0.05$ статистички значајна разлика између карциномских ткива у односу на приказану класификацију; ## $p < 0.05$ статистички значајна разлика између узорака микроокружења карцинома у односу на приказану класификацију. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка из три независна експеримента.

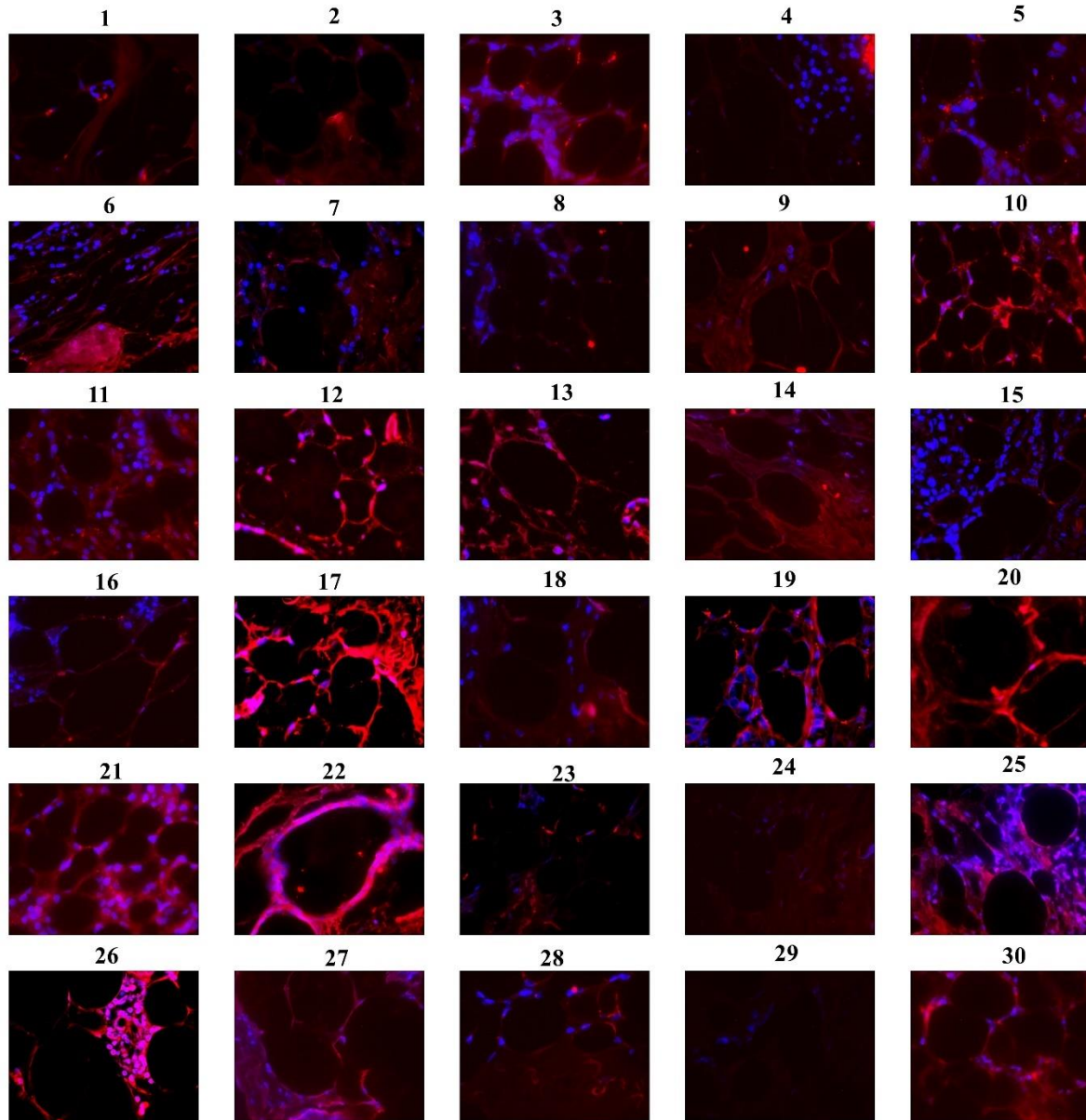
У односу број захваћених лимфних нодуса протеинска експресија FASN-а је значајно повишена код узорака ткива карцинома у односу на узорке из микроокружења. Није забележена правилност у повећавању протеинске експресије FASN-а са напредовањем болести и бројем захваћених лимфних нодуса

Детекција метастаза (M) представља значајан аспект при праћењу прогресије карцинома дојке. Протеинска експресија FASN-а је повишена у узорцима карцинома у односу на узорке ткива из микроокружења како код пацијената код којих нису детектовани метастатски депозити (M0) и код којих су детектовани (M1). Код M1 групе пацијената протеинска експресија FASN-а је 1.80 пута виша у узорцима ткива карцинома у односу на микроокружење и постоји статистички значајна разлика у резултату протеинске експресије између два типа испитиваних узорака. Такође, постоји статистички значајна разлика у резултатима протеинске експресије FASN-а између узорака ткива карцинома.

Узимајући у обзир резултате који приказују диференцијацију карциномских ћелија (G), протеинска експресија FASN-а је повишена у узорцима ткива карцинома у односу на узорке из микроокружења. Није забележена правилност у повећању нивоа протеинске експресије FASN-а у односу на степен градуса. Међутим, у G2 степену ниво протеинске експресије FASN-а је највиши и постоји статистички значајна разлика између узорака ткива карцинома и узорака из микроокружења.



Слика 49. Протеинска експресија FASN-а у 30 узорака ткива карцинома дојке. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600х. Једра су обојена плаво (DAPI), FASN је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



Слика 50. Протеинска експресија FASN-а у 30 узорака ткива из микроокружења карцинома дојке. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600х. Једра су обојена плаво (DAPI), FASN је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

9. Машинско учење: Побољшање TNM класификационог модела карцинома дојке

Резултати протеинске експресије FASN-а заједно са клиничко-патолошким карактеристикама пацијената су чинили сет података за обрађивање савременим методама надгледаног машинског учења. Пет различитих класификационих модела (алгоритама) је тестирано у овом истраживању на дефинисаном сету података у узорцима карцинома и микроокружења код пацијената оболелих од карцинома дојке. Особине класификационих модела које су праћене приликом обраде података биле су: тачност, сензитивност, прецизност и вредност ROC/AUC криве.

9.1. Повезаност молекуларних маркера у карциномском ткиву и микроокружењу карцинома са величином тумора

Алгоритам Стабло одлучивања (Табела 20) је остварио најбоље резултате на дефинисаном сету података за узорке ткива карцинома дојке, при чему се издваја оптималан хиперпараметар са следећим вредностима: {'criterion': 'entropy', 'max_depth': 2, 'splitter': 'best'}. Хиперпараметри за остале примењене алгоритме су:

1. Логистична регресија: {'C': 4.281332398719396, 'max_iter': 1000, 'penalty': 'l2', 'solver': 'sag'}.
2. Случајна шума: {'criterion': 'gini', 'max_depth': 7, 'max_features': 'sqrt', 'n_estimators': 10}.
3. Метода потпорних вектора – SVM: {'C': 1.623776739188721, 'gamma': 'scale', 'kernel': 'linear'}.
4. К најближих суседа - k-NN: {'algorithm': 'auto', 'weights': 'distance'}.

Табела 20. Резултати валидације примењених модела алгоритама на узорцима ткива карцинома дојке на као скупу података за тестирању променљиву Т (величина тумора).

Назив алгоритма	Тачност	Сензитивност	Прецизност	ROC/AUC
Логистичка регресија	0.833	0.825	0.835	0.85
Стабло одлучивања	0.966	0.95	0.98	0.95
Случајна шума	0.9	0.875	0.919	0.975
Метода потпорних вектора	0.9	0.875	0.9349	0.95
К најближих суседа	0.766	0.7416	0.78	0.7875

Алгоритам Случајна шума је остварио најбоље резултате на сету података за узорке ткива из микроокружења карцинома дојке са хиперпараметром: {'criterion': 'gini', 'max_depth': 5, 'max_features': 'sqrt', 'n_estimators': 10} (Табела 21). Добијени хиперпараметри за остале логаритме који су примењени у овом истраживању су:

1. Логистичка регресија: {'C': 0.3593813663804626, 'max_iter': 100, 'penalty': 'l2', 'solver': 'newton-cg'}.
2. Стабло одлучивања: {'criterion': 'gini', 'max_depth': 7, 'splitter': 'best'}.

3. Метода потпорних вектора: {'C': 11.288378916846883, 'gamma': 'scale', 'kernel': 'linear'}.
4. К најближих суседа: {'algorithm': 'auto', 'weights': 'distance'}.

Табела 21. Резултати валидације примењених модела алгоритама на узорцима ткива из микроокружења карцинома дојке на као скупу података за тестирану променљиву Т (величина тумора).

Назив алгорита	Тачност	Сензитивност	Прецизност	ROC/AUC
Логистичка регресија	0.833	0.8083	0.865	0.875
Стабло одлучивања	0.966	0.975	0.966	0.975
Случајна шума	0.966	0.95	0.98	1.0
Метода потпорних вектора	0.9	0.875	0.9266	0.95
К најближих суседа	0.866	0.825	0.885	0.8375

На основу приказаних резултата евидентна је значајна повезаност протеинске експресије FASN-а у узорцима ткива пореклом из карцинома и микроокружења са величином тумора код пацијената са карциномом дојке. Може се закључити да FASN значајно доприноси побољшању TNM класификационог модела карцинома дојке са посебним освртом на параметар који описује величину тумора.

9.2. Повезаност молекуларних маркера у карциномском ткиву и микроокружењу карцинома са регионалном лимфонодалном инвазијом

Стабло одлучивања се издваја као најбоље рангиран алгоритам на дефинисаном сету података у узорцима ткива карцинома и ткива из микроокружења приликом испитивања повезаности протеинске експресије FASN-а и регионалне лимфонодалне инвазије. Вредности за тачност, сензитивност и специфичност су преко 0.9 при чему је овај класификатор дефинисан као одличан. Вредности за ROC/AUC криве изостају, јер је променљива која описује праћени параметар мултикласна а не бинарна (Табела 22 и Табела 23). Алгоритам Стабло одлучивања је остварио најбоље резултате на сету података за узорак ткива карцинома дојке са хиперпараметром: {'criterion': 'entropy', 'max_depth': 8, 'splitter': 'random'}. Хиперпараметри за остале алгоритме су:

1. Логистичка регресија: {'C': 0.0001, 'max_iter': 100, 'penalty': 'none', 'solver': 'lbfgs'}.
2. Случајна шума: { 'criterion': 'gini', 'max_depth': 7, 'max_features': 'auto', 'n_estimators': 70}
3. Метода потпорних вектора: {'C': 29.763514416313132, 'gamma': 'auto', 'kernel': 'rbf'}.
4. К најближих суседа: {'algorithm': 'auto', 'weights': 'uniform'}.

Вредност хиперпараметра за алгоритам Стабло одлучивања на дефинисаном сету података о узорцима ткива пореклом из микроокружења карцинома је: {'criterion': 'gini', 'max_depth': 6, 'splitter': 'random'}, док су хиперпараметри за остале алгоритме:

1. Логистичка регресија: {'C': 0.0001, 'max_iter': 1000, 'penalty': 'none', 'solver': 'sag'}

2. Случајна шума: { 'criterion': 'entropy', 'max_depth': 6, 'max_features': 'auto', 'n_estimators': 40 }
3. Метода потпорних вектора: {'C': 4.281332398719396, 'gamma': 'scale', 'kernel': 'rbf'}
4. К најближих суседа: {'algorithm': 'auto', 'weights': 'distance'}.

Табела 22. Резултати валидације примењених алгоритама на узорима ткива карцинома дојке као скупу података за тестирану променљиву Н (захваћеност лимфних нодуса).

Назив алгорита	Тачност	Сензитивност	Прецизност	ROC/AUC
Логистичка регресија	0.8	0.7222	0.7294	/
Стабло одлучивања	0.933	0.9444	0.9527	/
Случајна шума	0.866	0.8111	0.7861	/
Метода потпорних вектора	0.9	0.8888	0.8777	/
К најближих суседа	0.633	0.5222	0.5222	/

Табела 23. Резултати валидације примењених алгоритама на узорима ткива микроокружења карцинома дојке као скупу података за променљиву Н (захваћеност лимфних нодуса).

Назив алгорита	Тачност	Сензитивност	Прецизност	ROC/AUC
Логистичка регресија	0.8	0.7	0.7127	/
Стабло одлучивања	0.9	0.933	0.944	/
Случајна шума	0.866	0.811	0.8	/
Метода потпорних вектора	0.866	0.866	0.866	/
К најближих суседа	0.766	0.7222	0.7055	/

На основу приказаних резултата, протеинска експресија FASN-а је значајно побољшала класификациони параметар који описује регионалне лимфонодалне инвазије на модел систему карцинома дојке који се налази у склопу TNM класификационог модела.

9.3. Повезаност молекуларних маркера у карциномском ткиву и микроокружењу карцинома са појавом удаљених метастаза

Приликом испитивања повезаности протеинске FASN-а са појавом удаљених метастаза алгоритам Случајна шума је остварио најбоље резултате на дефинисаном сету података за узорке ткива пореклом из карцинома дојке и микроокружења. Представљене вредности за тачност, сензитивност и прецизност су 0.76 што овај класификатор према подели описује као фер. Вредности за ROC/AUC криву изостају, јер је тестирана променљива мултикласна а не бинарна (Табели 24 и 25). Хиперпараметар за најбоље рангиран алгоритам на дефинисаном сету података за узорке ткива карцинома је: {'criterion': 'gini', 'max_depth': 3, 'max_features': 'auto', 'n_estimators': 70}, док су хиперпараметри за остале алгоритме на истом сету података:

1. Логистичка регресија: {'C': 0.0001, 'max_iter': 100, 'penalty': 'none', 'solver': 'sag'}.
2. Стабло одлучивања: {'criterion': 'gini', 'max_depth': 3, 'splitter': 'best'}.
3. Метода потпорних вектора: {'C': 206.913808111479, 'gamma': 'scale', 'kernel': 'rbf'}.
4. К најближих суседа: {'algorithm': 'auto', 'weights': 'uniform'}.

Хиперпараметар за најбоље рангиран алгоритам Случајна шума на сету података за узорке ткива пореклом из микроокружења карцинома је: {'criterion': 'gini', 'max_depth': 2, 'auto': 'auto', 'n_estimators': 30}, За остале коришћене алгоритме хиперпараметри су:

1. Логистичка регресија: {'C': 166.81005372000558, 'max_iter': 100, 'penalty': 'l2', 'solver': 'liblinear'}
2. Стабло одлучивања: {'criterion': 'gini', 'max_depth': 2, 'splitter': 'random'}
3. Метода потпорних вектора: {'C': 1000.0, 'gamma': 'auto', 'kernel': 'rbf'}
4. К најближих суседа: {'algorithm': 'auto', 'weights': 'uniform'}.

Табела 24. Резултати валидације примењених модела алгоритама на узорцима карцинома дојке као скупу података за тестирану променљиву М (присуство метастаза).

Назив алгоритма	Тачност	Сензитивност	Прецизност	ROC/AUC
Логистичка регресија	0.7	0.7333	0.7333	/
Стабло одлучивања	0.7666	0.7444	0.7111	/
Случајна шума	0.766	0.7666	0.7777	/
Метода потпорних вектора	0.6666	0.6777	0.6555	/
К најближих суседа	0.533	0.5111	0.5055	/

Табела 25. Резултати валидације примењених модела алгоритама на узорцима микроокружења карцинома дојке као скупу података за тестирану променљиву М (присуство метастаза).

Назив алгоритма	Тачност	Сензитивност	Прецизност	ROC/AUC
Логистичка регресија	0.7	0.6888	0.6888	/
Стабло одлучивања	0.7	0.7111	0.7111	/
Случајна шума	0.7666	0.7555	0.766	/
Метода потпорних вектора	0.6666	0.6777	0.6544	/
К најближих суседа	0.5333	0.4777	0.3888	/

На основу приказаних резултата постоји одређени степен повезаности протеинске експресије FASN-а са појавом удаљених метастаза код пацијената са карциномом дојке. Неопходно је поновити истраживање на већем броју узорака метастатског карцинома дојке и тестирати поново све параметре надгледаног машинског учења са циљем проналажења адекватног класификатора који ће бити користан у клиничке сврхе.

V ДИСКУСИЈА

Упркос огромним напорима који су начињени како би се побољшали терапијски протоколи у антитуморској терапији, карцином дојке је још увек један од водећих узрока mortalитета широм света. Иако постоји велики број различитих терапијских стратегија у борби против ове болести, развој резистенције на терапију је веома велики проблем јер резултира смањењем антитуморске ефикасности. (Jourdan и сар., 2020). Процес развоја нових лекова је веома скуп и укључује дизајн и синтезу лека као и тестирање на ћелијским и анималним моделима како би се испитала искористљивост и безбедност лека. Да би се тачно одредила доза лека и проценила његова ефикасност, потребна је и додатна клиничка евалуација. Истраживања новијег датума су се фокусирали на алтернативну стратегију односно на процес пренамене лекова који се заснива на тестирању већ одобрених клиничких лекова са познатим фармаколошким својствима са циљем идентификације нових терапијских индикација. За разлику од *de novo* развоја лекова, пренамена лекова има бројне предности које укључују већу ефикасност и искористљивост, мање временске и финансијске издатке као и упознавање са новим фармакокинетичким и фармакодинамичким својствима лекова (Rodrigues и сар., 2022).

У оквиру ове докторске дисертације у првом делу истраживања, испитиван је *in vitro* ефекат Орлистата и Симвастатина на ћелијским линијама карцинома дојке. Гојазност и хиперхолестеролемија као метаболичке болести су главни фактори ризика за настанак карцинома дојке па су ови медикаменти одабрани као третмани од интереса. Орлистат је први одобрен лек од стране Светске здравствене организације који се користи за редукцију телесне тежине, док је Симвастатин први лек избора за третман хиперхолестеролемије. Обзиром да је примена суплемента на биљној бази у антитуморској терапији заузела веома важно место, у оквиру овог истраживања тестирана је и биолошка активност метанолног екстракта цветова *O. minimum* као биљке која се у народној медицини користи за редукцију телесне тежине и повишеног нивоа холестерола у крви одраслих особа.

Антитуморски ефекти Орлистата и Симвастатина

Цитотоксична активност. Антитуморски ефекат Орлистата и Симвастатина је праћен са аспекта цитотоксичности на имортализованим ћелијским линијама карцинома дојке (MDA-MB-231 и MDA-MB-468) у *in vitro* условима. На основу приказаних резултата, може се закључити да оба испитивана третмана значајно снижавају вијабилност тестираних ћелија, чему сведоче и ниске IC₅₀ вредности. Упоредјујући резултате цитотоксичности ова два третмана, јасно је да Симвастатин има јачи цитотоксични ефекат на испитиваним ћелијама карцинома дојке. MDA-MB-231 ћелијска линија карцинома дојке је отпорнија на дејство испитиваних третмана. У складу са добијеним резултатима су и истраживања других аутора која потврђују цитотоксичност Орлистата на модел систему ћелија леукемије (JURKAT), ћелија карцинома дојке (SK-Br3, BT-474, MDA-MB-453, MDA-MB-435, MDA-MB-231, T47D и MCF-7) и оваријума (SKOV3) (Menendez и сар., 2006; Cioccoloni и сар., 2019). Такође, увидом у литературне податке Симвастатин је показао одличну цитотоксичну активност на MCF-7 и MDA-MB-231 ћелијама карцинома дојке (Rezano и сар., 2021) што је у складу са приказаним резултатима.

Цитотоксичност је праћена и на здравим MRC-5 ћелијама јер цитотоксични третмани често поред смањења вијабилности карциномских ћелија утичу и на

вијабилност здравих. Орлистат није индуковао цитотоксичан ефекат на испитиваним здравим ћелијама јер је IC_{50} вредност виша од највеће тестиране дозе. Овај резултат упућује на селективност у антитуморском деловању Орлистата, што је потврђено и наводима других аутора који су за своја истраживања користили здраве ћелијске линије фибробласте коже и PrECs ћелије простате (Kridel и сар., 2004). Са друге стране, Симвастатин је индуковао значајну цитотоксичност на тестираним здравим MRC-5 ћелијама (Табела), а овај ефекат је потврђен и на здравим SAEC ендотелним ћелијама плућа (Ahmadi и сар., 2023).

Цитотоксичност испитаних третмана на ћелијским линијама карцинома дојке може се окарактерисати као значајна, поготово када се упореди са цитотоксичношћу паклитаксела који се користи као стандардни цитостатик у терапији карцинома дојке. Према доступним литературним подацима IC_{50} вредности паклитаксела на MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ћелијама карцинома дојке су 4.6 nM на MDA-MB-468 ћелијама, односно 7 nM на MDA-MB-231 ћелијама карцинома дојке након 72 часа од примене третмана (Valsalakumari и сар., 2021). Иако обе тестиране ћелијске линије карцинома дојке воде порекло из истог органа, разликују се према метастатском потенцијалу, молекуларном подтипу па самим тим и осетљивошћу на дејство потенцијалних антитуморских агенаса. Према карактеризацији MDA-MB-468 ћелије карцинома дојке су такође троструко негативне, али са нижим метастатских потенцијалом и базалним фенотипом у поређењу са MDA-MB-231 ћелијама које су клаудин ниског фенотипа што их чини веома агресивнијим и отпорнијим на терапију (Holliday и Speirs, 2011).

Цитотоксични механизам деловања Орлистата и Симвастатина на ћелије карцинома заправо се заснива на хиполипидемијској ефекту који ови лекови остварују на ћелијском нивоу. Наиме, различите класе масних киселина и сложених липида као што је холестерол представљају основне градивне компоненте ћелијске мембране. Прекомерна концентрација палмитата, као прве масне киселине која настаје ендогено у процесу синтезе утиче на биофизичка својства ћелијске мембране код карцинома. Такође, прекомеран егзогени унос масних киселина и липида из хране доводи до њене дисфункције. У оба случаја долази до активације кључних молекула који стимулишу различите сигналне путеве за пролиферацију и преживљавање карциномских ћелија посебно оних са агресивним фенотипом (Buckley и сар., 2017; Cioccoloni и сар., 2019). Заједничка особина Орлистата и Симвастатина је да блокирају прекомерно накупљање егзогено унетих масних киселина и сложених липида као и *de novo* синтетисаних у ћелијама и на тај начин утичу на метаболичку активност и функцију ћелијске мембране механизмом лизирања. Управо овај механизам деловања може бити одговоран за њихово цитотоксично дејство на испитиваним ћелијским линијама карцинома дојке, јер ови третмани значајно утичу на трансдукцију сигнала преко мембранских протеина који регулишу пролиферацију, диференцијацију и апоптозу (Ibrahim и сар., 2019).

Апоптотски потенцијал. Механизам цитотоксичног деловања Орлистата и Симвастатина је даље испитан одређивањем типа ћелијске смрти обзиром да су ови третмани значајно инхибирали раст ћелија карцинома дојке. Орлистат и Симвастатин су доминантно индуковали апоптозу у обе тестиране ћелијске линије карцинома дојке, док је мањи проценат некрозе детектован само након примене Симвастатина на MDA-MB-468 ћелије. Морфолошке промене у ћелијама карцинома дојке које су настале након примене третмана одговарају стадијумима ране и касне апоптозе. Најповољнији механизам антитуморског деловања агенаса је управо индукција апоптозе, док се некроза сматра непожељним типом ћелијске смрти јер изазива инфламацију, јак имуни одговор и резистенцију на ординирајућу терапију (Pistritto и сар., 2016).

Проапоптотски ефекат Орлистата је потврђен на MDA-MB-231 ћелијама карцинома дојке методом бојења анексином V и употребом биосензора GC3AI што је у складу са приказаним резултатима у оквиру овог истраживања (Cui и сар., 2017). Azadbakht и сар., 2015. су показали да се биосинтеза фосфолипида повећава током G1 и S фазе ћелијског циклуса, а с обзиром да Орлистат зауставља ћелијски циклус управо у овим фазама блокирајући биосинтезу сложених липида, последично индукује значајан антипролиферативни и проапоптотски ефекат. *In vitro* и *in vivo* студије су доказале да статини, посебно Симвастатин, значајно снижавају пролиферацију ћелијама карцинома дојке и индукују апоптозу (Goralan и сар., 2013; Shen и сар., 2015). У испитивањима апоптотског ефекта Симвастатина TUNEL методом, на MCF-7 и MDA-MB 231 ћелијама карцинома дојке показано је да овај третман индукује апоптозу, при чему су на микрографијама приказане промене које представљају кондензацију једра и стварање апоптотских тела (Koyuturk и сар., 2007) што је потврђено и након бојења АО/ЕВ на микрографијама из ове студије.

Редокс хомеостаза. Ћелије карцинома карактерише висока концентрација ROS-а у поређењу са здравим ћелијама, која настаје као резултат дисбаланаса између оксиданаса и антиоксиданаса. Као последица овог дисбаланса настаје оксидациони стрес који се сматра новом циљном метом у борби против карцинома. Овај ефекат може бити изазван повећањем егзогеног ROS-а и/или инхибицијом ендогеног заштитног антиоксидационог система при чему се смањује вијабилност карциномских ћелија и индукује апоптозу (Van Loenhout и сар., 2020). Као најпознатије врсте ROS-а праћене су концентрације O_2^- и H_2O_2 у троструко негативним ћелијама карцинома дојке након примене Орлистата и Симвастатина. Добијени резултати указују на значајан прооксидациони ефекат и индукцију оксидационог стреса након примене оба третмана на ћелије карцинома дојке. Смањење процента вијабилности ћелија може бити повезано са редокс дисбалансом у ћелијама карцинома уколико на њих делује неки цитотоксични агенс (Milutinović и сар., 2019). Према литературним подацима Орлистат изазива апоптозу која је праћена повећањем ROS-а и активацијом проапоптотских каспаза у ћелијама карцинома простате (Wright и сар., 2017). Buranrat и сарадници су показали да исти биолошки ефекат постиже и Симвастатин на MCF-7 ћелијама карцинома дојке (Buranrat и сар., 2017), што је у складу са приказаним резултатима. Још једна студија која потврђује добијене резултате објашњава да је акумулација ROS-а је у корелацији са дисфункцијом митохондрија и иницијацијом апоптозе преко активације каспазе 3 и цит C при чему изазива хиперсензитивност ћелија карцинома и оксидативни стрес као реакцију на примену цитотоксичних третмана, што за последицу има смањење вијабилности ових ћелија (D'Autrèaux и Toledano, 2007).

Повишене концентрације ROS-а могу да активирају и процес липидне пероксидације, где се ослобађа MDA као секундарни гласник који иницира оксидациони стрес и интерагује са мембранским липидима изазивајући промену пермеабилности ћелијске мембране (Su и сар., 2019). Орлистат и Симвастатин су значајно индуковали повећање концентрације MDA у троструко негативним ћелијама карцинома дојке, што значи да су довели до оштећења мембранских липида. Овај резултат је у складу са наводима других аутора који су потврдили да Орлистат и Симвастатин значајано повећавају концентрацију MDA у A549 и H1299 ћелијама карцинома плућа и MCF-7 и MDA-MB-231 ћелијама карцинома дојке, што за последицу има смањење вијабилности ових ћелија и индуковање апоптозе (Li и сар., 2014; Hwang и сар., 2014; Castellanos-Esparza и сар., 2018; Нео и сар., 2023).

Глутатион је значајан хидрофилни трипептид који има улогу да штити ћелије од егзогенних и ендогенних токсина као и од прекомерне концентрације ROS-а и RNS-а

(Aquilano и сар., 2014). У ћелијама карцинома висока концентрација GSH је неопходна за уклањање прекомерно синтетисаних врста ROS-а и детоксикацију ксенобиотика, што га чини потенцијалном метом у антитуморској терапији (Niu и сар., 2021). Резултати процене антиоксидативног капацитета, мерењем концентрације GSH након примене третмана, указују на постојање оксидационог стреса у тестираним ћелијама карцинома дојке, јер је концентрација GSH значајно повишена у тестираним ћелијама. Када се упореде нивои GSH код оба третмана, примећује се да је поменути параметар виши након примене Симвастатина. Овај резултат говори у прилог томе да Симвастатин индукује значајније повећање концентрације ензима антиоксидационе заштите у ћелијама карцинома како би се исте одбраниле од оксидационог стреса. Генерално повећање концентрације GSH након примене третмана, директно указује и на повећање његове оксидоване форме, односно указује на то да је GSH синтетисан *de novo* у ћелијама карцинома дојке. Орлистат је индуковао повећање GSH у EAC и MCF-7 ћелијама карцинома дојке и PANC-1 ћелијама карцинома панкреаса (Saleh и сар., 2019), а исти ефекат постигао је и Симвастатин на MCF-7 ћелијама карцинома дојке (Ibrahim и сар., 2019), што је у складу са наведеним резултатима. Обзиром да Орлистат и Симвастатин индукују значајну цитотоксичност, апоптозу и оксидациони стрес преко повећања концентрације најзначајнијих врста ROS-а, MDA и GSH, значајни су кандидати за потенцијалне антитуморске агенсе посебно у терапији троструко негативних карцинома дојке.

Ангиогенеза. Ангиогенеза представља процес развоја нових крвних судова, и кључна је како за физиолошки развој тако и за регулацију патолошких процеса као што су прогресија тумора, зарастање рана, кардиоваскуларне, инфламаторне, исхемијске и инфективне болести (Folkman, 1995). Један од најважнијих ангиогених параметара које луче туморске ћелије и на тај начин стимулишу пролиферацију ендотелних ћелија, миграцију, ангиогенезу, метастазирање и васкуларну пермеабилност је VEGF (Madu и сар., 2020). Орлистат и Симвастатин су значајно снизили експресију VEGF-а на транскрипционом и протеинском нивоу. Увидом у литературне податке није пронађено ниједно истраживање које је пратило ефекат Орлистата на експресију VEGF-а на модел системима карцинома. Једини доступни литературни податак који се тиче инхибиције VEGF-а директном применом Орлистата описан је код HUVEC ћелија. Наиме, овај третман блокира VEGF-индуковану пролиферацију HUVEC ћелија и индукује апоптозу чак и након примене у микромоларним концентрацијама (Browne и сар., 2006). Према наводима Wang и сар., 2018, Симвастатин је у појединачном третману инхибирао протеинску експресију VEGF-а у 4T1 ћелијама карцинома дојке. Регулацијом активности микро РНК miR-140-5p уз помоћ третмана са Симвастатином супримирана је пролиферација ћелија директним таргетовањем VEGF-а у MDA-MB-231 и MCF-7 ћелијама карцинома дојке (Lu и сар., 2017; Bai и сар., 2019). Инхибитори VEGF-а који се користе као стандардни цитостатици у антитуморској терапији често изазивају и нежељене ефекте као што су хипертензија, кардиоваскуларна исхемија и тромбоемболија (Touyz и сар., 2017). У поређењу са стандардним инхибиторима VEGF-а, Симвастатин и Орлистат не повећавају ризик од настанка кардиоваскуларних поремећаја (Criner и сар., 2014).

Васкуларна мрежа има задатак да дистрибуира кисеоник и хранљиве материје свим ћелијама у телу. Стога није изненађујуће што оптимална концентрација O_2^- у ћелијама служи као примарни регулатор овог комплексног система. Када је концентрација O_2^- ниска настаје хипоксично стање унутар ћелија, па се активира HIF-1 α као један од главних транскрипционих фактора који контролише експресију бројних проангиогених гена укључујући и VEGF (Krock и сар., 2011). Орлистат и Симвастатин

значајно смањују експресију HIF-1 α на транскрипционом нивоу на модел систему троструко-негативних ћелија карцинома дојке. Приказани резултати су у складу са наводима аутора Seguin и сар., 2012, који потврђују да након примене Орлистата на B16-F10 ћелије меланома долази до протеозомске деградације HIF-1 α па самим тим и смањења протеинске експресије овог транскрипционог фактора што представља антиагиогени ефекат овог лека. Симвастатин је такође инхибирао протеинску експресију HIF-1 α у 4T1 ћелијама карцинома дојке и на тај начин постигао исти ефекат. Иста студија потврђује инхибицију HIF-1 α Симвастатином на протеинском нивоу уз помоћ специјално дизајнираних siRNA у MDA-MB-231 и 4T1 ћелијама карцинома дојке (Wang и сар., 2018).

Следећи корак у процесу ангиогенезе је деградација базалне мембране уз помоћ MMP које се ослобађају из околног микроокружења, деградују колаген и друге компоненте екстраћелијског матрикса стимулишући ћелије карцинома да мигрирају. Међутим, MMP се могу лучити и из ендотелних ћелија које су активирани VEGF-ом при чему учествују у формирању нове васкуларне мреже (Cabral-Pacheco и сар., 2020). Третман са Орлистатом и Симвастатином је значајно редуковао ниво MMP-9 на транскрипционом и протеинском нивоу у троструко-негативним ћелијама карцинома дојке у односу на контролне вредности. Према литературним наводима, Орлистат је снижио протеинску експресију MMP-9 и VEGF-a, циклина D1 и Bcl-2 инхибирајући активност AKT и ERK сигналних путева у PC-3 ћелијама карцинома простате. Смањење активности наведених протеина, а првенствено MMP-9 и VEGF-a има за последицу инхибицију пролиферације, инвазије, миграције и ангиогенезе у PC-3 ћелијама карцинома простате (Туан и сар., 2021). У *in vitro* условима, Симвастатин је инхибирао ензимску активност MMP-9 у T47D и MDA-MB-231 ћелијама карцинома дојке вероватно блокадом мевалонатног сигналног пута, јер је овај агенс његов главни инхибитор (Coimbra и сар., 2010). У MCF-7 ћелијама карцинома дојке Симвастатин је инхибирао процес ангиогенезе директним смањењем MMP-2, MMP-9, и VEGF-a, и додатно иницирао ROS-зависан оксидациони стрес што је допринело значајном антитуморском ефекту овог третмана (Ibrahim и сар., 2019). На основу свега наведеног, постигнути резултати у оквиру наведене студије су у складу са приказаним истраживањем.

Активација хемокина индукује транскрипцију гена који иницирају миграцију и инвазију ћелија карцинома у екстрацелуларни матрикс, доприносећи активацији ангиогенезе (Zielińska и сар., 2020). Хемокински рецептор CXCR4 и његов лиганд CXCL12 су експримирани чак у 75% троструко негативних типова ћелијама карцинома дојке, па је његова активност повезана са агресивним фенотипом карцинома дојке (Zhao и сар., 2014). Као и у случају претходно праћених параметара који регулишу ангиогенезу, Орлистат и Симвастатин смањују ниво експресије CXCR4 рецептора на протеинском нивоу као и лиганда CXCL12 на транскрипционом нивоу у ћелијама карцинома дојке. Веома је мало литературних података о деловању оних третмана на ниво експресије CXCR4/CXCL12 у различитим модел системима карцинома. Хемокини, цитокини и адипокини су важни инфламаторни параметри који су повезани са ризиком од настанка карцинома дојке који је проузрокован гојазношћу. Ткиво дојке у највећем проценту чини масно ткиво које је метаболички веома активно и место је синтезе одређених класа проангиогених и инфламаторних цитокина и хемокина, стога њихова повишена експресија може иницирати развој карцинома (Khan и сар., 2013; Ungefroren и сар., 2015). Имајући у виду да је Орлистат регистрован лек за редукцију телесне масе није изненађујуће што је значајно снижио експресију CXCR4/CXCL12 и на овај начин деловао као антиангиогени агенс на троструко-негативне ћелије карцинома дојке. Инхибиција CXCR4 супримира раст карцинома јер је овај параметар укључен у регулацију VEGF посредоване ангиогенезе у ћелијама (Banik и сар., 2022), што је у складу са приказаним

результатима ове студије. Увидом у доступне литературне податке такође нема информација о *in vitro* биолошком ефекту Симвастатина на регулацију CXCR4/CXCL12 на модел системима карцинома. Праћена је експресија CXCR4/CXCL12 након примене Симвастатина на здравим HUVEC ћелијама, при чему је евидентно смањење експресије ових параметра након употребе третмана у микроларним концентрацијама (Masori и сар., 2010). Једина *in vivo* студија која је пратила ефекат Симвастатина на пацијенткињама са карцином дојке пре и после његове оралне примене показала је да експресија CXCR4 на транскрипционом нивоу снижава. Запажена је значајна корелација између смањења експресије CXCR4 рецептора и пацијенткиња са хиперолестеријемизмом као и оних које имају ER⁺/PR⁺ подтип карцинома дојке (Yulian и сар., 2016).

Биосинтеза масних киселина. Најједноставнији начин за смањење концентрације масних киселина у ћелијама карцинома је управо преко блокирања њихове синтезе или смањења концентрације ендогених слободно циркулишућих масних киселина и липида (Koundourgos и Poulgiannis, 2020). Концентрација укупних липида након примене Орлистата и Симвастатина је значајно смањена у ћелијама карцинома дојке. Мембрана ћелија карцинома је сачињена од различитих класа есенцијалних масних киселина и сложених липида са важном градивном улогом у одржавању њеног структурног интегритета и флуидности. Нарушавање хомеостазе ћелијске мембране смањењем концентрације есенцијалних масних киселина уводи ћелије карцинома у апоптозу смањењем њиховог пролиферативног потенцијала (Yanovski и Yanovski, 2014; Paukner и сар., 2022). Орлистат је најпознатији блокатор процеса биосинтезе масних киселина у ћелијама карцинома, и управо његов биолошки и фармаколошки ефекат је резултат смањења концентрације укупних липида у тестираним ћелијама карцинома дојке. Симвастатин је инхибитор HMG-CoA редуктазе, ензима који учествује првенствено у синтези холестерола као главног структурног липида у плазма мембрани (Paukner и сар., 2022). Осим структурне улоге, холестерол је прекурсор за синтезу жучних киселина и стероидних хормона, чија аберантна продукција може да допринесе настанку и прогресији карцинома дојке, колоне и простате (Huang и сар., 2020). Механизам деловања Симвастатина је последица компетитивне инхибиције HMGCR редуктазе која је ензим директно везан за синтезу холестерола, па инхибицијом овог ензима долази и до редукције концентрације укупних липида у ћелији (Duarte и сар., 2021).

Испитивање експресије гена и протеина који су укључени у процес биосинтезе масних киселина на молекуларном нивоу је од изузетне важности за разумевање значаја овог процеса код карцинома дојке. АТР-цитратна лиаза је цитозолни ензим који конвертује цитрат пореклом из митохондрија у ацетил-КоА, који је прекурсор за биосинтезу масних киселина и мевалоната чији је крајњи продукт холестерол (Zaidi и сар., 2012; Granchi, 2018). Прекомерна експресија ACLY-а је у позитивној корелацији са метастатским потенцијалом ћелија карцинома дојке, док његова инхибиција индукује цитотоксичност, апоптозу, модулацију параметра редокс статуса и блокира почетни корак у биосинтези масних киселина (Migita и сар., 2013; Fu и сар., 2020). Експресија ACLY-а на транскрипционом и протеинском нивоу је снижена након деловања Орлиста и Симвастатина у ћелијама карцинома дојке. Увидом у литературне податке, нема резултата о инхибицији ACLY-а на транскрипционом или протеинском нивоу на модел систему ћелија карцинома дојке након примене Орлистата. Потрага за стабилним ACLY инхибиторима још увек траје јер су сви тестирани агенси имали лоша биохемијска/фармаколошка својства или се нису адекватно везивали за активне домene ACLY-а што је ограничавало њихову клиничку примену. Тек током 2020. године FDA агенција је одобрила први и једни лек који је клинички инхибитор ACLY-а, а то је

бемпедоична киселина (Markham, 2020). Бемпедоична киселина инхибира синтезу холестерола и масних киселина директном инхибицијом ACLY-а што значи да има изражено хиполипидемијско дејство (Pinkosky и сар., 2013). Недавно објављена клиничка студија је показала да ова киселина доводи до редукције телесне тежине код гојазних пацијената са хиперхолестеролемијом и то управо инхибицијом ACLY-а (Banach и сар., 2020; Batchuluun и сар., 2022). Обзиром да Орлистат и бемпедоична киселина имају исти фармаколошки ефекат може се претпоставити да на исти начин блокирају експресију ACLY-а на транскрипционом и протеинском нивоу. Такође, не постоје литературни подаци о испитивању Симвастатина као потенцијалног ACLY инхибитора као ни о његовом механизму деловања на модел систему карцинома. Утишавање експресије ACLY-а на транскрипционом и протеинском нивоу помоћу Ловостатина инхибира активност PI3K-AKT сигналног пута при чему долази до смањења пролиферације ћелија A549 карцинома плућа, индукције апоптозе и оксидационог стреса (Hanai и сар., 2012). Обзиром на фармаколошка својства и антитуморски ефекат Орлистата и Симвастатина који је показан у оквиру ове студије, ови лекови имају веома велики потенцијал за даља клиничка тестирања са циљем да постану ACLY инхибитори.

Наредни корак у процесу биосинтезе масних киселина укључује ензимску реакцију карбоксилације ацетил-СоА у цитосолу да би се формирао малонил-СоА. Ова реакција је катализована ацетил-СоА карбоксилазом α (ACCA), која има регулаторну улогу приликом биосинтезе масних киселина и холестерола (Chajès и сар., 2006). Аберантна активација ACC α је повезана са повишеним индексом пролиферације карциномских ћелија, миграцијом и метаболичким дисбалансом (Wang и сар., 2022). Орлистат и Симвастатин су значајно инхибирали експресију ACC α у троструко негативним ћелијама карцинома дојке на транскрипционом и протеинском нивоу. Исти биолошки ефекат Орлистат је постигао на ECC-1 и KLE ћелијама ендометријалног карцинома (Wysham и сар., 2016) као и у H441 и H1975 ћелијама карцинома плућа (Sankaranarayananpillai и сар., 2013). Прегледом доступних научних публикација није пронађен ниједан податак о ефекту Симвастатина на експресију ACC α на транскрипционом и/или протеинском нивоу на модел системима карцинома. Инхибиција ACC α на транскрипционом нивоу у ћелијама карцинома дојке (MDA-MB-231, MCF-7 и HBL-100) помоћу siRNA блокирала је синтезу палмитинске киселине што је изазвало апоптозу, акумулацију ROS-а, оксидациони стрес и митохондријалну дисфункцију (Chajès и сар., 2006). Обзиром да Симвастатин постигао исти биолошки ефекат на тестираним ћелијама карцинома дојке, заслужује даља испитивања са аспекта потенцијалног инхибитора ACC-а.

Трећа и финална биохемијска реакција која се одвија приликом процеса биосинтезе масних киселина подразумева коришћење претходно синтетисаног малонил-СоА и ацетил-СоА уз помоћ синтетазе масних киселина FASN. Сукцесивним реакцијама катализације формира се палмитат као прва есенцијална масна киселина а даљим процесима елонгације и десатурације настају остале масне киселине (Svensson и сар., 2016). Најпознатији и највише проучаван FASN инхибитор на модел систему карцинома у *in vitro* условима је Орлистат. Орлистат је инхибирао експресију FASN-а на транскрипционом и протеинском нивоу у ћелијама карцинома дојке. Механизам антитуморског деловања Орлистата огледа се управо у инхибицији тиоестеразног домена FASN-а. Као резултат инхибиције овог домена блокира се биосинтеза масних киселина што последично зауставља пролиферацију и индукује апоптозу у карциномским ћелијама. Прва студија која је проучавала ефекат Орлистата на експресију FASN-а је показала да овај лек значајно инхибира протеинску експресију тестираног параметра у LNCaP, DU-145 и PC-3 ћелијама карцинома панкреаса. Поред овог

инхибиторског ефекта Орлистат је такође смањио вијабилност тестираних карциномских ћелија и индуковао апоптозу (Kridel и сар., 2004). Сличне студије су рађене на модел системима карцинома дојке (MDA-MB-435, MDA-MB-231, 747D, MCF-7), колона (Caco-2, SW480), меланома (B16-F10, C57BL6) и оваријума (OVCAR-3, SCOV3, CaOV-3), где је Орлистат постигао исти антитуморски ефекат инхибицијом FASN-а на транскрипционом и протеинском нивоу (Kridel и сар., 2004; Zhou и сар., 2007; Seguin и сар., 2012; Cervantes-Madrid и Duenas-Gonzalez, 2015; Schcolnik-Cabrera и сар., 2018). Од изузетног је значаја напоменути да су у свим овим студијама коришћене различити типови здравих контролних ћелија и да Орлистат није имао никакав биолошки ефекат на њих.

Ефекат Симвастатина на експресију FASN-а је такође праћен на транскрипционом и протеинском нивоу. Добијени резултати показују да је овај третман смањио активност FASN-а на тестираним троструко-негативним ћелијама карцинома дојке. Мало је литературних података који указују на ефекат Симвастатина на експресију FASN-а на модел систему ћелија карцинома у *in vitro* условима. Приказани резултати су у складу са студијом Karlic и сар., 2015 која доказује инхибиторни ефекат Симвастатина на експресију FASN-а у MDA-MB-231 ћелијама карцинома дојке, PC-3 ћелијама карцинома простате и MG-63 и U2-OS ћелијама остеосаркома.

***Ocimum minimum* у антитуморској терапији**

Током последње деценије употреба биљака које су познате у народној медицини је нашла примену и у антитуморској терапији. Многе врсте одобрених хемотерапеутских агенаса су управо биљног порекла и са различитим биохемијским и молекуларним механизмом антитуморског деловања (Greenwell и Rahman, 2015). У оквиру ове дисертације испитана је антитуморска активност лековите биљке *O. minimum*. Ова биљка се у традиционалној медицини користи за лечење различитих метаболичких стања, а између осталог и за редукцију телесне масе и хиперхолестолемије. Увидом у литературне податке до сада није праћена биолошка активност ове биљке у оквиру преклиничких испитивања антитуморског ефекта са аспекта модулације сигналних путева биосинтезе масних киселина и ангиогенезе у *in vitro* условима на модел систему ћелијских линија пореклом из карцинома.

На основу фитохемијске анализе метанолног екстракта цветова *O. minimum* идентификовано је присуство различитих класа фенола, флавоноида и танина са значајним биолошким ефектом. Појединачне фитохемикалије идентификоване HPLC анализом су гална киселина, протокатехуинска киселина, 3,5-дихиробензоева киселина, р-хидробензоева киселина, катехин, хлорогена киселина, кафеична киселина, сиригин, сиригинска киселина, р-кумаринска киселина, ферулинска киселина, рутин, кверцетин-3-о-глукопиранозид и кверцетин. Обзиром да је HPLC анализа показала да су цветови *O. minimum* веома богати различитим класама биолошки активних супстанци, није изненађујуће да је њихово синергистичко дејство довео до значајних антитуморских ефеката на тестираним ћелијама карцинома дојке.

Цитотоксични и проапоптотски ефекат *O. minimum*. Метанолни екстракт цветова *O. minimum* на ћелијама карцинома дојке изазива дозну и временски зависну цитотоксичност, док на здравим фибробластима нема значајну активност. Овакав резултат говори о селективном дејству тестираног екстракта. Водени екстракт листова врста рода *Ocimum* (*O. basilicum*, *O. gratissimum*) такође индукују значајну цитотоксичну активност на MCF-7 и MDA-MB-231 ћелијама карцинома дојке, док на здравој MCF10A ћелијској линији пореклом из дојке нису показали значајну редукцију вијабилности. Ови

результати јасно указују да тестирани екстракти нису токсични по здраве ћелије и имају значајан селективни ефекат (Torres и сар., 2018). Многобројне студије су доказале широк спектар фармаколошких својства кверцетина укључујући антиинфламаторно, кардиопротективно, антибактеријско, антифугално дејство, као и антипролиферативни ефекат на различитим модел системима карцинома. Кверцетин као један од најактивнијих биоактивних једињења је идентификован и у металном екстракту цветова *O. minimum*. Конкретно, кверцетин је у микромоларним концентрација инхибирао раст различитих врста ћелија карцинома у *in vitro* условима (карцином колона (CT-26); аденокарцином простате (LNCaP); акутна лимфобластна леукемија (MOLT-4); мијелом (U266B1), карцином оваријума (CHO) и дојке (MCF-7) (Hashemzaei и сар., 2017). Осетљивост ћелија карцинома на флавоноиде, од којих су најпознатији управо кверцетин и кверцетин-3-о-глукопиранозид, може бити различита у зависности од врсте испитиваних ћелија, што указује да би и цитотоксичност могла бити повезана са типом карцинома и хемијском структуром флавоноида. Чак и мање модификације у хемијској структури флавоноида могу бити одговорне за њихову различиту биолошку активност у овим ћелијама (Sak, 2014).

Механизам цитотоксичности *O. minimum* даље је испитан одређивањем типа ћелијске смрти. Метанолни екстракт цветова *O. minimum* индукује апоптозу као доминантан вид ћелијске смрти тестираних троструко-негативних ћелија карцинома дојке. Овај проапоптотски ефекат потврђује присуство рутина и кафеичне киселине као доминантних фенолних једињења у цветовима *O. minimum* која су највише проучавани са овог аспекта. Наиме, рутин индукује значајан проапоптотски ефекат у MDA-MB-231 и MCF-7 ћелијама карцинома дојке (Iriti и сар., 2017) као и у ћелијама карцинома колона (CT-26), аденокарцинома простате (LNCaP), акутне лимфобластне леукемије (MOLT-4) и у Raji ћелијама (Hashemzaei и сар., 2017).

Ефекат *O. minimum* на редокс хомеостазу. Третман са *O. minimum* значајно повећава концентрацију испитиваних врста ROS-а ($O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2) у ћелијама карцинома дојке изазивајући прооксидациони ефекат који је уједно и праћен индукцијом апоптозе. Литературни подаци показују да специфични флавоноиди могу да делују као јаки прооксиданси и да на тај начин индукују проапоптотски и цитотоксични ефекат на ћелије карцинома (Leung и сар., 2007). Кверцетин, као једињење присутно у екстракту ове биљке, најчешће испољава прооксидациони ефекат тако што повећава концентрацију ROS-а и ниво оксидационог стреса у ендоплазматичном ретикулуму индукујући значајан антипролиферативни и проапоптотски ефекат као и заустављајући ћелијски циклус у G2/M фази у PC-3, MCF-7 и LoVo ћелијама карцинома (Biswas и сар., 2022). Нарушавање редокс хомеостазе у ћелијама карцинома је уско повезано са оштећењима мембранских липида. MDA као параметар који прати степен оштећења мембранских липида је био повишен након примене *O. minimum* на ћелије карцинома дојке. Узимајући у обзир постигнуте биолошке ефекте тестиране биљке на параметре редокс статуса, може се закључити да је индукована цитотоксичност и проапоптотски ефекат постигнут преко ROS-зависног механизма.

Оксидативни стрес који настаје након деловања неког цитотоксичног агенса индукује и промене у хомеостазу глутатионског система. Код обе испитане ћелијске линије карцинома дојке третиране *O. minimum* запажа се повећан ниво GSH у односу на контролне вредности. Тренд раста GSH у овим ћелијама сугерише да фенолна једињења присутна у овој биљци могу повећати антиоксидативни капацитет и самим тим сачувати ендегену концентрацију GSH у ћелијама или ћелије могу да синтетишу *de novo* GSH као последицу повећане концентрације $O_2^{\cdot -}$ (Yoo и сар., 2019).

Биосинтеза масних киселина и *O. minimum*. За врсте из рода *Ocimum* је карактеристично да испољавају значајан хиполипидемијски ефекат који се заснива на редукцији телесне тежине првенствено код жена у менопаузи. Поред овог биолошког ефекта, врсте овог рода индукују и значајне антиинфламаторне, антиоксидантне и антигликемијске ефекте (Diab и сар., 2022). За врсте рода *Ocimum*, посебно за *O. basilicum* и *O. tenuiflorum*, постоје литературни подаци о хиполипидемијском ефекту у *in vivo* експериментима (Amrani и сар., 2006; Parasuraman и сар., 2015), док је овај биолошки ефекат код *O. minimum* неиспитан. Увидом у резултате ове студије, закључује се да је метанолни екстракт цветова *O. minimum* значајно смањио концентрацију укупних липида у тестираним ћелијама карцинома дојке у *in vitro* условима. Присуство одређених биоактивних супстанци у екстракту *O. minimum* као што су кверцетин, рутин и хлорогенична киселина могу бити одговорни за постигнут хиполипидемијски ефекат (Zeni и сар., 2017). Механизам деловања кверцетина и хлорогеничне киселине при коме постижу овај ефекат се огледа у снижавању концентрације укупног холестерола, триглицерида, и LDL-а у серуму (Li и сар., 2009; Jung и сар., 2013). Како холестерол представља основу градивну компоненту ћелијске мембране и одговоран је за одржавање њеног интегритета и хомеостазе, може се претпоставити да синергистичка активност биоактивних једињења која су идентификована у овој биљној врсти значајно утицала на смањење његове концентрације, и за настали хиполипидемијски ефекат у испитиваним ћелијама.

Хиполипидемијски ефекат *O. minimum* је даље испитан на молекуларном нивоу праћењем експресије циљаних гена и протеина који учествују у биосинтези масних киселина на истом модел систему. Првобитна истраживања која су се бавила испитивањем потенцијалних ACLY инхибитора заснивала су се на тестирању одређених лекова или хемијских супстанци на различитим модел системима карцинома. Прво природно биоактивно једињење које је испитивано са овог аспекта била је хидроксицитрична киселина која је уједно била и кандидат за нови лек у оквиру терапије гојазности (Watson и сар., 1969). Међутим, после више опсежних испитивања научници су дошли до закључка да једино високе концентрације хидроксицитричне киселине могу да инхибирају експресију ACLY-а јер ћелије слабо апсорбују ову киселину (Granchi и сар., 2018). Укратко, сви постојећи ACLY инхибитори су према механизму и успешности дејства подељени у две категорије: прва група инхибитора се карактерише по слабој апсорпцији тестираних супстанци од стране ћелија, док је друга група чинила супстанце које из различитих разлога нису још увек ушле у процес клиничких тестирања (Hatzivassiliou и сар., 2005; Li и сар., 2007; Wei и сар., 2019; Wang и сар., 2022). Тек се током 2022. године направио помак у тестирању ACLY инхибитора када су на ред дошли флавоноиди односно хербацетин, кверцетин, лутеолин, скутелареин и мирицетин који су инхибирали активност ACLY-а у распону од 88.28% до 96.07% (Wang и сар., 2022). Обзиром да је кверцетин идентификован у цветовима *O. minimum* може се претпоставити да је он задужен за инхибицију ACLY-а на транскрипционом и протеинском нивоу. Увидом у литературне податке ово је друга студија која се бавила испитивањем инхибиторног ефекта ACLY-а. Биоактивна једињења идентификована у цветовима *O. minimum* карактеришу се веома великом структурном разноврсношћу као и значајним фармаколошким и биолошким ефектима са посебним акцентом на инхибиторну активност ACLY-а на тестираном модел систему и заслужује даља испитивања са овог аспекта примене.

Такође, и у случају испитивања инхибиторне активности ACC-а на модел систему ћелија карцинома, посредством природних инхибитора веома је мало литературних података. Први природни инхибитор ACC-а је био Сорафен А који води порекло од бактерије *Sorangium cellulosum* и сузбија пролиферацију ћелија карцинома простате и

дојке (LnCap, PC-3M, MCF-7) (Shen и сар., 2004; Beckers и сар., 2007; Corominas-Faja и сар., 2014). Механизам деловања Сорафена А се заснива на директом блокирању биосинтезе масних киселина и стимулсању њихове оксидације, где као резултат ниво фосфолипида у ћелијама опада, ћелије карцинома престају да пролиферишу и улазе у апоптозу или аутофагију (Beckers и сар., 2007). Резултати у оквиру ове студије су у складу са истраживањем Gnoni и сар., 2022., који су потврдили да кверцетин, као активна компонентна присутна и у *O. minimum*, инхибира ензимску активност АСС-а у HepG2 ћелијама јетре што узрочно доводи до блокаде синтезе масних киселина и триглицерида у овим ћелијама. Међутим, тачан молекуларни механизам деловања кверцетина на активност АСС-а модулацијом различитих сигналних молекула је још увек непознат.

Први познати инхибитор FASN-а на модел системима карцинома је био церулеин, међутим значајно је утицао на метаболизам здравих ћелија (Flavin и сар., 2010). Помак у истраживању је направљен када су на ред за испитивање дошле биљке и њихове појединачне биоактивне компоненте које се у медицини користе за редукцију телесне тежине и снижавање холестерола. Механизам деловања појединачних биолошки активних супстанци на активност FASN-а се заправо заснива на способности инхибиције његових активних домена (Pulla и Begum-Ahil, 2021). Увидом у податке у оквиру ове студије закључује се да *O. minimum* индукује значајно снижење експресије FASN-а на генском и протеинском нивоу у тестираним ћелијама. Полифенолна једињења индукују значајан инхибиторни ефекат FASN-а који уједно блокира пролиферацију ћелија карцинома, при чему је за овај биолошки ефекат задужена и специфична хемијска структура ових једињења (присуство хидроксилне групе у ароматичним прстеновима једињења утиче на инхибиторни ефекат биоактивних компоненти). Различите класе катехина, које су идентификоване HPLC анализом у екстрактку *O. minimum*, индукују значајну инхибицију FASN-а модулацијом активности домена β -кетоацил синтазе, β -кетоацил редуктазе и домена тиоестеразе смањујући ризик за настанак карцинома за чак 30-40%. Конкретно, епигалокатехин-3-галат инхибира дејство FASN-а делујући на домен β -кетоацил синтазе, последично заустављајући ћелијски циклус у G0/G1 фази (Nisthul и сар., 2018; Amrutha и сар., 2019). Кверцетин инхибира активност MAT домена FASN-а и на тај начин контролише пролиферацију MIAPaCa-2 ћелија карцинома простате (Harris и сар., 2012). Танини, који су присутни у цветовима *O. minimum*, ступају у неспецифичне интеракције са протеинима и на тај начин могу да утичу на метаболизам и ефикасност биоактивних супстанци. Управо због ове особине се уклањају из биљног екстракта који има потенцијално антитуморско дејство. Међутим, литературни подаци указују да су хидролизујући танини (танинска и елагинска киселина) значајни FASN инхибитори, при чему при чему овај ефекат постижу сличним механизмом деловања као епигалокатехин, односно инактивацијом MAT и β -кетоацил редуктазе FASN-а домена (Li и сар., 2002).

Ангиогенеза и *O. minimum*. Иницијација ангиогенезе је директно повезана са повишеном експресијом проангиогеног фактора VEGF-а и HIF-1 α као његовог регулатора који су одговорни за агресивни потенцијал карцинома (Madu и сар., 2020). Резултати у оквиру ове студије су показали да је метанолни екстракт цветова *O. minimum* значајно инхибирао експресију VEGF-А и HIF-1 α на транскрипционом и протеинском нивоу у ћелијама карцинома дојке. Тестирањем различитих класа флавоноида у *in vitro* условима, доказано је да кверцетин инхибира експресију VEGF-а на транскрипционом и протеинском нивоу у OVCAR-3 ћелијама карцинома оваријума (Luo и сар., 2008). Такође још једна *in vitro* студија на модел систему ћелијских линија карцинома простате је доказала да је кверцетин инхибирао експресију VEGF-а преко фосфорилације VEGFR-2 и регулације AKT/mTOR/P70S6K сигналног пута. Док је *in vivo* студија на ксенографтним мишијим моделима са карциномом простате показала је да мале дозе

кверцетина инхибирају пролиферацију, миграцију, инвазију и формирање ендотелне цеви током ангиогене фазе (Pratheeshkumar и сар., 2012).

Металопротеиназе се могу лучити и из ендотелних ћелија које су активирание VEGF-ом. Након ове активације ендотелне ћелије мигрирају и формирају нову васкуларну мрежу (Cabral-Pacheco и сар., 2020). Значајно снижење експресије MMP-9 након деловања *O. minimum* је детектовано на транскрипционом и протеинском нивоу на тестираним ћелијама карцинома дојке. Кверцетин, као доминатно биоактивно једињење у цветовима *O. minimum*, индукује антимигрантни и антиангиогени ефекат снижавањем протеинске експресије MMP-2 и MMP-9 на модел систему U251 ћелија глиобластома и SAS ћелија оралног карцинома (Lai и сар., 2013; Liu и сар., 2017). Елагинска киселина, такође присутна у екстракту *O. minimum*, је позната по томе што супримира раст PANC-1, AsPC-1 и MIA PaCA-2 ћелија карцинома панкреаса, KLE и AN3CA ћелија карцинома ендометријума инхибирајући протеинску експресију MMP-2 и MMP-9 са једне стране а стимулишући проапоптотски одговор са друге стране (Wang и сар., 2019; Kim и сар., 2021).

Хемокини CXCL12/CXCR4 заједно са VEGF-ом доприносе развоју васкуларног система на месту настанка инфламације и учествују у снабдевању карцинома есенцијалним нутријентима, али и стимулишу миграцију ћелија преко активирања различитих класа MMP (Shi и сар., 2020). Резултати ове студије су показали да биоактивне супстанце пореклом из *O. minimum* синергистички делују и значајно снижавају експресију CXCL12/CXCR4 параметара. Кверцетин-3-О-глукуронид, кверцетин, апигенин, лутеолин, ороксилан А и силимарин инхибирају активност CXCR4 и на тај начин постижу антитуморски и антиангиогени ефекат на различитим модел системима карцинома (Zhou и сар., 2018), што је у складу са приказаним резултатима у оквиру овог истраживања.

Прогностички и дијагностички значај параметра биосинтезе масних киселина у ткиву карцинома дојке

Други ниво истраживања у оквиру ове докторске дисертације заснива се на праћењу експресије кључних параметара процеса биосинтезе масних киселина на транскрипционом и протеинском нивоу на модел систему ткива карцинома дојке. Уобичајени биомаркери за детерминацију карцинома дојке углавном се ослањају на статус хормонских рецептора и укључују праћење експресије рецептора за естроген, прогестерон и хумани епидермални фактор раста на транскрипционом или протеинском нивоу. Статус ових молекула у ствари поставља референтну вредност за одређивање степена малигнитета и адекватног терапијског третмана (Gamble и сар., 2021). Међутим, као и код свих туморских маркера постоје одређена ограничења за њихово коришћење. Управо из ових разлога све је више студија које се баве испитивањем нових биомаркера који ће се користити у комбинацији са стандардним за прецизније одређивање дијагнозе и терапије за сваког пацијента посебно.

Експресија *ACLY*-а на транскрипционом нивоу

У оквиру ове докторске дисертације најпре је праћена је генска експресија *ACLY*-а, цитоплазматског хомотетрамерног ензима, који повезује гликолитички и липидни метаболизам (Granchi, 2018). У односу на своју улогу у ћелијској комуникацији која се огледа у процесу модулације пролиферације, миграције и инвазије карциномских ћелија, *ACLY* има функцију онкогена (Chen и сар., 2020). Све је већи број литературних података који се односе на дијагностички и прогностички значај овог гена код карцинома дојке.

Представљено истраживање је спроведено на укупно 30 пацијената код којих је дијагностикован дуктални или лобуларни карцином дојке. У односу на клиничко-патолошке карактеристике карцинома, најпре је представљена дистрибуција релативне експресије иРНК *ACLY* гена код оба типа дијагностикованог карцинома, при чему је експресија тестираног гена виша код пацијената средњих година са инвазивним дукталним типом. Чак 27 пацијената који су испитивани у овој студији имали су дијагностикован управо дуктални тип карцинома дојке. Овај тип карцинома дојке је најчешћи дијагностикован тип тумора са чак 60-80% новооткривених случајева, док лобуларни представља око 15% (Williams и сар., 2019). Инвазивни дуктални тип карцинома дојке најчешће се карактерише губитком хормонских рецептора, смањеном експресијом Е-кадхерина, и вишом експресијом Ki-67 биомаркера код пацијената у средњем животном добу. С обзиром на њихову хетерогеност и велики број подтипова, ови карциноми су окарактерисани као инвазивни и метастатски (Du и сар., 2018). Приложени резултати истраживања су у складу са Chen и сар., 2020 где се наводи да је *ACLY* прекомерно повишен код пацијената са истом дијагнозом, али и да се овај параметар може користити као независни биомаркер за предвиђање рецидива болести.

Статус ER и PR рецептора и HER2 представља кључни дијагностички биомаркер код пацијената оболелих од карцинома дојке. Према статистичким подацима, хормон зависни карциноми дојке боље реагују на ординирајућу терапију па је самим тим проценат излечења ових пацијената већи. Карциноми који немају експримиране хормонске рецепторе су агресивног фенотипа дају свеукупно тежу клиничку слику пацијента са честом појавом резистенције на прописану терапију (Bagaria и сар., 2014; Shiino и сар., 2022; Lashen и сар., 2023). Уколико се упореди ниво релативне експресије иРНК *ACLY* гена у односу на статус хормонских рецептора само између узорака ткива карцинома, запажа се да је код ER⁻/PR⁻ подтипа генска експресија виша у поређењу са ER⁺/PR⁺. Међутим, када се упореди ниво релативне експресије иРНК *ACLY* гена између узорака ткива карцинома и микроокружења, код ER⁻/PR⁻ подтипа виша је експресија у узорцима ткива карцинома у односу на узорке из микроокружења, док је код ER⁺/PR⁺ подтипа резултат обрнут. Обзиром да је статус ER/PR рецептора један од показатеља агресивности карцинома дојке, а истовремено је доказано да је прекомерна експресија *ACLY*-а такође у корелацији са агресивношћу и метастатским потенцијалом ћелија карцинома дојке (Hatzivassiliou и сар., 2005; Migita и сар., 2013), добијени резултат предстаља добру полазу тачку за даља истраживања са циљем примене овог гена као тумор маркера. У студији Chen и сар., 2020 показано је да је повишена експресија *ACLY* у директној корелацији са ER⁺/PR⁺ карциномима што је супротан резултат од представљеног у оквиру ове дисертације. Дакле, може се закључити да је неопходно даље испитивање механизма регулације између *ACLY* гена и ER/PR⁻ подтипа карцинома дојке. Код HER2⁺ карцинома експресија иРНК *ACLY* гена је виша у узорцима ткива карцинома у односу на микроокружење, док је код HER2⁻ узорака резултат обрнут. Добијени резултат је у складу са литературним наводима који показују да је *ACLY* прекомерно експримиран код HER2⁺ подтипа карцинома дојке (Monaco, 2017).

У односу на TNM класификацију и хистолошки градус промене у нивоу релативне експресије иРНК *ACLY* гена су евидентне у оба типа тестираних узорак. Увидом у добијене податке који се односе на степен захваћености лимфних нодуса, посебно се истиче да је релативна експресија иРНК *ACLY* гена је повишена у узорцима ткива карцинома пацијената који су имали метастазе присутне у 4-9 лимфних чворова, док је код пацијената са захваћеним 1-3 лимфна чвора повишена експресија тестираног гена у узорцима ткива из микроокружења. Резултати овог истраживања су у складу са студијама где је показано да је повишена експресија *ACLY*-а у вези са степеном захваћености лимфних нодуса код пацијената са карциномом дојке у односу на контролне групе (Wang и сар., 2017; Chen и сар., 2020).

Код пацијената код којих су детектовани секундарни метастатски депозити релативна експресија иРНК *ACLY* гена је 4.43 пута виша у узорцима ткива из микроокружења. Такође, ако се посматра релативна експресија иРНК *ACLY* гена односу на величину карцинома, долази се до закључка да се са порастом карцинома повећава експресија тестираног гена у узорцима ткива из микроокружења. На основу доступних литературних података, ово је прва студија код које је праћена релативна експресија *ACLY* гена у узорцима микроокружења карцинома. Ћелије карцинома у микроокружењу трпе бројне промене на енергетском и метаболичком нивоу да би се прилагодили смањеној количини хранљивих материја и кисеоника. Микроокружење карцинома је хетерогена средина са бројним ендотелним, масним, имуним, инфламаторним, мијелоидним супресорским ћелијама као и фибробластима, адипоцитима, неутрофилима и тумор-асоцираним макрофагама (Yu и сар., 2021). Овај тип макрофага продукује ензиме који разлажу базалну мембрану, као и факторе раста који делују пролиферативно на туморске ћелије; секретују хемокине који привлаче хематопоеетске ћелије чиме свеукупно доприносе расту и ширењу карцинома (Baghban и сар., 2020). У микроокружењу где владају специфични хипоксични услови потреба за енергијом која долази из митохондрија је велика. Управо је *ACLY* есенцијални ензим који обезбеђује ацетил коензим који је неопходан за биосинтезу масних киселина и холестерола па самим тим и обезбеђује неопходну енергију за прогресију карцинома (Zaidi и сар., 2010; Rohrig и Schulze, 2016). Обзиром да се *ACLY* у литератури описује као онкоген, може се предпоставити да његова појачана активност у микроокружењу карцинома дојке значајно доприноси метастатском потенцијалу и прогресији ове болести.

Релативна експресија иРНК *ACLY* гена се повећава са порастом градуса у узорцима ткива карцинома док у узорцима микроокружења опада. Слабо диференцирани карциноми су представљени градусом III, кога карактеришу појединачне ћелије неправилног облика, са неправилном дистрибуцијом хроматина и истакнутим једарцима. Овај тип ћелија карцинома има особину да се шири у околно ткиво и лимфне чворове (Rakha и сар., 2010). Повишена експресија *ACLY*-а је карактеристична код пацијената са слабо диференцираним карциномима (грабус III) (Adorno-Cruz и сар., 2021), што је у складу са представљеним резултатима овог истраживања. Такође, иста студија истиче значај *ACLY*-а као потенцијалног биомаркера метастатског карцинома дојке.

На основу приказаних резултата праћења експресије иРНК *ACLY* гена, може се закључити да је овај параметар повишен како у узорцима ткива карцинома тако и у узорцима микроокружења код испитиваних пацијената. У литератури постоји много радова који потврђују да је релативна експресија иРНК *ACLY* гена прекомерно експримирана у узорцима ткива карцинома дојке, али не постоји податак да је праћена експресија овог параметра у ткиву из микроокружења карцинома. Сходно наведеном, неопходна је и детаљна анализа ткива из микроокружења карцинома јер су промене на молекуларном нивоу код овог типа узорка веома значајне приликом прогресије карцинома дојке.

Експресија FASN-а на транскрипционом и протеинском нивоу

Синтаза масних киселина (FASN) је главни ензим одговоран за *de novo* синтезу масних киселина кроз кондензацију малонил-СоА и ацетил-СоА и формирање палмитата (Costello и Franklin, 2005). Због високе концентрације масних киселина у исхрани, *de novo* синтеза и активност FASN-а су ниске у већини ткива осим у јетри, масном ткиву и млечним жлездама у лактацији. С друге стране бројне имунохистохемијске студије су показале да је FASN прекомерно експримиран код многих карцинома епителног порекла укључујући карцином дојке, колона, желуца, плућа и простате. FASN је идентификован и проучаван као тумор антиген ОА-519 код карцинома дојке (Menendez и Lupu, 2007; Fhu и Ali, 2020).

У овој студији праћена је генска и протеинска експресија FASN-а на узорцима карцинома дојке и микроокружења. На основу приказаних резултата повишена је експресија FASN-а на транскрипционом и протеинском нивоу у узорцима ткива карцинома у односу на узорке из микроокружења без обзира на класификационе параметре.

У зависности од типа карцинома дојке, запажа се да је експресија FASN-а на транскрипционом и протеинском нивоу виша у узорцима дукатлног инвазивног карцинома у поређењу са лобуларним. Повећање експресије FASN-а је у позитивној корелацији са инвазијом, метастазирањем и избегавањем апоптозе код узнапредовалих стадијума карцинома који су подложни рецидивима (Xu и сар., 2021; Chaturvedi и сар., 2023). Прекомерна експресија FASN-а карактеристична управо за инвазивни дуктални карцином дојке, величине преко два центиметра који је метастазирао у лимфне чворове (Chen и сар., 2017). На протеинском нивоу постоји јасна разлика у експресији FASN-а у односу на величину тумора код узорака ткива карцинома у односу на узорке из микроокружења. Увидом у студију Liu и сар., 2023, потврђено је да је прекомерна експресија FASN-а у корелацији са повећањем величине тумора код пацијената са карциномом дојке. Односно, што је карцином већи, виша је и експресија FASN-а. Још једна студија потврђује да постоји значајна корелација између експресије FASN-а и величине карцинома, што указује да FASN има важну улогу приликом раста тумора. Ова хипотеза је поткрепљена чињеницом да инхибиција FASN-а може проузроковати заустављање ћелијског циклуса, индукцију апоптозе и смањење величине карцинома (Pizer и сар., 1996; Bandyopadhyay и сар., 2006; Shi и сар., 2022; Liu и сар., 2023). Истовремено, повишена експресија FASN-а је евидента код испитиваних пацијената који су имали присутне метастазе у 1-3 лимфна нодуса као и удаљене метастазе, при чему ове резултате потврђује и истраживање Jiang и сар., 2021. Изнети резултати су такође у складу са наводима Xu и сар., 2021 који потврђују да повишена експресија FASN-а иницира метастазирање ћелија карцинома дојке у лимфне нодусе и на тај начин долази до значајних промена у енергетском метаболизму ових ћелија. Недавна студија је показала да је FASN значајно експримиран код пацијената који су имали удаљене метастазе на мозгу, јер недостатак екстрацелуларних масних киселина повећава потражњу за њиховом *de novo* синтезом и на тај начин стимулише експресију FASN-а (Ferraro и сар., 2021). Занимљиво је да је поред FASN-а и експресија осталих гена који су укључени у процес синтезе масних киселина повишена у карциномским ћелијама. Ови наводу указују да је регулација нивоа FASN-а у карциномским ћелијама заправо неопходна за прилагођавање и преживљавање ових ћелија у специфичним хипоксичним условима (Liu и сар., 2023). У прилог овој дискусији иду и резултати који се односе на класификацију карцинома дојке према градусу. Одређивње хистолошког профила одн. градуса инвазивног карцинома дојке има значајну прогностичку вредност (Van Dooijeweert и сар., 2022). Наиме, повишена је експресија FASN-а у узорцима ткива

карцинома дојке у поређењу са узорцима из микроокружења без обзира на тип градуса. Неколико истраживања јасно наводе да је повишена експресија FASN-a је уско повезана са типом градуса карцинома (Epstein и сар., 1995; Jiang и сар., 2021), што је у складу са приказаним резултатима.

У односу на статус хормонских рецептора и HER2 повишена је експресија FASN-a на генском и протеинском нивоу у узорцима карцинома у односу на узорке ткива из микроокружења. Ако се упореди ниво експресије FASN-a, запажа се да је код пацијената са ER⁺/PR⁺ подтипом виша у односу на пацијенте са ER⁻/PR⁻ подтипом карцинома дојке. Иако прецизан механизам који објашњава прекомерну експресију FASN-a код карцинома није у потпуности разјашњен, познато је да естрадиол, прогестерон и андрогени могу регулисати експресију овог параметра у хормон зависним карциномима. Наиме, ови хормони стимулишу раст ћелија и експресију FASN-a у хормон зависним ћелијама карцинома дојке (Joyeux и сар., 1989; Chalbos и сар., 1992; Kalkhoven и сар., 1994). Студија Menendez и Lupu, 2017 прва даје нова сазнања о могућој регулаторној вези између FASN-a и естрогена. Закључак ове студије је да FASN регулише сигналну мрежу ERα преко модулације MAPK/ERα и АКТ/Erα сигналних путева у ћелијама карцинома дојке. Увидом у литературу експресија FASN-a је највиша код HER2⁺ карцинома дојке, а најнижа код троструко-негативних типова карцинома (Liu и сар., 2023). Ови наводи су у складу са приказаним резултатима када се упореди ниво релативне експресије иРНК FASN гена у односу на статус хормонских рецептора у узорцима ткива карцинома дојке. Преживљавање ћелија карцинома а посебно оних са позитивним HER2 статусом у великој мери зависи од метаболизма липида (Kourtidis и сар., 2009). Прекомерна експресија HER2 повећава транслацију FASN-a, а прекомерно експримиран FASN значајно утиче на регулацију EGFR и HER2, што за крајњи циљ има стимулацију раста карциномских ћелија (Vazquez-Martin и сар., 2008). Дакле, прекомерно експримиран HER2 активира FASN директним деловањем на његов промотор преко PI3K-сигналног пута и утиче на његову транскрипцију, транслацију и фосфорилацију (Menendez, 2010).

На основу свих приказаних резултата може се закључити да се експресија FASN-a на транскрипционом и протеинском нивоу генерално повећава са порастом величине тумора, бројем захваћених лимфних нодуса, појавом метастаза и степеном диференцираности тумора. FASN може да се користи као потенцијалан биомаркер код пацијената са дијагнозом карцинома дојке, па је стога неопходно његово даље испитивање са аспекта потенцијалне примене у клиничкој пракси.

Унапређење TNM класификационог модела карцинома дојке савременим методама машинског учења

Потреба за јединственим и међународно прихваћеним системом класификације карцинома је препозната у првој половини 20. века што је резултирало објављивањем прве класификационе студије 1950. године од стране Међународне уније против карцинома (енгл. *International Union Against Cancer – UICC*) (Denoix и Schwartz, 1959). Након ове студије уследиле су и прве објаве о класификационом моделу на женским типовима карцинома од стране Међународне федерације за гинекологију и акушерство (енгл. *International Federation of Gynecology and Obstetrics – FIGO*), као и класификациони систем Америчког комитета за канцер (енгл. *American Joint Committee for Cancer – AJCC*), 1977. године (Greene и сар., 2002; Odicino и сар., 2008). Ови класификациони модели се заснивају на анатомским, клиничким и патолошким подацима који омогућавају дефинисање стадијума болести а такође дају одређене смернице за даље лечење и прогнозу. Најпознатији класификациони систем је TNM модел и узима у обзир

величину примарног тумора, статус регионалних лимфних чворова и присуство удаљених метастаза. Овај модел класификације је деценијама златни стандард за постављање дијагнозе и одређивање терапије код пацијената оболелих од карцинома (Cadiz и сар., 2018).

Осмо допуњено издање AJCC које се тиче TNM класификационог модела карцинома дојке представља концептуално и радикално одступање од претходних издања јер укључује и тестирање молекуларних биомаркера. Употреба овако дефинисаних биомаркера резултирала је модификацијом TNM класификационог модела. Ови биомаркери подразумевају праћење експресије рецептора за естроген, прогестерон и HER2, као и одређивање градуса, већ су у употреби са циљем дефинисања дијагнозе и одређивања адекватне терапије за пацијента са карциномом дојке. Сви ови биомаркери су клинички препознатљиви и добро проучени у проспективним контролисаним испитивањима и пружају довољно прогностичких информација које оправдавају њихову инкорпорацију у TNM класификациони модел. Овај унапређени класификациони модел је примењен у дијагностици свих пацијената широм света пре апликовања било ког вида системске терапије. На овај начин је омогућено разумевање биолошке хетерогености карцинома дојке (Giuliano и сар., 2018).

И поред овако дефинисаног TNM класификационог модела, све је већи број истраживања која се баве анализирањем различитих панела гена и протеина који су аберантно експримирани код карцинома, а имају потенцијал да постану адекватни тумор маркери. Обзиром да је карцином дојке други водећи узрок морбидитета међу женама и да се дијагностикује у унапредовалим стадијумима болести битно је да нов биомаркер има прогностички и терапеутски значај за развој персонализованог лечења код пацијената са карциномом дојке (Banin Hirata и сар., 2014).

Да би се испитао потенцијални значај молекуларног биомаркера FASN-а у циљу унапређења традиционалног TNM класификационог модела, анализирана је протеинска експресија овог параметра савременим методама машинског учења. Као модел систем коришћени су узорци ткива карцинома дојке и узорци ткива из микроокружења карцинома. Употреба алгоритама машинског учења и биоинформатичка обрада података омогућавају истраживачима да у потпуности искористе све клиничко-патолошке и лабораторијске резултате приликом испитивања тумор маркера од интереса. Данас су развијене различите методе машинског учења са различитим опсегом прецизности тако да избор одговарајуће методологије може резултирати потпунијом и тачнијом анализом података. Управо из овог разлога је потребно тестирати више различитих алгоритама машинског учења на одређеном сету података (Kouyou и сар., 2021). Конкретно, у оквиру ове студије праћено је пет различитих алгоритама машинског учења при чему су дискутовани критеријуми тачности, сензитивности, прецизности и ROC/AUC вредности. Резултати протеинске експресија FASN-а у комбинацији са клиничко-патолошким карактеристикама (величина тумора, присуство метастаза, захваћеност лимфних нодуса) пацијената чинили су сет података за обрађивање савременим методама надгледаног машинског учења. Увидом у доступне литературне податке ово је прва студија која је користила овако креиран сет података за тестирање различитих алгоритама машинског учења са циљем побољшања традиционалног TNM класификационог модела на модел систему карцинома дојке.

Како је наведено у саопштењу Америчког колеџа патолога (енгл. *College of American Pathologists Consensus Statement*) из 1999. године, величина тумора је један од најважнијих предиктор карцинома дојке (Fitzgibbons и сар., 2000). Овај параметар чини основу свих описаних класификационих модела са изразитом важношћу првенствено за лекаре приликом постављања дијагнозе и одређивања терапије и наводи се у сваком клиничком извештају (Verschraegen и сар., 2005). Величина тумора се најпрецизније

одређује приликом патолошког прегледа узорка, док су радиолошке и клиничке процене често мање прецизне (Wu и Sahin, 2016). Код пацијената са карциномом дојке величина карцинома је у корелацији са степеном захваћених лимфних нодуса и повећаним ризиком за настанак метастатског облика карцинома (Sopik и Narod, 2018). Увидом у различите студије, откривено је да постоји значајна корелација између нивоа експресије FASN-а и величине карцинома, што директно значи да FASN има значајну улогу приликом раста карцинома. Ова хипотеза је поткрепљена чињеницом да инхибиција FASN-а може индуковати заустављање ћелијског циклуса, апоптозу и последично смањење величине тумора (Bandyopadhyay и сар., 2006; Zhang и сар., 2020; Xu и сар., 2021; Shi и сар., 2022) што је у складу са приказаним резултатима на транскрипционом и транслационом нивоу у оквиру ове студије. Имајући у виду значај испитивања повезаности експресије FASN-а као потенцијалног биомаркера са величином тумора са циљем унапређења TNM класификационог модела, дефинисани сет података је тестиран применом различитих алгоритама надгледаног машинског учења. Алгоритам Стабло одлучивања је најбоље рангиран за обрађени сет података на узорцима ткива карцинома, док је алгоритам Случајна шума најбоље рангиран на обрађеним подацима за узорке ткива из микроокружења. Увидом у добијене резултате постоји значајна повезаност између протеинске експресије FASN-а и величине карцинома дојке. Синтетаза масних киселина као потенцијални биомаркер може значајно допринети побољшању TNM класификационог модела при чему је неопходно наставити истраживања на већем броју узорака ткива карцинома дојке и микроокружења са циљем валидације овог биомаркера у клиничке сврхе. Обзиром да се протеинска експресија FASN-а повећава са величином испитаних узорака карцинома дојке, добијени резултат применом методе машинског учења има потенцијал за примену у клиничке сврхе. Међутим, да би FASN био валидиран са овог аспекта неопходно је поновити истраживање на великом репрезентативном броју узорака карцинома дојке при чему би требало да буду обухваћени сви стадијуми Т (T1 – T4) класификационог параметра који описује величину карцинома дојке.

Идентификација туморских ћелија у лимфним чворовима је постала стандардна процедура приликом хируршке ресекције и представља један од најрелевантнијих показатеља напредовања болести (Harris и сар., 2014). Статус лимфних нодуса (N) је у корелацији са величином тумора, односно што је тумор већи, већа је и вероватноћа да се проширио на лимфне нодусе, при чему ова чињеница указује да је болест у прогресији. Познато је да пацијенти са карциномом дојке старије животне доби имају већу вероватноћу да развију метастатске депозите у лимфним нодусима (Allison, 2020). Када је у студијама других аутора анализирана повезаност експресије FASN-а са клиничко-патолошким карактеристикама пацијената са карциномом дојке, дошло се до закључка да је висока експресија овог параметра у корелацији са степеном захваћености лимфних нодуса (Harris и сар., 2014; Jiang и сар., 2021). Имајући у виду значај праћења промена у лимфним нодусима код ових пацијената веома је битно побољшати постојеће моделе класификације увођењем нових молекуларних биомаркера. Број захваћених лимфних нодуса је у директној корелацији са напредовањем болести. На основу изнетих резултата тестирања повезаности протеинске експресије FASN-а у узорцима карциномског ткива и узорцима из микроокружења, алгоритам Стабло одлучивања је постигао најбоље резултате и дефинише се као одличан класификатор. Протеинска експресија FASN-а је повећана у узорцима ткива карцинома дојке у N1 и N2 стадијуму у односу на N0 стадијум. Са клиничког аспекта овај податак је веома битан јер директним праћењем резултата протеинске експресије FASN-а може закључити да постоји прогресивна промена примарно дијагностикованог карцинома дојке.

Свеобухватно, протеинска експресија FASN-а, може допринети побољшању TNM класификационог модела карцинома дојке са посебним освртом на прецизно одређивање

броја захваћених лимфних нодуса. Као и у случају предходно добијених резултата, неопходно је поновити истраживање на репрезентативном броју узорака карцинома дојке, при чему би у нову студију били укључени сви стадијуми предходно дефинисане N класификације (N0 – N4).

Трећи параметар који чини саставни део TNM класификационог модела даје информације о присуству метастатских депозита изван регионалних лимфних нодуса (M) (Rosen и Sapra, 2023). Детекција метастатских промена код пацијената оболелих од карцинома дојке представља велики изазов за прецизно постављање дијагнозе, праћење стања пацијента и одабир терапијског протокола. Метастазе се најчешће детектују употребом најсавременијих радиолошких техника као што су магнетна резонанца, мултислајсни СТ скенер, рендген и ПЕТ скенер (Pesapane и сар., 2020), док су најпознатији тумор маркери који се користе у клиничкој пракси за исту сврху CA-15-3, CA 27.29 и CEA (Botlagunta и сар., 2023). Највећа стопа морбидитета међу пацијентима са дијагнозом карцинома дојке произилази због метастатског ширења карцинома што је најзначајнији показатељ прогресије болести. Из овог разлога се врши интензивно преклиничко тестирање различитих типова тумор маркера са једним заједничким циљем, а то је рана детекција метастатских промена у различитим регијама тела код ових пацијената (Bell и сар., 2017). Прекомерна експресија FASN-а може да доведе до настанка метастатских промена код пацијената са карциномом дојке, јер промене у његовој метаболичкој активности стимулишу активацију сигналних путева који регулишу пролиферацију и миграцију (Xu и сар., 2021). Добијени резултати испитивања повезаности протеинске FASN-а са присуством удаљених метастаза код пацијената са карциномом дојке, су показали да је алгоритам Случајна шума најбољи класификатор дефинисаног скупа података у узорцима ткива карцинома дојке и узорцима из микроокружења, при чему се дефинише као фер. Резултати у оквиру ове студије показали да је протеинска експресија FASN-а статистички значајно повишена код узорака метастатског карцинома дојке. Додатно, након статистичке обраде података методама машинског учења закључује се да постоји повезаност између ова два параметра. За унапређење параметра M у оквиру TNM класификационог модела такође је неопходно поновити истраживање на већем броју узорака метастатског карцинома дојке, и поново испитати повезаност овог биомаркера са удаљеним метастазама применом савремених алгоритама машинског учења.

Инкорпорирање нових биомаркера у већ постојећи широко коришћени систем класификације резултира модификацијом TNM класификационог модела. Све модификације морају бити у складу са већ представљеним и широко коришћеним традиционалним моделом узимајући у обзир све информације о карциному добијене од стране хирурга, патолога, онколога, радиолога и молекуларног биолога (Cadiz и сар., 2018). Протеинска експресија FASN-а не сумњиво унапређује TNM класификациони модел карцинома дојке. Али да би FASN постао клинички значајан биомаркер, и да би се размотрила могућност његове инкорпорације у TNM класификациони модел, неопходно је наставити истраживања на релевантном броју узорака карцинома дојке. Имајући у виду да је карцином дојке хетерогена болест, неопходно је одредити протеинску експресију овог параметра у свим подтипovima овог карцинома и даље анализирати добијене резултате савременим методама машинског учења. И на самом крају, на основу свих приказаних резултата овог истраживања, може се закључити да је прогностички и дијагностички потенцијал FASN-а као биомаркера веома значајан у борби са карциномом дојке.

VI ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата за преклиничко тестирање одабраних третмана са аспекта антитуморског ефекта, у *in vitro* условима на ћелијским линијама карцинома дојке, изведени су следећи закључци:

- Орлистат, Симвастатин и *O. minimum* индукују значајну цитоотоксичност и последично проапототски ефекат на тестираним ћелијама карцинома дојке. Ћелијска линија карцинома дојке MDA-MB-468 је осетљивија на дејство свих третмана у односу на MDA-MB-231 која је пореклом из истог органа. Најбољу цитотоксичност постигао је третман са Симвастатином, при чему су сви испитивани третмани најмање цитотоксични на здравим MRC-5 ћелијама, што указује на селективност у њиховом деловању. Са друге стране имајући у виду да је апоптоза жељени тип ћелијске смрти ово је повољан резултат за потенцијалну примену тестираних третмана у антитуморској терапији.
- Орлистат, Симвастатин и *O. minimum* индукују значајан прооксидативни ефекат у тестираним ћелијама карцинома дојке. Глутатион као антиоксидативни параметар је био значајно повишен након примене ових третмана на истом модел систему. Дисбаланс у редокс хомеостазу је индуковао оксидативни стрес који је последично редуковао вијабилност карциномских ћелија и проузроковао апоптозу у значајном проценту. Механизам деловања већине цитоотоксичних агенаса који су у клиничкој употреби се заснива на индукцији оксидативног стреса у ћелијама карцинома. Обзиром на наведено Орлистат, Симвастатин и *O. minimum* су значајни кандидати за даље испитивање са циљем развоја прооксидативних агенаса у антитуморској терапији.
- Значајна инхибиција параметра ангиогенезе (MMP-9, HIF-1 α , VEGF, CXCR4-CXCL12) на генском и протеинском нивоу је евидентна након примене Орлистата, Симвастатина и *O. minimum* на ћелије карцинома дојке. Ови третмани су смањили миграторни и метастатски потенцијал тестираних троструко-негативних ћелија карцинома дојке, које се карактеришу као изразито инвазивне и метастатске. Може се закључити да су тестирани третмани значајни инхибитори ангиогенезе и имају потенцијал за даља испитивања са аспекта примене у антитуморској терапији.
- Испитивањем маркера биосинтезе масних киселина (ACLY, ACC, FASN) након примене Орлистата, Симвастатина и *O. minimum* долази се до закључка да су ови третмани значајно снижили експресију тестираних параметара на генском и протеинском нивоу. Супресија тестираних параметара уз помоћ ових третмана, говори да је дошло до инхибиције веома битног енергетског сигналног пута, чиме је смањена пролиферација, инхибирана миграција и ангиогенеза тестираних троструко-негативних ћелија карцинома дојке.
- Орлистат и Симвастатин, нису део стандардне антитуморске терапије, већ се користе искључиво за лечење гојазности и хиперхолестеролемије. На основу свих

приказаних резултата у оквиру *in vitro* испитивања, стиче се даља могућност тестирања ових лекова у сврху добијања нове терапијске индикације поступком пренамене лекова. Нова терапијска индикација за ове лекове би била њихова директна примена као антитуморска терапији, самостално или у комбинацији са стандардном онколошком терапијом.

- Метанолни екстракт цветова медицинске биљке *O. minimum*, на основу приказаних резултата има потенцијала да се користи као суплемент приликом стандардне онколошке терапије лечења карцинома дојке. Да би одређени биљни третман постао суплемент у антитуморској терапији потребно је да прође и одређена *in vivo* тестирања, тако да су неопходна додатна истраживања у ову сврху.

На основу добијених резултата за праћење релативне експресије иРНК и протеинске експресије молекуларних маркера биосинтезе масних киселина на узорцима ткива пацијената оболелих од карцинома дојке изведени су следећи закључци:

- Релативна експресија иРНК *ACLY* гена је виша у узорцима ткива из микроокружења у односу на карциномском ткиво код пацијената са ER⁺/PR⁺/HER2⁻ подтипом, код групе пацијената са секундарним депозитима у 1-3 аксиларна лимфна нодуса, код пацијената са детектованим секундарним метастазама, као и код млађих жена. Повишена релативна експресија иРНК *ACLY* гена у микроокружењу карцинома може указивати на повећани ризик од настанка метастаза како у лимфним нодусима тако и у другим регијама тела посебно код млађих жена, што овај ген чини значајним прогностичким биомаркером.
- Релативна експресија иРНК *FASN* гена као и његова протеинска експресија је виша код узорака ткива карцинома дојке у односу на узорке из микроокружења посматрајући све наведене клиничко-патолошке карактеристике и TNM класификациони модел. На основу приказаних резултата може се закључити да је прекомерна експресија *FASN*-а значајна фенотипска промена која је карактеристична за карцином дојке. Повећање експресије *FASN*-а доводи до абераантне синтезе масних киселина у карциномским ћелија што директно доприноси њиховом метастатском потенцијалу и прогресији болести.
- Код тестираних узорака карцинома дојке и микроокружења карцинома, примећене су промене на молекуларном нивоу које нису биле уочљиве патохистолошком нивоу. Микроокружење карцинома активно учествује у процесима иницијације и прогресије тумора, стога је обавезна молекуларна анализа и овог типа узорка да би се разумела хетерогеност карцинома дојке.
- Два најзначајнија молекула која су укључена у регулацију процеса биосинтезе масних киселина код карцинома дојке су *ACLY* и *FASN*. На основу приказаних резултата може се закључити да ови молекули могу послужити као поуздани дијагностички и прогностички биомаркери. Потенцијална примена *ACLY* и *FASN* као нових клиничких биомаркера би допринела идентификацији инвазивних типова карцинома дојке.

Након добијених резултата применом савремених метода машинског учења на дефинисаном сету података изведени су следећи закључци:

- Креирање јединствене базе података, коју су чинили резултати протеинске експресије FASN-а заједно са клиничко-патолошким карактеристикама пацијената, и примена алгоритама машинског учења имали су за циљ побољшање постојећег TNM класификационог модела карцинома дојке. По први пут је вршена анализа ткива из микроокружења карцинома у сврху побољшања једног класификационог модела.
- Резултати валидације FASN-а са аспекта потенцијалног биомаркера који ће се користити заједно са већ дефинисаним TNM класификационим моделом, по први пут дају индицију да је могуће користити узорке ткива из микроокружења карцинома за унапређење једног класификационог модела. Идентификација нових биомаркера који би се пратили у микроокружењу карцинома значајно доприноси побољшању дијагностичких протокола који се свакодневно користе у клиничкој пракси.
- Коришћењем савремених алгоритама машинског учења показано је да протеинска експресија FASN-а може значајно допринети побољшању TNM класификационог модела на модел систему узорака ткива карцинома дојке. Неопходно је наставити истраживања са овог аспекта на већем броју узорака карцинома дојке да би овај биомаркер могао поуздано да се користи у клиничке сврхе са циљем побољшања дијагностичких и прогностичких протокола.

VII ЛИТЕРАТУРА

1. Abu-Elheiga, L., Matzuk, M. M., Kordari, P., Oh, W., Shaikenov, T., Gu, Z., & Wakil, S. J. (2005). Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34), 12011–12016.
2. Abuja, P. M., & Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 306(1-2), 1–17.
3. Adorno-Cruz, V., Hoffmann, A. D., Liu, X., Dashzeveg, N. K., Taftaf, R., Wray, B., Keri, R. A., & Liu, H. (2020). ITGA2 promotes expression of ACLY and CCND1 in enhancing breast cancer stemness and metastasis. *Genes & diseases*, 8(4), 493–508.
4. Aggarwal, S., Verma, S. S., Aggarwal, S., & Gupta, S. C. (2021). Drug repurposing for breast cancer therapy: Old weapon for new battle. *Seminars in cancer biology*, 68, 8–20.
5. Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M. B., Sak, K., Varol, M., Jain, A., Khan, M. A., & Sethi, G. (2019). Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules*, 9(11), 735.
6. Ahmadi, Y., Fard, J. K., Ghafoor, D., Eid, A. H., & Sahebkar, A. (2023). Paradoxical effects of statins on endothelial and cancer cells: the impact of concentrations. *Cancer cell international*, 23(1), 43.
7. Allison K. H. (2012). Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know. *American journal of clinical pathology*, 138(6), 770–780.
8. Allison K. H. (2021). Prognostic and predictive parameters in breast pathology: a pathologist's primer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 34(Suppl 1), 94–106.
9. Al-Ostoot, F. H., Salah, S., Khamees, H. A., & Khanum, S. A. (2021). Tumor angiogenesis: Current challenges and therapeutic opportunities. *Cancer treatment and research communications*, 28, 100422.
10. Al-Ostoot, F. H., Sherapura, A., V, V., Basappa, G., H K, V., B T, P., & Khanum, S. A. (2021). Targeting HIF-1 α by newly synthesized Indolephenoxyacetamide (IPA) analogs to induce anti-angiogenesis-mediated solid tumor suppression. *Pharmacological reports : PR*, 73(5), 1328–1343.
11. Amemiya-Kudo M, Shimano H, Hasty AH, Yahagi N, Yoshikawa T, Matsuzaka T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Sato R, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N. Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *Journal of lipid research*. 2002; 43(8): 1220–1235.
12. Amin, S. A., Adhikari, N., & Jha, T. (2017). Is dual inhibition of metalloenzymes HDAC-8 and MMP-2 a potential pharmacological target to combat hematological malignancies?. *Pharmacological Research*, 122, 8-19.
13. Amrani, S., Harnafi, H., Bouanani, N.elH., Aziz, M., Caid, H. S., Manfredini, S., Besco, E., Napolitano, M., & Bravo, E. (2006). Hypolipidaemic activity of aqueous ocimum basilicum extract in acute hyperlipidaemia induced by triton WR-1339 in rats and its antioxidant property. *Phytotherapy Research: An International Journal*

- Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(12), 1040-1045.
14. Amrutha, N. A., Archana, P. R., Mohan, S. G., Anto, R. J., & Sadasivan, C. (2019). Pyridine derivatives as anticancer lead compounds with Fatty Acid Synthase as the target: An in silico-guided in vitro study. *Journal of cellular biochemistry*, 120(10), 16643-16657.
15. Anderson, M. E., & Greenwald, R. (1985). Handbook of methods for oxygen radical research. Florida: CRC Press Inc, 317-23.
16. Anderson, T. J., Grégoire, J., Pearson, G. J., Barry, A. R., Couture, P., Dawes, M., ... & Ward, R. (2016). 2016 Canadian Cardiovascular Society guidelines for the management of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult. *Canadian Journal of Cardiology*, 32(11), 1263-1282.
17. Ankarberg-Lindgren, C., Elfving, M., Wikland, K. A., & Norjavaara, E. (2001). Nocturnal application of transdermal estradiol patches produces levels of estradiol that mimic those seen at the onset of spontaneous puberty in girls. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(7), 3039-3044.
18. Apostolopoulos, V., De Courten, M. P., Stojanovska, L., Blatch, G. L., Tangalakis, K., & De Courten, B. (2016). The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. *Molecular nutrition & food research*, 60(1), 43-57.
19. Aquilano, K., Baldelli, S., & Ciriolo, M. R. (2014). Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in pharmacology*, 5, 108999.
20. Assi, M. (2017). The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 313(6), R646-R653.
21. Auger, C., Knuth, C. M., Abdullahi, A., Samadi, O., Parousis, A., & Jeschke, M. G. (2019). Metformin prevents the pathological browning of subcutaneous white adipose tissue. *Molecular metabolism*, 29, 12-23.
22. Azadbakht, L., Jamali-Gojani, Z., & Heidari-Beni, M. (2015). Anti-obesity drug orlistat (xenical) is a novel antitumor medication. *Shiraz E-Medical Journal*, 16(1), e26242
23. Bachelierie, F., Graham, G. J., Locati, M., Mantovani, A., Murphy, P. M., Nibbs, R., Rot, A., Sozzani, S., & Thelen, M. (2014). New nomenclature for atypical chemokine receptors. *Nature immunology*, 15(3), 207-208.
24. Bagaria, S. P., Ray, P. S., Sim, M. S., Ye, X., Shamonki, J. M., Cui, X., & Giuliano, A. E. (2014). Personalizing breast cancer staging by the inclusion of ER, PR, and HER2. *JAMA surgery*, 149(2), 125-129.
25. Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, S., Javaheri, T., & Zare, P. (2020). Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell communication and signaling : CCS*, 18(1), 59.
26. Bai, F., Yu, Z., Gao, X., Gong, J., Fan, L., & Liu, F. (2019). Simvastatin induces breast cancer cell death through oxidative stress up-regulating miR-140-5p. *Aging (Albany NY)*, 11(10), 3198.
27. Baker, M. A., Cerniglia, G. J., & Zaman, A. (1990). Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Analytical biochemistry*, 190(2), 360-365.
28. Balaji Ragunathrao, V. A., Anwar, M., Akhter, M. Z., Chavez, A., Mao, Y., Natarajan, V., Lakshmikanthan, S., Chrzanowska-Wodnicka, M., Dudek, A. Z., Claesson-Welsh, L., Kitajewski, J. K., Wary, K. K., Malik, A. B., & Mehta, D.

- (2019). Sphingosine-1-phosphate receptor 1 activity promotes tumor growth by amplifying VEGF-VEGFR2 angiogenic signaling. *Cell reports*, 29(11), 3472-3487.
29. Banach, M., Duell, P. B., Gotto, A. M., Jr, Laufs, U., Leiter, L. A., Mancini, G. B. J., Ray, K. K., Flaim, J., Ye, Z., & Catapano, A. L. (2020). Association of bempedoic acid administration with atherogenic lipid levels in phase 3 randomized clinical trials of patients with hypercholesterolemia. *JAMA cardiology*, 5(10), 1124-1135.
30. Bandyopadhyay, S., Zhan, R., Wang, Y., Pai, S. K., Hirota, S., Hosobe, S., Takano, Y., Saito, K., Furuta, E., Iizumi, M., Mohinta, S., Watabe, M., Chalfant, C., & Watabe, K. (2006). Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. *Cancer research*, 66(11), 5934-5940.
31. Banik, A., Sharma, R., Chauhan, A., & Singh, S. (2022). Cutting the umbilical cord: Cancer stem cell-targeted therapeutics. *Life sciences*, 299, 120502.
32. Banin Hirata, B. K., Oda, J. M. M., Losi Guembarovski, R., Ariza, C. B., Oliveira, C. E. C. D., & Watanabe, M. A. E. (2014). Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior. *Disease markers*, 2014(1), 513158.
33. Bansal, A. B., & Al Khalili, Y. (2022). Orlistat.[Updated 2022 Nov 2]. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
34. Barrera, G. (2012). Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *International Scholarly Research Notices*, 2012(1), 137289.
35. Barroso-Sousa, R., & Metzger-Filho, O. (2016). Differences between invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast: results and therapeutic implications. *Therapeutic advances in medical oncology*, 8(4), 261-266.
36. Baskić, D., Popović, S., Ristić, P., & Arsenijević, N. N. (2006). Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell biology international*, 30(11), 924-932.
37. Batchuluun, B., Pinkosky, S. L., & Steinberg, G. R. (2022). Lipogenesis inhibitors: therapeutic opportunities and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(4), 283-305.
38. Beckers, A., Organe, S., Timmermans, L., Scheys, K., Peeters, A., Brusselmans, K., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2007). Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cells. *Cancer research*, 67(17), 8180-8187.
39. Beckner, M. E., Fellows-Mayle, W., Zhang, Z., Agostino, N. R., Kant, J. A., Day, B. W., & Pollack, I. F. (2010). Identification of ATP citrate lyase as a positive regulator of glycolytic function in glioblastomas. *International Journal of Cancer*, 126(10), 2282-2295.
40. Beckwitt, C. H., Brufsky, A., Oltvai, Z. N., & Wells, A. (2018). Statin drugs to reduce breast cancer recurrence and mortality. *Breast Cancer Research*, 20, 1-11.
41. Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1), 245-313.
42. Behera, M. P., Sarangi, A., Mishra, D., & Sarangi, S. K. (2023). A hybrid machine learning algorithm for heart and liver disease prediction using modified particle swarm optimization with support vector machine. *Procedia Computer Science*, 218, 818-827.
43. Bell, R., Barraclough, R., & Vasieva, O. (2017). Gene expression meta-analysis of potential metastatic breast cancer markers. *Current molecular medicine*, 17(3), 200-210.

44. Bertolio, R., Napoletano, F., Mano, M., Maurer-Stroh, S., Fantuz, M., Zannini, A., Biciato, S., Sorrentino, G., & Del Sal, G. (2019). Sterol regulatory element binding protein 1 couples mechanical cues and lipid metabolism. *Nature communications*, 10(1), 1326.
45. Bhat, S. G. (2021). Medicinal plants and its pharmacological values. *Natural medicinal plants*, 12, 217-228.
46. Bilal, A., Jahan, N., Ahmed, A., Bilal, S. N., Habib, S., & Hajra, S. (2012). Phytochemical and pharmacological studies on *Ocimum basilicum* Linn-A review. *International Journal of Current Research and Review*, 4(23), 73-83.
47. Biswas, P., Dey, D., Biswas, P. K., Rahaman, T. I., Saha, S., Parvez, A., Khan, D. A., Lily, N. J., Saha, K., Sohel, M., Hasan, M. M., Al Azad, S., Bibi, S., Hasan, M. N., Rahmatullah, M., Chun, J., Rahman, M. A., & Kim, B. (2022). A comprehensive analysis and anti-cancer activities of quercetin in ROS-mediated cancer and cancer stem cells. *International journal of molecular sciences*, 23(19), 11746.
48. Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
49. Blücher, C., & Stadler, S. C. (2017). Obesity and breast cancer: current insights on the role of fatty acids and lipid metabolism in promoting breast cancer growth and progression. *Frontiers in endocrinology*, 8, 300843.
50. Botlagunta, M., Botlagunta, M. D., Myneni, M. B., Lakshmi, D., Nayyar, A., Gullapalli, J. S., & Shah, M. A. (2023). Classification and diagnostic prediction of breast cancer metastasis on clinical data using machine learning algorithms. *Scientific Reports*, 13(1), 485.
51. Bouris, P., Manou, D., Sopaki-Valalaki, A., Kolokotroni, A., Moustakas, A., Kapoor, A., Iozzo, R. V., Karamanos, N. K., & Theocharis, A. D. (2018). Serglycin promotes breast cancer cell aggressiveness: Induction of epithelial to mesenchymal transition, proteolytic activity and IL-8 signaling. *Matrix Biology*, 74, 35-51.
52. Browne, C. D., Hindmarsh, E. J., & Smith, J. W. (2006). Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. *The FASEB journal*, 20(12), 2027-2035.
53. Brownsey, R. W., Boone, A. N., Elliott, J. E., Kulpa, J. E., & Lee, W. M. (2006). Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions*, 34(2), 223-227.
54. Büchner, F. L., Bueno-de-Mesquita, H. B., Linseisen, J., Boshuizen, H. C., Kiemeny, L. A. L. M., Ros, M. M., ... & Riboli, E. (2010). Fruits and vegetables consumption and the risk of histological subtypes of lung cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer causes & control*, 21, 357-371.
55. Buckley, D., Duke, G., Heuer, T. S., O'Farrell, M., Wagman, A. S., McCulloch, W., & Kemble, G. (2017). Fatty acid synthase—modern tumor cell biology insights into a classical oncology target. *Pharmacology & therapeutics*, 177, 23-31.
56. Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 52, 302-310.
57. Buranrat, B., Suwannaloet, W., & Naowaboot, J. (2017). Simvastatin potentiates doxorubicin activity against MCF-7 breast cancer cells. *Oncology letters*, 14(5), 6243-6250.
58. Cabral-Pacheco, G. A., Garza-Veloz, I., Castruita-De la Rosa, C., Ramirez-Acuña, J. M., Perez-Romero, B. A., Guerrero-Rodriguez, J. F., Martinez-Avila, N., & Martinez-Fierro, M. L. (2020). The roles of matrix metalloproteinases and their

- inhibitors in human diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9739.
59. Cadiz, F., Gormaz, J. G., & Burotto, M. (2018). Breast cancer staging: is TNM ready to evolve?. *Journal of global oncology*, 4, 1-3.
60. Capes-Davis, A., Bairoch, A., Barrett, T., Burnett, E. C., Dirks, W. G., Hall, E. M., Healy, L., Kniss, D. A., Korch, C., Liu, Y., Neve, R. M., Nims, R. W., Parodi, B., Schweppe, R. E., Storts, D. R., & Tian, F. (2019). Cell lines as biological models: practical steps for more reliable research. *Chemical research in toxicology*, 32(9), 1733-1736.
61. Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), 932-936.
62. Carović-Stanko, K., Petek, M., Grdiša, M., Pintar, J., Bedeković, D., Herak Ćustić, M., & Satovic, Z. (2016). Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods-a review. *Czech journal of food sciences*, 34(5), 377-390.
63. Castellanos-Esparza, Y. C., Wu, S., Huang, L., Buquet, C., Shen, R., Sanchez-Gonzalez, B., García Latorre, E. A., Boyer, O., Varin, R., Jiménez-Zamudio, L. A., Janin, A., Vannier, J. P., Li, H., & Lu, H. (2018). Synergistic promoting effects of pentoxifylline and simvastatin on the apoptosis of triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. *International journal of oncology*, 52(4), 1246-1254.
64. Cedó, L., Reddy, S. T., Mato, E., Blanco-Vaca, F., & Escolà-Gil, J. C. (2019). HDL and LDL: potential new players in breast cancer development. *Journal of clinical medicine*, 8(6), 853.
65. Cervantes-Madrid, D., & Dueñas-González, A. (2015). Antitumor effects of a drug combination targeting glycolysis, glutaminolysis and de novo synthesis of fatty acids. *Oncology reports*, 34(3), 1533-1542.
66. Chajès, V., Cambot, M., Moreau, K., Lenoir, G. M., & Joulin, V. (2006). Acetyl-CoA carboxylase α is essential to breast cancer cell survival. *Cancer research*, 66(10), 5287-5294.
67. Chalbos, D., Joyeux, C., Galtier, F., & Rochefort, H. (1992). Progestin-induced fatty acid synthetase in human mammary tumors: from molecular to clinical studies. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 43(1-3), 223-228.
68. Charbuty, B., & Abdulazeez, A. (2021). Classification based on decision tree algorithm for machine learning. *Journal of Applied Science and Technology Trends*, 2(01), 20-28.
69. Chaturvedi, S., Biswas, M., Sadhukhan, S., & Sonawane, A. (2023). Role of EGFR and FASN in breast cancer progression. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 17(4), 1249-1282.
70. Chen, K., Bao, Z., Tang, P., Gong, W., Yoshimura, T., & Wang, J. M. (2018). Chemokines in homeostasis and diseases. *Cellular & molecular immunology*, 15(4), 324-334.
71. Chen, W., Wang, C., Fu, F., Yang, B., Chen, C., & Sun, Y. (2020). A model to predict the risk of lymph node metastasis in breast cancer based on clinicopathological characteristics. *Cancer Management and Research*, 10439-10447.
72. Chen, Y., Li, K., Gong, D. I., Zhang, J., Li, Q., Zhao, G., & Lin, P. (2020). ACLY: A biomarker of recurrence in breast cancer. *Pathology-Research and Practice*, 216(9), 153076.
73. Chippa, V., & Barazi, H. (2020). Inflammatory breast cancer. In StatPearls. StatPearls Publishing.
74. Chirala, S. S., & Wakil, S. J. (2004). Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids*, 39(11), 1045-1053.

75. Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), 156-159.
76. Christen, S., Lorendeau, D., Schmieder, R., Broekaert, D., Metzger, K., Veys, K., Elia, I., Buescher, J. M., Orth, M. F., Davidson, S. M., Grünewald, T. G., De Bock, K., & Fendt, S. M. (2016). Breast cancer-derived lung metastases show increased pyruvate carboxylase-dependent anaplerosis. *Cell reports*, 17(3), 837-848.
77. Chypre, M., Zaidi, N., & Smans, K. (2012). ATP-citrate lyase: a mini-review. *Biochemical and biophysical research communications*, 422(1), 1-4.
78. Cioccoloni, G., Aquino, A., Notarnicola, M., Caruso, M. G., Bonmassar, E., Zonfrillo, M., Caporali, S., Faraoni, I., Villivà, C., Fuggetta, M. P., & Franzese, O. (2020). Fatty acid synthase inhibitor orlistat impairs cell growth and down-regulates PD-L1 expression of a human T-cell leukemia line. *Journal of Chemotherapy*, 32(1), 30-40.
79. Clarke, C. A., Glaser, S. L., Uratsu, C. S., Selby, J. V., Kushi, L. H., & Herrinton, L. J. (2006). Recent declines in hormone therapy utilization and breast cancer incidence: clinical and population-based evidence. *Journal of Clinical Oncology*, 24(33), e49-e50.
80. Clusan, L., Ferrière, F., Flouriot, G., & Pakdel, F. (2023). A basic review on estrogen receptor signaling pathways in breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 24(7), 6834.
81. Coimbra, M., Banciu, M., Fens, M. H., de Smet, L., Cabaj, M., Metselaar, J. M., Storm, G., & Schiffelers, R. M. (2010). Liposomal pravastatin inhibits tumor growth by targeting cancer-related inflammation. *Journal of controlled release*, 148(3), 303-310.
82. Conklin, K. A. (2004). Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integrative cancer therapies*, 3(4), 294-300.
83. Cook-Botelho, J. C., Bachmann, L. M., & French, D. (2017). Steroid hormones. In *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory* (pp. 205-230). Academic Press.
84. Corominas-Faja, B., Vellon, L., Cuyàs, E., Buxó, M., Martin-Castillo, B., Serra, D., García, J., Lupu, R., & Menendez, J. A. (2017). Clinical and therapeutic relevance of the metabolic oncogene fatty acid synthase in HER2+ breast cancer. *Histology and histopathology*, 32(7), 687.
85. Costello, L. C., & Franklin, R. B. (2005). 'Why do tumour cells glycolyse?': from glycolysis through citrate to lipogenesis. *Molecular and cellular biochemistry*, 280, 1-8.
86. Criner, G. J., Connett, J. E., Aaron, S. D., Albert, R. K., Bailey, W. C., Casaburi, R., ... & Lazarus, S. C. (2014). Simvastatin for the prevention of exacerbations in moderate-to-severe COPD. *New England Journal of Medicine*, 370(23), 2201-2210.
87. Cui, Y., Xing, P., Wang, Y., Liu, M., Qiu, L., Ying, G., & Li, B. (2017). NADPH accumulation is responsible for apoptosis in breast cancer cells induced by fatty acid synthase inhibition. *Oncotarget*, 8(20), 32576.
88. Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C., & Farese, R. V. (2013). Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell metabolism*, 18(2), 153-161.
89. Cvetković, D. (2017). Uloga molekularnih mehanizama neoangiogeneze kao tumor markera u individualizaciji terapije pacijenata sa karcinomom dojke. *Универзитет у Крагујевцу*.
90. Daniel, S. K., Seo, Y. D., & Pillarisetty, V. G. (2020). The CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis as a mechanism of immune resistance in gastrointestinal malignancies. *Seminars in cancer biology*, 65, 176-188.

91. D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(10), 813-824.
92. Delle Monache, S., Cortellini, A., Parisi, A., Pulcini, F., Martellucci, S., Mei, C., Danubio, M. E., Mattei, V., Angelucci, A., & Ficorella, C. (2020). Expression of pro-angiogenic factors as potential biomarkers in experimental models of colon cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 146(6), 1427-1440.
93. Denoix, P. F., & Schwartz, D. (1959). General rules for classification of cancers and presentation of the therapeutic results. *Mémoires. Académie de chirurgie (France)*, 85(15-16), 415-424.
94. Deponte, M. (2017). The incomplete glutathione puzzle: just guessing at numbers and figures?. *Antioxidants & redox signaling*, 27(15), 1130-1161.
95. Desai, A. G., Qazi, G. N., Ganju, R. K., El-Tamer, M., Singh, J., Saxena, A. K., Bedi, Y. S., Taneja, S. C., & Bhat, H. K. (2008). Medicinal plants and cancer chemoprevention. *Current drug metabolism*, 9(7), 581-591.
96. Dharsono, H. D. A., Putri, S. A., Kurnia, D., Dudi, D., & Satari, M. H. (2022). Ocimum species: A review on chemical constituents and antibacterial activity. *Molecules*, 27(19), 6350.
97. Diab, F., Zbeeb, H., Baldini, F., Portincasa, P., Khalil, M., & Vergani, L. (2022). The potential of Lamiaceae herbs for mitigation of overweight, obesity, and fatty liver: studies and perspectives. *Molecules*, 27(15), 5043.
98. Dimopoulos, M. A., & Kastiris, E. (2018). Thalidomide for myeloma: still here?. *The Lancet Haematology*, 5(10), e439-e440.
99. Du, T., Zhu, L., Levine, K. M., Tasdemir, N., Lee, A. V., Vignali, D. A. A., Houten, B. V., Tseng, G. C., & Oesterreich, S. (2018). Invasive lobular and ductal breast carcinoma differ in immune response, protein translation efficiency and metabolism. *Scientific reports*, 8(1), 7205.
100. Duarte, J. A., de Barros, A. L. B., & Leite, E. A. (2021). The potential use of simvastatin for cancer treatment: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141, 111858.
101. Ellis, H., & Mahadevan, V. (2013). Anatomy and physiology of the breast. *Surgery (Oxford)*, 31(1), 11-14.
102. Epstein, J. I., Carmichael, M., & Partin, A. W. (1995). OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic stage in adenocarcinoma of the prostate. *Urology*, 45(1), 81-86.
103. Fako, V. E., Zhang, J. T., & Liu, J. Y. (2014). Mechanism of orlistat hydrolysis by the thioesterase of human fatty acid synthase. *ACS catalysis*, 4(10), 3444-3453.
104. Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppapapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, 5(2), 77-106.
105. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 10.1002/ijc.33588. Advance online publication.
106. Fernando, N. H., & Hurwitz, H. I. (2003). Inhibition of vascular endothelial growth factor in the treatment of colorectal cancer. *Seminars in oncology*, 30(3 Suppl 6), 39-50.
107. Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*, 25(4), 581-611.

108. Fhu, C. W., & Ali, A. (2020). Fatty acid synthase: an emerging target in cancer. *Molecules*, 25(17), 3935.
109. Fitzgibbons, P. L., Page, D. L., Weaver, D., Thor, A. D., Allred, D. C., Clark, G. M., Ruby, S. G., O'Malley, F., Simpson, J. F., Connolly, J. L., Hayes, D. F., Edge, S. B., Lichter, A., & Schnitt, S. J. (2000). Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists consensus statement 1999. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 124(7), 966-978.
110. Flavin, R., Peluso, S., Nguyen, P. L., & Loda, M. (2010). Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future oncology*, 6(4), 551-562.
111. Floris, A., Mazarei, M., Yang, X., Robinson, A. E., Zhou, J., Barberis, A., D'hallewin, G., Azara, E., Spissu, Y., Iglesias-Ara, A., Orrù, S., & Tomasi, M. L. (2020). SUMOylation protects FASN against proteasomal degradation in breast cancer cells treated with grape leaf extract. *Biomolecules*, 10(4), 529.
112. Folkman, J. (1997). Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *Regulation of angiogenesis*, 1-8.
113. Forman, H. J., Ursini, F., & Maiorino, M. (2014). An overview of mechanisms of redox signaling. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 73, 2-9.
114. Fragomeni, S. M., Sciallis, A., & Jeruss, J. S. (2018). Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surgical Oncology Clinics*, 27(1), 95-120.
115. Freshney, R. I. (1987). Culture of animal cells. A manual of basic technique.
116. Fu, L., Jin, W., Zhang, J., Zhu, L., Lu, J., Zhen, Y., Zhang, L., Ouyang, L., Liu, B., & Yu, H. (2022). Repurposing non-oncology small-molecule drugs to improve cancer therapy: Current situation and future directions. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(2), 532-557.
117. Fu, X., Ma, W., Zuo, Q., Qi, Y., Zhang, S., & Zhao, Y. (2024). Application of machine learning for high-throughput tumor marker screening. *Life Sciences*, 122634.
118. Fu, Y., Zou, T., Shen, X., Nelson, P. J., Li, J., Wu, C., Yang, J., Zheng, Y., Bruns, C., Zhao, Y., Qin, L., & Dong, Q. (2020). Lipid metabolism in cancer progression and therapeutic strategies. *MedComm*, 2(1), 27-59.
119. Furrer, D., Paquet, C., Jacob, S., & Diorio, C. (2018). The human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) as a prognostic and predictive biomarker: Molecular insights into HER2 activation and diagnostic implications. *Cancer Prognosis*.
120. Gamble, P., Jaroensri, R., Wang, H., Tan, F., Moran, M., Brown, T., Flament-Auvigne, I., Rakha, E. A., Toss, M., Dabbs, D. J., Regitnig, P., Olson, N., Wren, J. H., Robinson, C., Corrado, G. S., Peng, L. H., Liu, Y., Mermel, C. H., Steiner, D. F., & Chen, P. C. (2021). Determining breast cancer biomarker status and associated morphological features using deep learning. *Communications medicine*, 1(1), 14.
121. Gao, J. J., & Swain, S. M. (2018). Luminal a breast cancer and molecular assays: a review. *The oncologist*, 23(5), 556-565.
122. Gao, J., Zhao, Y., Li, T., Gan, X., & Yu, H. (2022). The role of PKM2 in the regulation of mitochondrial function: Focus on mitochondrial metabolism, oxidative stress, dynamic, and apoptosis. PKM2 in mitochondrial function. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022(1), 7702681.
123. Garcia-Martinez, L., Zhang, Y., Nakata, Y., Chan, H. L., & Morey, L. (2021). Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and resistance. *Nature communications*, 12(1), 1786.
124. Geddes, D. T. (2007). Inside the lactating breast: the latest anatomy research. *Journal of midwifery & women's health*, 52(6), 556-563.

125. Giuliano, A. E., Edge, S. B., & Hortobagyi, G. N. (2018). Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Annals of surgical oncology*, 25(7), 1783–1785.
126. Gnoni, A., Di Chiara Stanca, B., Giannotti, L., Gnoni, G. V., Siculella, L., & Damiano, F. (2022). Quercetin reduces lipid accumulation in a cell model of NAFLD by inhibiting de novo fatty acid synthesis through the acetyl-CoA carboxylase 1/AMPK/PP2A axis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1044.
127. Goldhirsch, A., Winer, E. P., Coates, A. S., Gelber, R. D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., Senn, H. J., & Panel members (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of oncology*, 24(9), 2206-2223.
128. Gonzalez-Avila, G., Sommer, B., García-Hernández, A. A., & Ramos, C. (2020). Matrix metalloproteinases' role in tumor microenvironment. *Advances in experimental medicine and biology*, 1245, 97–131.
129. Gopalan, A., Yu, W., Sanders, B. G., & Kline, K. (2013). Simvastatin inhibition of mevalonate pathway induces apoptosis in human breast cancer cells via activation of JNK/CHOP/DR5 signaling pathway. *Cancer letters*, 329(1), 9-16.
130. Granchi, C. (2018). ATP citrate lyase (ACLY) inhibitors: An anti-cancer strategy at the crossroads of glucose and lipid metabolism. *European journal of medicinal chemistry*, 157, 1276-1291.
131. Greene, F. L., Balch, C. M., Fleming, I. D., Fritz, A., Haller, D. G., Morrow, M., & Page, D. L. (Eds.). (2002). *AJCC cancer staging handbook: TNM classification of malignant tumors*. Springer Science & Business Media.
132. Greener, J. G., Kandathil, S. M., Moffat, L., & Jones, D. T. (2022). A guide to machine learning for biologists. *Nature reviews Molecular cell biology*, 23(1), 40-55.
133. Greenwell, M., & Rahman, P. K. S. M. (2015). Medicinal plants: their use in anticancer treatment. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 6(10), 4103.
134. Grundy, S. M., & Stone, N. J. (2019). 2018 American Heart Association/American College of Cardiology/multisociety guideline on the management of blood cholesterol—secondary prevention. *JAMA cardiology*, 4(6), 589-591.
135. Hanai, J. I., Doro, N., Sasaki, A. T., Kobayashi, S., Cantley, L. C., Seth, P., & Sukhatme, V. P. (2012). Inhibition of lung cancer growth: ATP citrate lyase knockdown and statin treatment leads to dual blockade of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT pathways. *Journal of cellular physiology*, 227(4), 1709-1720.
136. Hao, X., Zhu, X., Tian, H., Lai, G., Zhang, W., Zhou, H., & Liu, S. (2023). Pharmacological effect and mechanism of orlistat in anti-tumor therapy: A review. *Medicine*, 102(36), e34671.
137. Harada, N., Oda, Z., Hara, Y., Fujinami, K., Okawa, M., Ohbuchi, K., Yonemoto, M., Ikeda, Y., Ohwaki, K., Aragane, K., Tamai, Y., & Kusunoki, J. (2007). Hepatic de novo lipogenesis is present in liver-specific ACC1-deficient mice. *Molecular and cellular biology*, 27(5), 1881–1888.
138. Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), 66.
139. Harbola, A., Negi, D., Manchanda, M., & Kesharwani, R. K. (2022). Bioinformatics and biological data mining. In *Bioinformatics* (pp. 457-471). Academic Press.

140. Harris, D. M., Li, L., Chen, M., Lagunero, F. T., Go, V. L. W., & Boros, L. G. (2012). Diverse mechanisms of growth inhibition by luteolin, resveratrol, and quercetin in MIA PaCa-2 cells: a comparative glucose tracer study with the fatty acid synthase inhibitor C75. *Metabolomics*, 8, 201-210.
141. Harris, H. (2005). A long view of fashions in cancer research. *Bioessays*, 27(8), 833-838.
142. Harris, J. R., Lippman, M. E., Osborne, C. K., & Morrow, M. (2012). *Diseases of the Breast*. Lippincott Williams & Wilkins.
143. Hashemzaei, M., Delarami Far, A., Yari, A., Heravi, R. E., Tabrizian, K., Taghdisi, S. M., Sadegh, S. E., Tsarouhas, K., Kouretas, D., Tzanakakis, G., Nikitovic, D., Anisimov, N. Y., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., & Rezaee, R. (2017). Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncology reports*, 38(2), 819-828.
144. Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D. E., Andreadis, C., Shaw, A. N., Dhanak, D., Hingorani, S. R., Tuveson, D. A., & Thompson, C. B. (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer cell*, 8(4), 311-321.
145. Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative stress in cancer. *Cancer cell*, 38(2), 167-197.
146. Henness, S., & Perry, C. M. (2006). Orlistat: a review of its use in the management of obesity. *Drugs*, 66, 1625-1656.
147. Hens, J. R., & Wysolmerski, J. J. (2005). Key stages of mammary gland development: molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast Cancer Research*, 7, 1-5.
148. Herynk, M. H., & Fuqua, S. A. (2004). Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocrine reviews*, 25(6), 869-898.
149. Higuchi, H., Bronk, S. F., Takikawa, Y., Werneburg, N., Takimoto, R., El-Deiry, W., & Gores, G. J. (2001). The bile acid glycochenodeoxycholate induces trail-receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *Journal of biological chemistry*, 276(42), 38610-38618.
150. Hillen, F., & Griffioen, A. W. (2007). Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(3), 489-502.
151. Hlatky, L., Tsionou, C., Hahnfeldt, P., & Coleman, C. N. (1994). Mammary fibroblasts may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced vascular endothelial growth factor up-regulation and protein expression. *Cancer research*, 54(23), 6083-6086.
152. Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research*, 13, 1-7.
153. Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M., & Shimomura, I. (2007). Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*, 56(4), 901-911.
154. Hovey, R. C., Trott, J. F., & Vonderhaar, B. K. (2002). Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 7, 17-38.
155. Huang, B., Song, B. L., & Xu, C. (2020). Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nature metabolism*, 2(2), 132-141.
156. Huang, C., & Freter, C. (2015). Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 16(1), 924-949.
157. Huang, Y. J., & Nan, G. X. (2019). Oxidative stress-induced angiogenesis. *Journal of Clinical Neuroscience*, 63, 13-16.

158. Huhtala, P., Tuuttila, A., Chow, L. T., Lohi, J., Keski-Oja, J., & Tryggvason, K. (1991). Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266(25), 16485-16490.
159. Hunkeler, M., Stüttgen, E., Hagmann, A., Imseng, S., & Maier, T. (2016). The dynamic organization of fungal acetyl-CoA carboxylase. *Nature communications*, 7(1), 11196.
160. Hvizdos, K. M., & Markham, A. (1999). Orlistat: a review of its use in the management of obesity. *Drugs*, 58(4), 743-760.
161. Hwang, K. E., Kim, Y. S., Hwang, Y. R., Kwon, S. J., Park, D. S., Cha, B. K., Kim, B. R., Yoon, K. H., Jeong, E. T., & Kim, H. R. (2014). Enhanced apoptosis by pemetrexed and simvastatin in malignant mesothelioma and lung cancer cells by reactive oxygen species-dependent mitochondrial dysfunction and Bim induction. *International journal of oncology*, 45(4), 1769-1777.
162. Ibrahim, A. B., Zaki, H. F., Wadie, W., Omran, M. M., & Shouman, S. A. (2019). Simvastatin evokes an unpredicted antagonism for tamoxifen in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Management and Research*, 11, 10011-10028.
163. Icard, P., Fournel, L., Wu, Z., Alifano, M., & Lincet, H. (2019). Interconnection between metabolism and cell cycle in cancer. *Trends in biochemical sciences*, 44(6), 490-501.
164. Iizuka, K., & Horikawa, Y. (2008). ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocrine journal*, 55(4), 617-624.
165. Iqbal, N., & Iqbal, N. (2014). Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications. *Molecular biology international*, 2014(1), 852748.
166. Iriti, M., Kubina, R., Cochis, A., Sorrentino, R., Varoni, E. M., Kabała-Dzik, A., Azzimonti, B., Dziedzic, A., Rimondini, L., & Wojtyczka, R. D. (2017). Rutin, a quercetin glycoside, restores chemosensitivity in human breast cancer cells. *Phytotherapy Research*, 31(10), 1529-1538.
167. Ishii, S., Iizuka, K., Miller, B. C., & Uyeda, K. (2004). Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(44), 15597-15602.
168. Jacobs, J. P., Jones, C. M., & Baille, J. P. (1970). Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*, 227(5254), 168-170.
169. Jacobsen, B. M., & Horwitz, K. B. (2012). Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Molecular and cellular endocrinology*, 357(1-2), 18-29.
170. Jacobsen, J. A., Jourden, J. L. M., Miller, M. T., & Cohen, S. M. (2010). To bind zinc or not to bind zinc: an examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(1), 72-94.
171. Jakobsson, A., Westerberg, R., & Jacobsson, A. (2006). Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Progress in lipid research*, 45(3), 237-249.
172. Jakovljević, D. (2018). Intraspecijska varijabilnost primarnog i sekundarnog metabolizma nutritivno depriviranih klijanaca vrste *Ocimum basilicum* L.(Lamiaceae). *Универзитет у Крагујевцу*.

173. Jian, A., Jang, K., Manuguerra, M., Liu, S., Magnussen, J., & Di Ieva, A. (2021). Machine learning for the prediction of molecular markers in glioma on magnetic resonance imaging: a systematic review and meta-analysis. *Neurosurgery*, 89(1), 31-44.
174. Jiang, T., Zhang, G., & Lou, Z. (2020). Role of the sterol regulatory element binding protein pathway in tumorigenesis. *Frontiers in Oncology*, 10, 1788.
175. Jiang, W., Xing, X. L., Zhang, C., Yi, L., Xu, W., Ou, J., & Zhu, N. (2021). MET and FASN as prognostic biomarkers of triple negative breast cancer: A systematic evidence landscape of clinical study. *Frontiers in Oncology*, 11, 604801.
176. Joharatnam-Hogan, N., Alexandre, L., Yarmolinsky, J., Lake, B., Capps, N., Martin, R. M., Ring, A., Cafferty, F., & Langley, R. E. (2021). Statins as potential chemoprevention or therapeutic agents in cancer: a model for evaluating repurposed drugs. *Current Oncology Reports*, 23, 1-13.
177. Jordan, V. C., & Brodie, A. M. (2007). Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids*, 72(1), 7-25.
178. Josifović, M. (1970). Flora Republike Srbije. IX, SANU, Beograd, 1986.
179. Jourdan, J. P., Bureau, R., Rochais, C., & Dallemagne, P. (2020). Drug repositioning: a brief overview. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72(9), 1145-1151.
180. Joyeux, C., Rochefort, H., & Chalbos, D. (1989). Progestin increases gene transcription and messenger ribonucleic acid stability of fatty acid synthetase in breast cancer cells. *Molecular endocrinology*, 3(4), 681-686.
181. Jung, C. H., Cho, I., Ahn, J., Jeon, T. I., & Ha, T. Y. (2013). Quercetin reduces high-fat diet-induced fat accumulation in the liver by regulating lipid metabolism genes. *Phytotherapy Research*, 27(1), 139-143.
182. Kalkhoven, E., Kwakkenbos-Isbrücker, L., de Laat, S. W., van der Saag, P. T., & van der Burg, B. (1994). Synthetic progestins induce proliferation of breast tumor cell lines via the progesterone or estrogen receptor. *Molecular and cellular endocrinology*, 102(1-2), 45-52.
183. Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., ... & Lyden, D. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438(7069), 820-827.
184. Karlic, H., Thaler, R., Gerner, C., Grunt, T., Proestling, K., Haider, F., & Varga, F. (2015). Inhibition of the mevalonate pathway affects epigenetic regulation in cancer cells. *Cancer genetics*, 208(5), 241-252.
185. Kaushik, I., Ramachandran, S., Prasad, S., & Srivastava, S. K. (2021). Drug rechanneling: A novel paradigm for cancer treatment. *Seminars in cancer biology*, 68, 279-290.
186. Kenemans, P., Verstraeten, R. A., & Verheijen, R. H. M. (2004). Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*, 49(1), 34-43.
187. Khan, S., Shukla, S., Sinha, S., & Meeran, S. M. (2013). Role of adipokines and cytokines in obesity-associated breast cancer: therapeutic targets. *Cytokine & growth factor reviews*, 24(6), 503-513.
188. Kim, J. Y., Choi, Y. J., & Kim, H. J. (2021). Determining the effect of ellagic acid on the proliferation and migration of pancreatic cancer cell lines. *Translational cancer research*, 10(1), 424.
189. Kim, Y. M., Shin, H. T., Seo, Y. H., Byun, H. O., Yoon, S. H., Lee, I. K., Hyun, D. H., Chung, H. Y., & Yoon, G. (2010). Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1-mediated lipogenesis is involved in cell senescence. *The Journal of biological chemistry*, 285(38), 29069-29077.

190. Kim, Y. W., & Byzova, T. V. (2014). Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood, the Journal of the American Society of Hematology*, 123(5), 625-631.
191. Kolb, R., & Zhang, W. (2020). Obesity and breast cancer: a case of inflamed adipose tissue. *Cancers*, 12(6), 1686.
192. Kothari, C., Diorio, C., & Durocher, F. (2020). The importance of breast adipose tissue in breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(16), 5760.
193. Koundouros, N., & Poulogiannis, G. (2020). Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *British journal of cancer*, 122(1), 4-22.
194. Kourou, K., Exarchos, K. P., Papaloukas, C., Sakaloglou, P., Exarchos, T., & Fotiadis, D. I. (2021). Applied machine learning in cancer research: A systematic review for patient diagnosis, classification and prognosis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 5546-5555.
195. Kourtidis, A., Srinivasaiah, R., Carkner, R. D., Brosnan, M. J., & Conklin, D. S. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ protects ERBB2-positive breast cancer cells from palmitate toxicity. *Breast cancer research*, 11, 1-11.
196. Koyuturk, M., Ersoz, M., & Altioek, N. (2007). Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells: p53 and estrogen receptor independent pathway requiring signalling through JNK. *Cancer letters*, 250(2), 220-228.
197. Kridel, S. J., Axelrod, F., Rozenkrantz, N., & Smith, J. W. (2004). Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer research*, 64(6), 2070-2075.
198. Krock, B. L., Skuli, N., & Simon, M. C. (2011). Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes & cancer*, 2(12), 1117-1133.
199. Kuhajda, F. P. (2006). Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer research*, 66(12), 5977-5980.
200. Kuhajda, F. P., Jenner, K., Wood, F. D., Hennigar, R. A., Jacobs, L. B., Dick, J. D., & Pasternack, G. R. (1994). Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(14), 6379-6383.
201. Kumar Basniwal, P., & Jain, D. (2012). Simvastatin: review of updates on recent trends in pharmacokinetics, pharmacodynamics, drug-drug interaction, impurities and analytical methods. *Current Pharmaceutical Analysis*, 8(2), 135-156.
202. Kuruppu, A. I., Paranagama, P., & Goonasekara, C. L. (2019). Medicinal plants commonly used against cancer in traditional medicine formulae in Sri Lanka. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(4), 565-573.
203. Lai, J., Chen, B., Zhang, G., Li, X., Mok, H., & Liao, N. (2020). Molecular characterization of breast cancer: a potential novel immune-related lncRNAs signature. *Journal of Translational Medicine*, 18, 1-10.
204. Lai, W. W., Hsu, S. C., Chueh, F. S., Chen, Y. Y., Yang, J. S., Lin, J. P., Lien, J. C., Tsai, C. H., & Chung, J. G. (2013). Quercetin inhibits migration and invasion of SAS human oral cancer cells through inhibition of NF- κ B and matrix metalloproteinase-2/-9 signaling pathways. *Anticancer research*, 33(5), 1941-1950.
205. Lamalice, L., Le Boeuf, F., & Huot, J. (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation research*, 100(6), 782-794.
206. Lashen, A. G., Toss, M. S., Mongan, N. P., Green, A. R., & Rakha, E. A. (2023). The clinical value of progesterone receptor expression in luminal breast cancer: A study of a large cohort with long-term follow-up. *Cancer*, 129(8), 1183-1194.
207. Lee, E. Y., & Muller, W. J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(10), a003236.

208. Lehmann, B. D., Jovanović, B., Chen, X., Estrada, M. V., Johnson, K. N., Shyr, Y., Moses, H. L., Sanders, M. E., & Pietenpol, J. A. (2016). Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection. *PloS one*, 11(6), e0157368.
209. Lennernäs, H., & Fager, G. (1997). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors: similarities and differences. *Clinical pharmacokinetics*, 32, 403-425.
210. Leung, H. W. C., Lin, C. J., Hour, M. J., Yang, W. H., Wang, M. Y., & Lee, H. Z. (2007). Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. *Food and Chemical Toxicology*, 45(10), 2005-2013.
211. Li ShuYuan, L. S., Chang CuiQing, C. C., Ma FuYing, M. F., & Yu ChangLong, Y. C. (2009). Modulating effects of chlorogenic acid on lipids and glucose metabolism and expression of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- α in golden hamsters fed on high fat diet. *Biomedical and environmental sciences : BES*, 22(2), 122-129.
212. Li, J. J., Wang, H., Tino, J. A., Robl, J. A., Herpin, T. F., Lawrence, R. M., ... & Harrity, T. (2007). 2-hydroxy-N-arylbenzenesulfonamides as ATP-citrate lyase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17(11), 3208-3211.
213. Li, X. C., Joshi, A. S., ElSohly, H. N., Khan, S. I., Jacob, M. R., Zhang, Z., Khan, I. A., Ferreira, D., Walker, L. A., Broedel, S. E., Jr, Rauli, R. E., & Cihlar, R. L. (2002). Fatty acid synthase inhibitors from plants: isolation, structure elucidation, and SAR studies. *Journal of natural products*, 65(12), 1909-1914.
214. Li, Y., Fu, J., Yuan, X., & Hu, C. (2014). Simvastatin inhibits the proliferation of A549 lung cancer cells through oxidative stress and up-regulation of SOD2. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(8), 610-614.
215. Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg effect: how does it benefit cancer cells?. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211-218.
216. Ligibel, J. A., Alfano, C. M., Courneya, K. S., Demark-Wahnefried, W., Burger, R. A., Chlebowski, R. T., Fabian, C. J., Gucalp, A., Hershman, D. L., Hudson, M. M., Jones, L. W., Kakarala, M., Ness, K. K., Merrill, J. K., Wollins, D. S., & Hudis, C. A. (2014). American Society of Clinical Oncology position statement on obesity and cancer. *Journal of clinical oncology*, 32(31), 3568.
217. Liou, G. Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research*, 44(5), 479-496.
218. Liu, B., Peng, Q., Wang, Y. W., Qiu, J., Zhu, J., & Ma, R. (2023). Prognostic and clinicopathological significance of fatty acid synthase in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Oncology*, 13, 1153076.
219. Liu, Y., Tang, Z. G., Yang, J. Q., Zhou, Y., Meng, L. H., Wang, H., & Li, C. L. (2017). Low concentration of quercetin antagonizes the invasion and angiogenesis of human glioblastoma U251 cells. *OncoTargets and therapy*, 4023-4028.
220. Llombart-Cussac, A., Cortés, J., Paré, L., Galván, P., Bermejo, B., Martínez, N., Vidal, M., Pernas, S., López, R., Muñoz, M., Nuciforo, P., Morales, S., Oliveira, M., de la Peña, L., Peláez, A., & Prat, A. (2017). HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *The lancet oncology*, 18(4), 545-554.
221. Loh, W. Y. (2023). Logistic regression tree analysis. In *Springer handbook of engineering statistics* (pp. 593-604). London: Springer London.

222. Lohmann, A. E., Soldera, S. V., Pimentel, I., Ribnikar, D., Ennis, M., Amir, E., & Goodwin, P. J. (2021). Association of obesity with breast cancer outcome in relation to cancer subtypes: a meta-analysis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 113(11), 1465-1475.
223. Love, S. M., & Barsky, S. H. (2004). Anatomy of the nipple and breast ducts revisited. *Cancer*, 101(9), 1947-1957.
224. Lu, Y., Qin, T., Li, J. E., Wang, L., Zhang, Q., Jiang, Z., & Mao, J. (2017). MicroRNA-140-5p inhibits invasion and angiogenesis through targeting VEGF-A in breast cancer. *Cancer gene therapy*, 24(9), 386-392.
225. Lugano, R., Ramachandran, M., & Dimberg, A. (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77, 1745-1770.
226. Luo, H., Jiang, B. H., King, S. M., & Chen, Y. C. (2008). Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. *Nutrition and cancer*, 60(6), 800-809.
227. Lupu, R., & Menendez, J. A. (2006). Pharmacological inhibitors of fatty acid synthase (FASN)-catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new family of anti-cancer agents?. *Current pharmaceutical biotechnology*, 7(6), 483-494.
228. Lv, X., Li, J., Zhang, C., Hu, T., Li, S., He, S., Yan, H., Tan, Y., Lei, M., Wen, M., & Zuo, J. (2016). The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. *Genes & diseases*, 4(1), 19-24.
229. MacDonald, J. I., & Dick, F. A. (2012). Posttranslational modifications of the retinoblastoma tumor suppressor protein as determinants of function. *Genes & cancer*, 3(11-12), 619-633.
230. Madu, C. O., Wang, S., Madu, C. O., & Lu, Y. (2020). Angiogenesis in breast cancer progression, diagnosis, and treatment. *Journal of Cancer*, 11(15), 4474.
231. Maier, T., Leibundgut, M., & Ban, N. (2008). The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase. *Science*, 321(5894), 1315-1322.
232. Majumder, A., Sandhu, M., Banerji, D., Steri, V., Olshen, A., & Moasser, M. M. (2021). The role of HER2 and HER3 in HER2-amplified cancers beyond breast cancers. *Scientific reports*, 11(1), 9091.
233. Makkar, H. P. S. (2000). Quantification of tannins in tree foliage. FAO/IAEA Working Document, IAEA, Vienna, Austria.
234. Markham, A. (2020). Bempedoic acid: first approval. *Drugs*, 80(7), 747-753.
235. Masori, M., Jalili, A., & Nakaya, Y. (2010). Disruption of stromal-derived factor-1/chemokine receptor 4 by simvastatin. *International Cardiovascular Research Journal*, 4(1): e67617.
236. Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 378-389.
237. Mayengbam, S. S., Singh, A., Pillai, A. D., & Bhat, M. K. (2021). Influence of cholesterol on cancer progression and therapy. *Translational oncology*, 14(6), 101043.
238. Maynard, M. A., & Ohh, M. (2007). The role of hypoxia-inducible factors in cancer. *Cellular and molecular life sciences*, 64, 2170-2180.
239. McClendon, K. S., Riche, D. M., & Uwaifo, G. I. (2009). Orlistat: current status in clinical therapeutics. *Expert opinion on drug safety*, 8(6), 727-744.
240. Medes, G., Thomas, A., & Weinhouse, S. (1953). Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer research*, 13(1), 27-29.

241. Menendez, J. A. (2010). Fine-tuning the lipogenic/lipolytic balance to optimize the metabolic requirements of cancer cell growth: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(3), 381-391.
242. Menendez, J. A., & Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7(10), 763-777.
243. Menendez, J. A., & Lupu, R. (2017). Fatty acid synthase regulates estrogen receptor- α signaling in breast cancer cells. *Oncogenesis*, 6(2), e299-e299.
244. Menendez, J. A., Vellon, L., & Lupu, R. (2006). The antiobesity drug Orlistat induces cytotoxic effects, suppresses Her-2/neu (erbB-2) oncogene overexpression, and synergistically interacts with trastuzumab (Herceptin™) in chemoresistant ovarian cancer cells. *International Journal of Gynecological Cancer*, 16(1), 219-221.
245. Migita, T., Okabe, S., Ikeda, K., Igarashi, S., Sugawara, S., Tomida, A., Taguchi, R., Soga, T., & Seimiya, H. (2013). Inhibition of ATP citrate lyase induces an anticancer effect via reactive oxygen species: AMPK as a predictive biomarker for therapeutic impact. *The American journal of pathology*, 182(5), 1800-1810.
246. Milutinović, M. G., Maksimović, V. M., Cvetković, D. M., Nikodijević, D. D., Stanković, M. S., Pešić, M., & Marković, S. D. (2019). Potential of *Teucrium chamaedrys* L. to modulate apoptosis and biotransformation in colorectal carcinoma cells. *Journal of ethnopharmacology*, 240, 111951.
247. Mirabelli, P., Coppola, L., & Salvatore, M. (2019). Cancer cell lines are useful model systems for medical research. *Cancers*, 11(8), 1098.
248. Mitra, A. P., Lam, L. L., Ghadessi, M., Erho, N., Vergara, I. A., Alshalalfa, M., Buerki, C., Haddad, Z., Sierocinski, T., Triche, T. J., Skinner, E. C., Davicioni, E., Daneshmand, S., & Black, P. C. (2014). Discovery and validation of novel expression signature for postcystectomy recurrence in high-risk bladder cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(11), dju290.
249. Mitry, R. R., & Hughes, R. D. (Eds.). (2012). *Human cell culture protocols* (p. 435). Totowa, NJ: Humana Press.
250. Moghadasian, M. H. (1999). Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life sciences*, 65(13), 1329-1337.
251. Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in cell & developmental biology*, 80, 50-64.
252. Monaco, M. E. (2017). Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes. *Oncotarget*, 8(17), 29487.
253. Mondal, S., Adhikari, N., Banerjee, S., Amin, S. A., & Jha, T. (2020). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. *European journal of medicinal chemistry*, 194, 112260.
254. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
255. Motoyama, N., & Naka, K. (2004). DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Current opinion in genetics & development*, 14(1), 11-16.
256. Mullen, P. J., Yu, R., Longo, J., Archer, M. C., & Penn, L. Z. (2016). The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(11), 718-731.
257. Munday, M. R. (2002). Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions*, 30(6), 1059-1064.
258. Nakamura, H., & Takada, K. (2021). Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer science*, 112(10), 3945-3952.

259. Nisthul A, A., Retnakumari, A. P., Anto, R. J., & Sadasivan, C. (2018). In silico screening for identification of fatty acid synthase inhibitors and evaluation of their antiproliferative activity using human cancer cell lines. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 38(4), 335-341.
260. Niu, B., Liao, K., Zhou, Y., Wen, T., Quan, G., Pan, X., & Wu, C. (2021). Application of glutathione depletion in cancer therapy: Enhanced ROS-based therapy, ferroptosis, and chemotherapy. *Biomaterials*, 277, 121110.
261. Niu, G., & Chen, X. (2010). Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy. *Current drug targets*, 11(8), 1000-1017.
262. Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 1(3), 1559-1582.
263. Obr, A. E., & Edwards, D. P. (2012). The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 357(1-2), 4-17.
264. Odicino, F., Pecorelli, S., Zigliani, L., & Creasman, W. T. (2008). History of the FIGO cancer staging system. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 101(2), 205-210.
265. Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gómez-Valles, F. O., & Ramírez-Valdespino, C. A. (2022). Subtypes of breast cancer. *Breast Cancer [Internet]*.
266. Osborne, C., Wilson, P., & Tripathy, D. (2004). Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *The oncologist*, 9(4), 361-377.
267. Pandya, S., & Moore, R. G. (2011). Breast development and anatomy. *Clinical obstetrics and gynecology*, 54(1), 91-95.
268. Parasuraman, S., Balamurugan, S., Christopher, P. V., Petchi, R. R., Yeng, W. Y., Sujithra, J., & Vijaya, C. (2015). Evaluation of antidiabetic and antihyperlipidemic effects of hydroalcoholic extract of leaves of *Ocimum tenuiflorum* (Lamiaceae) and prediction of biological activity of its phytoconstituents. *Pharmacognosy research*, 7(2), 156.
269. Park, J. E., Keller, G. A., & Ferrara, N. (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Molecular biology of the cell*, 4(12), 1317-1326.
270. Park, J., Morley, T. S., Kim, M., Clegg, D. J., & Scherer, P. E. (2014). Obesity and cancer--mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nature reviews. Endocrinology*, 10(8), 455-465.
271. Paukner, K., Králová Lesná, I., & Poledne, R. (2022). Cholesterol in the Cell Membrane-An Emerging Player in Atherogenesis. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 533.
272. Pemble IV, C. W., Johnson, L. C., Kridel, S. J., & Lowther, W. T. (2007). Crystal structure of the thioesterase domain of human fatty acid synthase inhibited by Orlistat. *Nature structural & molecular biology*, 14(8), 704-709.
273. Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., & Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Experimental & molecular medicine*, 52(2), 192-203.
274. Pesapane, F., Downey, K., Rotili, A., Cassano, E., & Koh, D. M. (2020). Imaging diagnosis of metastatic breast cancer. *Insights into imaging*, 11, 1-14.
275. Pezzani, R., Salehi, B., Vitalini, S., Iriti, M., Zuñiga, F. A., Sharifi-Rad, J., Martorell, M., & Martins, N. (2019). Synergistic Effects of Plant Derivatives and Conventional

- Chemotherapeutic Agents: An Update on the Cancer Perspective. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(4), 110.
276. Phan, L. M., Yeung, S. C., & Lee, M. H. (2014). Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer biology & medicine*, 11(1), 1–19.
277. Picon-Ruiz, M., Morata-Tarifa, C., Valle-Goffin, J. J., Friedman, E. R., & Slingerland, J. M. (2017). Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA: a cancer journal for clinicians*, 67(5), 378-397.
278. Pine, A. R., Cirigliano, S. M., Nicholson, J. G., Hu, Y., Linkous, A., Miyaguchi, K., Edwards, L., Singhania, R., Schwartz, T. H., Ramakrishna, R., Pisapia, D. J., Snuderl, M., Elemento, O., & Fine, H. A. (2020). Tumor Microenvironment Is Critical for the Maintenance of Cellular States Found in Primary Glioblastomas. *Cancer discovery*, 10(7), 964–979.
279. Pinkosky, S. L., Filippov, S., Srivastava, R. A., Hanselman, J. C., Bradshaw, C. D., Hurley, T. R., Cramer, C. T., Spahr, M. A., Brant, A. F., Houghton, J. L., Baker, C., Naples, M., Adeli, K., & Newton, R. S. (2013). AMP-activated protein kinase and ATP-citrate lyase are two distinct molecular targets for ETC-1002, a novel small molecule regulator of lipid and carbohydrate metabolism [S]. *Journal of lipid research*, 54(1), 134-151.
280. Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (albany NY)*, 8(4), 603.
281. Pollard J. W. (1990). Basic cell culture. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 5, 1–12..
282. Prasad, V., & Mailankody, S. (2017). Research and development spending to bring a single cancer drug to market and revenues after approval. *JAMA internal medicine*, 177(11), 1569-1575.
283. Pratheeshkumar, P., Budhraj, A., Son, Y. O., Wang, X., Zhang, Z., Ding, S., Wang, L., Hitron, A., Lee, J. C., Xu, M., Chen, G., Luo, J., & Shi, X. (2012). Quercetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR-2 regulated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathways. *PloS one*, 7(10), e47516.
284. Pulla, L. S. S., & Begum Ahil, S. (2021). Review on target domains and natural compound-based inhibitors of fatty acid synthase for anticancer drug discovery. *Chemical Biology & Drug Design*, 98(5), 869-884.
285. Qu, L., Wang, Z. L., Chen, Q., Li, Y. M., He, H. W., Hsieh, J. J., Xue, S., Wu, Z. J., Liu, B., Tang, H., Xu, X. F., Xu, F., Wang, J., Bao, Y., Wang, A. B., Wang, D., Yi, X. M., Zhou, Z. K., Shi, C. J., Zhong, K., ... Wang, L. H. (2018). Prognostic value of a long non-coding RNA signature in localized clear cell renal cell carcinoma. *European urology*, 74(6), 756-763.
286. Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J. C., Bailleul, F., & Trotin, F. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of ethnopharmacology*, 72(1-2), 35-42.
287. Quinn, B. J., Kitagawa, H., Memmott, R. M., Gills, J. J., & Dennis, P. A. (2013). Repositioning metformin for cancer prevention and treatment. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(9), 469-480.
288. Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., Baehner, F., Dabbs, D. J., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Richardson, A. L., Schnitt, S. J., Schmitt, F. C., Tan, P. H., Tse, G. M., Badve, S., & Ellis, I. O. (2010).

- Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast cancer research*, 12, 1-12.
289. Ren, Q., Cheng, H., & Han, H. (2017, March). Research on machine learning framework based on random forest algorithm. In *AIP conference proceedings* (Vol. 1820, No. 1). AIP Publishing.
290. Resh, M. D. (2006). Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nature chemical biology*, 2(11), 584-590.
291. Rezano, A., Ridhayanti, F., Rangkuti, A. R., Gunawan, T., Winarno, G. N. A., & Wijaya, I. (2021). Cytotoxicity of simvastatin in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 22(S1), 33-42.
292. Rhee, S. G., Chang, T. S., Jeong, W., & Kang, D. (2010). Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Molecules and cells*, 29, 539-549.
293. Righetti, A., Giulietti, M., Šabanović, B., Occhipinti, G., Principato, G., & Piva, F. (2019). CXCL12 and its isoforms: different roles in pancreatic cancer?. *Journal of Oncology*, 2019(1), 9681698.
294. Rocca, A., Farolfi, A., Maltoni, R., Carretta, E., Melegari, E., Ferrario, C., Ceconetto, L., Sarti, S., Schirone, A., Fedeli, A., Andreis, D., Pietri, E., Ibrahim, T., Montalto, E., & Amadori, D. (2015). Efficacy of endocrine therapy in relation to progesterone receptor and Ki67 expression in advanced breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 152, 57-65.
295. Rodrigues, R., Duarte, D., & Vale, N. (2022). Drug repurposing in cancer therapy: influence of patient's genetic background in breast cancer treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4280.
296. Röhrig, F., & Schulze, A. (2016). The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nature reviews cancer*, 16(11), 732-749.
297. Rosen, R. D., & Sapra, A. (2023). TNM classification. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
298. Russo, J., & Russo, I. H. (2004). Development of the human breast. *Maturitas*, 49(1), 2-15.
299. Russo, J., Romero, A. L., & Russo, I. H. (1994). Architectural pattern of the normal and cancerous breast under the influence of parity. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 3(3), 219-224.
300. Saha, S., Dey, S., & Nath, S. (2021). Steroid hormone receptors: links with cell cycle machinery and breast cancer progression. *Frontiers in oncology*, 11, 620214.
301. Sak K. (2014). Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacognosy reviews*, 8(16), 122-146.
302. Saleh, A., ElFayoumi, H. M., Youns, M., & Barakat, W. (2019). Rutin and orlistat produce antitumor effects via antioxidant and apoptotic actions. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 392, 165-175.
303. Samson, F. P., He, W., Sripathi, S. R., Patrick, A. T., Madu, J., Chung, H., Frost, M. C., Jee, D., Gutsaeva, D. R., & Jahng, W. J. (2020). Dual switch mechanism of erythropoietin as an antiapoptotic and pro-angiogenic determinant in the retina. *ACS omega*, 5(33), 21113-21126.
304. Sankaranarayananpillai, M., Zhang, N., Baggerly, K. A., & Gelovani, J. G. (2013). Metabolic shifts induced by fatty acid synthase inhibitor orlistat in non-small cell lung carcinoma cells provide novel pharmacodynamic biomarkers for positron

- emission tomography and magnetic resonance spectroscopy. *Molecular Imaging and Biology*, 15, 136-147.
305. Sarmiento-Salinas, F. L., Perez-Gonzalez, A., Acosta-Casique, A., Ix-Ballote, A., Diaz, A., Treviño, S., Rosas-Murrieta, N. H., Millán-Perez-Peña, L., & Maycotte, P. (2021). Reactive oxygen species: Role in carcinogenesis, cancer cell signaling and tumor progression. *Life Sciences*, 284, 119942.
306. Sato, R., Okamoto, A., Inoue, J., Miyamoto, W., Sakai, Y., Emoto, N., Shimano, H., & Maeda, M. (2000). Transcriptional regulation of the ATP citrate-lyase gene by sterol regulatory element-binding proteins. *Journal of biological chemistry*, 275(17), 12497-12502.
307. Schcolnik-Cabrera, A., Chávez-Blanco, A., Domínguez-Gómez, G., Taja-Chayeb, L., Morales-Barcenas, R., Trejo-Becerril, C., Perez-Cardenas, E., Gonzalez-Fierro, A., & Dueñas-González, A. (2018). Orlistat as a FASN inhibitor and multitargeted agent for cancer therapy. *Expert opinion on investigational drugs*, 27(5), 475-489.
308. Segeritz, C. P., & Vallier, L. (2017). Cell culture: Growing cells as model systems in vitro. In *Basic science methods for clinical researchers* (pp. 151-172). Academic Press.
309. Seguin, F., Carvalho, M. A., Bastos, D. C., Agostini, M., Zecchin, K. G., Alvarez-Flores, M. P., Chudzinski-Tavassi, A. M., Coletta, R. D., & Graner, E. (2012). The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces experimental metastases and angiogenesis in B16-F10 melanomas. *British journal of cancer*, 107(6), 977-987.
310. Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Current opinion in genetics & development*, 8(5), 588-594.
311. Semenza, G. L. (2001). HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current opinion in cell biology*, 13(2), 167-171.
312. Shen, Y. Y., Yuan, Y., Du, Y. Y., & Pan, Y. Y. (2015). Molecular mechanism underlying the anticancer effect of simvastatin on MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Molecular medicine reports*, 12(1), 623-630.
313. Shen, Y., Volrath, S. L., Weatherly, S. C., Elich, T. D., & Tong, L. (2004). A mechanism for the potent inhibition of eukaryotic acetyl-coenzyme A carboxylase by soraphen A, a macrocyclic polyketide natural product. *Molecular cell*, 16(6), 881-891.
314. Shi, X., Yang, J., Deng, S., Xu, H., Wu, D., Zeng, Q., Wang, S., Hu, T., Wu, F., & Zhou, H. (2022). TGF- β signaling in the tumor metabolic microenvironment and targeted therapies. *Journal of Hematology & Oncology*, 15(1), 135.
315. Shi, Y., Riese, D. J., & Shen, J. (2020). The role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis in cancer. *Frontiers in pharmacology*, 11, 574667.
316. Shiino, S., Ball, G., Syed, B. M., Kurozumi, S., Green, A. R., Tsuda, H., Takayama, S., Suto, A., & Rakha, E. A. (2022). Prognostic significance of receptor expression discordance between primary and recurrent breast cancers: a meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 1-14.
317. Shiovitz, S., & Korde, L. A. (2015). Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of Oncology*, 26(7), 1291-1299.
318. Shu, X., & Ye, Y. (2023). Knowledge Discovery: Methods from data mining and machine learning. *Social Science Research*, 110, 102817.
319. Siddiqui, A. J., Jahan, S., Singh, R., Saxena, J., Ashraf, S. A., Khan, A., Choudhary, R. K., Balakrishnan, S., Badraoui, R., Bardakci, F., & Adnan, M. (2022). Plants in anticancer drug discovery: from molecular mechanism to chemoprevention. *BioMed Research International*, 2022(1), 5425485.

320. Sies, H. (2021). Oxidative eustress: On constant alert for redox homeostasis. *Redox Biology*, 41, 101867.
321. Sledge Jr, G. W., & Miller, K. D. (2003). Exploiting the hallmarks of cancer: the future conquest of breast cancer. *European Journal of Cancer*, 39(12), 1668-1675.
322. Sokolov, D. I., Lvova, T. Y., Okorokova, L. S., Belyakova, K. L., Sheveleva, A. R., Stepanova, O. I., Mikhailova, V. A., & Sel'kov, S. A. (2017). Effect of cytokines on the formation tube-like structures by endothelial cells in the presence of trophoblast cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 163(1), 148-158.
323. Sopik, V., & Narod, S. A. (2018). The relationship between tumour size, nodal status and distant metastases: on the origins of breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 170, 647-656.
324. Sternlicht, M. D., Kouros-Mehr, H., Lu, P., & Werb, Z. (2006). Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation*, 74(7), 365-381.
325. Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., & Peng, Z. Y. (2019). Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019(1), 5080843.
326. Sun, W., Shahrajabian, M. H., & Cheng, Q. (2021). Natural dietary and medicinal plants with anti-obesity therapeutics activities for treatment and prevention of obesity during lock down and in post-COVID-19 era. *Applied Sciences*, 11(17), 7889.
327. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
328. Svensson, R. U., Parker, S. J., Eichner, L. J., Kolar, M. J., Wallace, M., Brun, S. N., Lombardo, P. S., Van Nostrand, J. L., Hutchins, A., Vera, L., Gerken, L., Greenwood, J., Bhat, S., Harriman, G., Westlin, W. F., Harwood, H. J., Jr, Saghatelian, A., Kapeller, R., Metallo, C. M., & Shaw, R. J. (2016). Inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses fatty acid synthesis and tumor growth of non-small-cell lung cancer in preclinical models. *Nature medicine*, 22(10), 1108-1119.
329. Teoh, E. S., & Teoh, E. S. (2016). Secondary metabolites of plants. *Medicinal orchids of Asia*, 59-73.
330. Teskey, G., Abraham, R., Cao, R., Gyurjian, K., Islamoglu, H., Lucero, M., Martinez, A., Paredes, E., Salaiz, O., Robinson, B., & Venketaraman, V. (2018). Glutathione as a marker for human disease. *Advances in clinical chemistry*, 87, 141-159.
331. Tong, L., Chuang, C. C., Wu, S., & Zuo, L. (2015). Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer letters*, 367(1), 18-25.
332. Torres, R. G., Casanova, L., Carvalho, J., Marcondes, M. C., Costa, S. S., Sola-Penna, M., & Zancan, P. (2018). Ocimum basilicum but not Ocimum gratissimum present cytotoxic effects on human breast cancer cell line MCF-7, inducing apoptosis and triggering mTOR/Akt/p70S6K pathway. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 50, 93-105.
333. Touyz, R. M., Lang, N. N., Herrmann, J., Van Den Meiracker, A. H., & Danser, A. J. (2017). Recent advances in hypertension and cardiovascular toxicities with vascular endothelial growth factor inhibition. *Hypertension*, 70(2), 220-226.
334. Trabert, B., Sherman, M. E., Kannan, N., & Stanczyk, F. Z. (2020). Progesterone and breast cancer. *Endocrine reviews*, 41(2), 320-344.
335. Tsang, J. Y., & Gary, M. T. (2020). Molecular classification of breast cancer. *Advances in anatomic pathology*, 27(1), 27-35.

336. Tutin, T. G. (Ed.). (1993). *Flora Europaea: Psilotaceae to Platanaceae* (Vol. 1). Cambridge University Press.
337. Tyan, Y. S., Lee, Y. P., Chuang, H. Y., Wang, W. H., & Hwang, J. J. (2021). Effects of orlistat combined with enzalutamide and castration through inhibition of fatty acid synthase in a PC3 tumor-bearing mouse model. *Bioscience Reports*, 41(5), BSR20204203.
338. Ungefroren, H., Gieseler, F., Fliedner, S., & Lehnert, H. (2015). Obesity and cancer. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 21(1), 5-15.
339. Ushio-Fukai, M., & Nakamura, Y. (2008). Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer letters*, 266(1), 37-52.
340. Valsalakumari, R., Yadava, S. K., Szwed, M., Pandya, A. D., Mælandsmo, G. M., Torgersen, M. L., Iversen, T. G., Skotland, T., Sandvig, K., & Giri, J. (2021). Mechanism of cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel loaded lipid nanocapsules in breast cancer cells. *International journal of pharmaceutics*, 597, 120217.
341. Van Dooijeweert, C., Van Diest, P. J., & Ellis, I. O. (2022). Grading of invasive breast carcinoma: the way forward. *Virchows Archiv*, 480(1), 33-43.
342. van Hinsbergh, V. W., Engelse, M. A., & Quax, P. H. (2006). Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(4), 716-728.
343. Van Loenhout, J., Peeters, M., Bogaerts, A., Smits, E., & Deben, C. (2020). Oxidative stress-inducing anticancer therapies: Taking a closer look at their immunomodulating effects. *Antioxidants*, 9(12), 1188.
344. Vazquez-Martin, A., Colomer, R., Brunet, J., Lupu, R., & Menendez, J. A. (2008). Overexpression of fatty acid synthase gene activates HER1/HER2 tyrosine kinase receptors in human breast epithelial cells. *Cell proliferation*, 41(1), 59-85.
345. Ventura, R., Mordec, K., Waszczuk, J., Wang, Z., Lai, J., Fridlib, M., Buckley, D., Kemble, G., & Heuer, T. S. (2015). Inhibition of de novo palmitate synthesis by fatty acid synthase induces apoptosis in tumor cells by remodeling cell membranes, inhibiting signaling pathways, and reprogramming gene expression. *EBioMedicine*, 2(8), 808-824.
346. Verschraegen, C., Vinh-Hung, V., Cserni, G., Gordon, R., Royce, M. E., Vlastos, G., Tai, P., & Storme, G. (2005). Modeling the effect of tumor size in early breast cancer. *Annals of Surgery*, 241(2), 309-318.
347. Villalpando-Rodriguez, G. E., & Gibson, S. B. (2021). Reactive oxygen species (ROS) regulates different types of cell death by acting as a rheostat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021(1), 9912436.
348. Vu, H. T., Hoang, T. X., & Kim, J. Y. (2018). All-Trans Retinoic Acid Enhances Matrix Metalloproteinase 2 Expression and Secretion in Human Myeloid Leukemia THP-1 Cells. *BioMed Research International*, 2018(1), 5971080.
349. Wakil, S. J., & Abu-Elheiga, L. A. (2009). Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *Journal of lipid research*, 50, S138-S143.
350. Walsh, T., & King, M. C. (2007). Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer cell*, 11(2), 103-105.
351. Wang, D., Yin, L., Wei, J., Yang, Z., & Jiang, G. (2017). ATP citrate lyase is increased in human breast cancer, depletion of which promotes apoptosis. *Tumor Biology*, 39(4), 1010428317698338.
352. Wang, J. C., Li, X. X., Sun, X., Li, G. Y., Sun, J. L., Ye, Y. P., Cong, L. L., Li, W. M., Lu, S. Y., Feng, J., & Liu, P. J. (2018). Activation of AMPK by simvastatin

- inhibited breast tumor angiogenesis via impeding HIF-1 α -induced pro-angiogenic factor. *Cancer Science*, 109(5), 1627-1637.
353. Wang, P., Hou, T., Xu, F., Luo, F., Zhou, H., Liu, F., Xie, X., Liu, Y., Wang, J., Guo, Z., & Liang, X. (2022). Discovery of flavonoids as novel inhibitors of ATP citrate lyase: structure–activity relationship and inhibition profiles. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10747.
354. Wang, X., Hui, T. L., Wang, M. Q., Liu, H., Li, R. Y., & Song, Z. C. (2019). Body mass index at diagnosis as a prognostic factor for early-stage invasive breast cancer after surgical resection. *Oncology Research and treatment*, 42(4), 190-196.
355. Wang, Y. Y., Kuhajda, F. P., Li, J. N., Pizer, E. S., Han, W. F., Sokoll, L. J., & Chan, D. W. (2001). Fatty acid synthase (FAS) expression in human breast cancer cell culture supernatants and in breast cancer patients. *Cancer letters*, 167(1), 99-104.
356. Wang, Y., Ren, F., Li, B., Song, Z., Chen, P., & Ouyang, L. (2019). Ellagic acid exerts antitumor effects via the PI3K signaling pathway in endometrial cancer. *Journal of Cancer*, 10(15), 3303.
357. Watson, J. A., Fang, M., & Lowenstein, J. M. (1969). Tricarballoylate and hydroxycitrate: Substrate and inhibitor of ATP: Citrate oxaloacetate lyase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 135, 209-217.
358. Webb, S. (2018). Deep learning for biology. *Nature*, 554(7693), 555-557.
359. Wei, J., & Tong, L. (2015). Crystal structure of the 500-kDa yeast acetyl-CoA carboxylase holoenzyme dimer. *Nature*, 526(7575), 723-727.
360. Wei, J., Leit, S., Kuai, J., Therrien, E., Rafi, S., Harwood, H. J., Jr, DeLaBarre, B., & Tong, L. (2019). An allosteric mechanism for potent inhibition of human ATP-citrate lyase. *Nature*, 568(7753), 566-570.
361. Wei, X., Schultz, K., Bazilevsky, G. A., Vogt, A., & Marmorstein, R. (2020). Molecular basis for acetyl-CoA production by ATP-citrate lyase. *Nature structural & molecular biology*, 27(1), 33-41.
362. Wen, J., Min, X., Shen, M., Hua, Q., Han, Y., Zhao, L., Liu, L., Huang, G., Liu, J., & Zhao, X. (2019). ACLY facilitates colon cancer cell metastasis by CTNNB1. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38, 1-12.
363. Wen, J., Wang, G., Xie, X., Lin, G., Yang, H., Luo, K., Liu, Q., Ling, Y., Xie, X., Lin, P., Chen, Y., Zhang, H., Rong, T., & Fu, J. (2021). Prognostic value of a four-miRNA signature in patients with lymph node positive locoregional esophageal squamous cell carcinoma undergoing complete surgical resection. *Annals of Surgery*, 273(3), 523-531.
364. Williams, L. A., Hoadley, K. A., Nichols, H. B., Geradts, J., Perou, C. M., Love, M. I., Olshan, A. F., & Troester, M. A. (2019). Differences in race, molecular and tumor characteristics among women diagnosed with invasive ductal and lobular breast carcinomas. *Cancer Causes & Control*, 30, 31-39.
365. Wilson, N., Ironside, A., Diana, A., & Oikonomidou, O. (2021). Lobular breast cancer: a review. *Frontiers in Oncology*, 10, 591399.
366. Wright, C., Iyer, A. K. V., Kaushik, V., & Azad, N. (2017). Anti-tumorigenic potential of a novel Orlistat-AICAR combination in prostate cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*, 118(11), 3834-3845.
367. Wu, Y., & Sahin, A. A. (2016). Prognostic and predictive factors of invasive breast cancer. *Breast Disease: Diagnosis and Pathology*, 187-206.
368. Wysham, W. Z., Roque, D. R., Han, J., Zhang, L., Guo, H., Gehrig, P. A., Zhou, C., & Bae-Jump, V. L. (2016). Effects of fatty acid synthase inhibition by orlistat on proliferation of endometrial cancer cell lines. *Targeted oncology*, 11, 763-769.

369. Xu, S., Chen, T., Dong, L., Li, T., Xue, H., Gao, B., Ding, X., Wang, H., & Li, H. (2021). Fatty acid synthase promotes breast cancer metastasis by mediating changes in fatty acid metabolism. *Oncology letters*, 21(1), 1-1.
370. Yam, C., Mani, S. A., & Moulder, S. L. (2017). Targeting the molecular subtypes of triple negative breast cancer: understanding the diversity to progress the field. *The oncologist*, 22(9), 1086-1093.
371. Yamazaki, Y., & Morita, T. (2006). Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Molecular diversity*, 10, 515-527.
372. Yang, H., Villani, R. M., Wang, H., Simpson, M. J., Roberts, M. S., Tang, M., & Liang, X. (2018). The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37, 1-10.
373. Yang, Y., Karakhanova, S., Hartwig, W., D'Haese, J. G., Philippov, P. P., Werner, J., & Bazhin, A. V. (2016). Mitochondria and mitochondrial ROS in cancer: novel targets for anticancer therapy. *Journal of cellular physiology*, 231(12), 2570-2581.
374. Yanovski, S. Z., & Yanovski, J. A. (2014). Long-term drug treatment for obesity: a systematic and clinical review. *Jama*, 311(1), 74-86.
375. Yip, C. H., & Rhodes, A. (2014). Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Future oncology*, 10(14), 2293-2301.
376. Yoo, D., Jung, E., Noh, J., Hyun, H., Seon, S., Hong, S., Kim, D., & Lee, D. (2019). Glutathione-depleting pro-oxidant as a selective anticancer therapeutic agent. *ACS omega*, 4(6), 10070-10077.
377. Yu, X., Mi, S., Ye, J., & Lou, G. (2021). Aberrant lipid metabolism in cancer cells and tumor microenvironment: the player rather than bystander in cancer progression and metastasis. *Journal of Cancer*, 12(24), 7498.
378. Yu, Z. H. O. U., Han-Bo, C. A. O., Wen-Jun, L. I., & Li, Z. H. A. O. (2018). The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 chemokine axis: Oncogenic properties, molecular targeting, and synthetic and natural product CXCR4 inhibitors for cancer therapy. *Chinese journal of natural medicines*, 16(11), 801-810.
379. Yulian, E. D., Bustami, A., Dosan, R., Tantry, H. P., & Rizanti, F. (2017). Simvastatin inhibits human breast cancer migration through Rho/Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase signaling. *Advanced Science Letters*, 23(7), 6789-6794.
380. Yung, R. L., & Ligibel, J. A. (2016). Obesity and breast cancer: risk, outcomes, and future considerations. *Clin Adv Hematol Oncol*, 14(10), 790-797.
381. Zaidi, N., Swinnen, J. V., & Smans, K. (2012). ATP-citrate lyase: a key player in cancer metabolism. *Cancer research*, 72(15), 3709-3714.
382. Zeni, A. L. B., Moreira, T. D., Dalmagro, A. P., Camargo, A., Bini, L. A., Simionatto, E. L., & Scharf, D. R. (2017). Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89, 2805-2815.
383. Zhang, J., Cui, Q., Zhao, Y., Guo, R., Zhan, C., Jiang, P., Luan, P., Zhang, P., Wang, F., Yang, L., Yang, X., & Xu, Y. (2020). Mechanism of angiogenesis promotion with Shexiang Baoxin Pills by regulating function and signaling pathway of endothelial cells through macrophages. *Atherosclerosis*, 292, 99-111.
384. Zhang, W., Huang, J., Tang, Y., Yang, Y., & Hu, H. (2020). Inhibition of fatty acid synthase (FASN) affects the proliferation and apoptosis of HepG2 hepatoma carcinoma cells via the β -catenin/C-myc signaling pathway. *Annals of Hepatology*, 19(4), 411-416.
385. Zhang, Z. (2016). Introduction to machine learning: k-nearest neighbors. *Annals of translational medicine*, 4(11).

386. Zhao, H., Guo, L., Zhao, H., Zhao, J., Weng, H., & Zhao, B. (2015). CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget*, 6(7), 5022.
387. Zhao, Q., Lin, X., & Wang, G. (2022). Targeting SREBP-1-mediated lipogenesis as potential strategies for cancer. *Frontiers in oncology*, 12, 952371.
388. Zhong, S., Zhang, X., Chen, L., Ma, T., Tang, J., & Zhao, J. (2015). Statin use and mortality in cancer patients: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer treatment reviews*, 41(6), 554-567.
389. Zhou, W., Han, W. F., Landree, L. E., Thupari, J. N., Pinn, M. L., Bililign, T., Kim, E. K., Vadlamudi, A., Medghalchi, S. M., El Meskini, R., Ronnett, G. V., Townsend, C. A., & Kuhajda, F. P. (2007). Fatty acid synthase inhibition activates AMP-activated protein kinase in SKOV3 human ovarian cancer cells. *Cancer research*, 67(7), 2964-2971.
390. Zhu, X., Tian, X., Sun, T., Yu, C., Cao, Y., Yan, T., Shen, C., Lin, Y., Fang, J. Y., Hong, J., & Chen, H. (2018). GeneExpressScore signature: a robust prognostic and predictive classifier in gastric cancer. *Molecular oncology*, 12(11), 1871-1883.
391. Ziegler, A., & König, I. R. (2014). Mining data with random forests: current options for real-world applications. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Data Mining and Knowledge Discovery*, 4(1), 55-63.
392. Zielińska, K. A., & Katanaev, V. L. (2020). The signaling duo CXCL12 and CXCR4: chemokine fuel for breast cancer tumorigenesis. *Cancers*, 12(10), 3071.
393. Ziello, J. E., Jovin, I. S., & Huang, Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *The Yale journal of biology and medicine*, 80(2), 51.
394. Zu, X. Y., Zhang, Q. H., Liu, J. H., Cao, R. X., Zhong, J., Yi, G. H., Quan, Z. H., & Pizzorno, G. (2012). ATP citrate lyase inhibitors as novel cancer therapeutic agents. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 7(2), 154-167.

БИОГРАФИЈА

Јована В. Јованкић је рођена 09.02.1992. године у Аранђеловцу. Основно образовање је стекла у Аранђеловцу а средњу медицинску школу „Сестре Нинковић“, завршила је 2011. године у Крагујевцу. Исте године уписала је Природно-математички факултет у Крагујевцу, смер Биологија. Основне академске студије биологије завршила је 2015. године. Школске 2015/2016. године уписала је мастер студије биологије на истом факултету. Одбраном завршног рада под називом „Молекуларни механизми редокс статуса здравих (MRC-5) и канцерозних (MDA-MB-231) ћелијских линија у антитуморском деловању екстракта инвазивних врста биљака (*Robinia pseudoacacia* L. и *Amorpha fruticosa* L.)“, 2016. године, завршила је мастер студије. Укупна просечна оцена током основних и мастер академских студија била је 9.12. Докторске академске студије Биологије на Природно-математичком факултету уписала је школске 2016/2017. године. У звање истраживач-приправник у Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу изабрана је 25.04.2018. године, а у звање истраживач-сарадник изабрана је 12.05.2021. године. Била је стипендиста Министарства за просвету, науку и технолошки развој из области Биотехнологија на пројекту „Преклиничка испитивања биоактивних супстанци“ (ИИИ41010) у периоду 2017-2019 године. Током протеклих година била је укључена у реализацију практичне наставе на основним и мастер академским студијама на предметима Хематологија, Основи биотехнологије и Молекуларна биологија и физиологија матичних ћелија. У току научно-истраживачког рада објавила је 9 научних радова у међународним часописима (SCI листа), 2 рада у националним часописима, 17 саопштења на међународним и 7 саопштења на конференцијама од националног значаја, што укупно чини 35 библиографских јединица.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

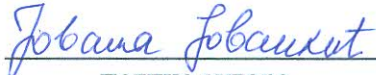
„Аберантни метаболизам масних киселина као важан прогностички маркер код карцинома дојке”

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,

У Крагујевцу, 20. 06. 2024. године,


потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

**„Аберантни метаболизам масних киселина као важан прогностички маркер код
карцинома дојке”**

истоветне.

У Крагујевцу, 20. 06. 2024. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јована В. Јованкић,

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Аберантни метаболизам масних киселина као важан прогностички маркер код карцинома дојке”

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 дозвољавам¹

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

¹ 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.

- 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 прерада²

У Крагујевцу, 20. 06. 2024. године,


потпис аутора

² 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/>