



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Амра С. Рамовић Хамзагић

**Анализа предикције матичности
карцинома дојке и колоне у третману
хемиотерапеутицима применом алата
математичког моделирања**

докторска дисертација

Крагујевац, 2024.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Amra S. Ramović Hamzagić

**Analiza predikcije matičnosti karcinoma
dojke i kolona u tretmanu
hemioterapeuticima primenom alata
matematičkog modeliranja**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2024.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC

Faculty of Medical Sciences

Amra S. Ramović Hamzagić

**Analysis of prediction of breast and colon
cancer stemness in the treatment of
chemoterapeutic agents using
mathematical modeling tools**

doctoral dissertation

Kragujevac, 2024.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Амра Рамовић Хамзагић
Датум и место рођења: 15.03.1993. године, Београд
Садашње запослење: Шеф центра за генетику и молекуларну дијагностику у Новом Пазару, Поликлиника Рамовић
Докторска дисертација
Наслов: Анализа предикције матичности карцинома дојке и колоне у третману хемиотерапеутицима применом алата математичког моделирања
Број страница: 79
Број слика: табеле: 3, фигура 32
Број библиографских података: 96
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука у Крагујевцу- Лабораторија 34, Институт за информационе технологије Крагујевац
Научна област (УДК): генетика
Ментор: Проф. др Биљана Љујић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу Коментор: др Марко Живановић, виши научни сарадник, Институт за информационе технологије, Универзитета у Крагујевцу
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације:

IDENTIFIKACIONA STRANICA DOKTORSKE DISERTACIJE

Autor
Ime i prezime: Amra Ramović Hamzagić
Datum i mesto rođenja: 15.03.1993. godine, Beograd
Sadašnje zaposlenje: Šef centra za genetiku i molekularnu dijagnostiku u Novom Pazaru, Poliklinika Ramović
Doktorska disertacija
Naslov: Analiza predikcije matičnosti karcinoma dojke i kolona u tretmanu hemioterapeuticima primenom alata matematičkog modeliranja
Broj stranica: 79
Broj slika: tabele 3, figura 32
Broj bibliografskih podataka: 96
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka u Kragujevcu – Laboratorija 34, Institut za informacione tehnologije Kragujevac
Naučna oblast (UDK): genetika
Mentor: Prof. dr Biljana Ljujić, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu Komentor: Dr Marko Živanović, viši naučni saradnik, Institut za informacione tehnologije, Univerziteta u Kragujevcu
Broj i datum odluke Veća univerziteta o prihvatanju teme doktorske disertacije:

DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

Author
Name and surname: Amra Ramovic Hamzagic
Date and place of birth: 15.03.1993., Belgrade
Current employment: : CEO of center for genetic and molecular diagnostics in Novi Pazar
Doctoral Dissertation
Title: Analysis of prediction of breast and colon cancer stemness in the treatment of chemoterapeutic agents using mathematical modeling tools
No. of pages: 79
No. of images: tables 3, figures 32
No. of bibliographic data: 96
Institution and place of work: Faculty of medical sciences in Kragujevac – laboratory 34, Institute for information technologies in Kragujevac
Scientific area (UDK): genetics
Mentor: Prof. dr Biljana Ljujić, full prof. Faculty of medical sciences, University of Kragujevac Co-mentor: Dr Marko Živanović, senior research associate, Institute for informational technology, University of Kragujevac
Topic Application Date:
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic:

САЖЕТАК

Увод: Комплексна туморска микросредина са хетерогеним врстама ћелија представља бројне изазове у терапијском приступу јер и након хемиотерапије, канцерске матичне ћелије CSCс остају вијабилне и поново могу индуковати настанак тумора и метастаза. Због наведеног, детаљна анализа туморске микросредине и идентификација *драјвер маркера* и ћелија са различитим фенотипом је неопходна.

Циљ: Основни циљ овог истраживања је детекција маркера који учествују у терапијском исходу и идентификација нокси (полиестиренска нанопластика) које доприносе развоју тумора.

Материјал и методе: Маркери резистенције и малигности који су били испитивани су: CD24, CD44, ABCG2 и ALDH1. Обухваћена је анализа 24 различите комбинације ових маркера као и испитивање утицаја 5-флуороурацила, леуковорина, иринотекана, оксалиплатине и полиестиренске нанопластике на моделу ћелијских линија канцера колона (HCT-116) и дојке (MDA-MB-231). Математичка анализа омогућила нам је бољу карактеризацију малигног фенотипа.

Резултати: Утицај хемиотерапеутика и нанопластике на излечење, настанак и прогресију тумора, представљају најзначајнији допринос овог истраживања. Степен малигности одређиван је на основу заступљености популације CSC, која је дефинисана експресијом маркера матичности методама проточне цитометрије и qRT-PCR. У процени вијабилности користили смо *in vitro* методе (MTT и RTCA).

Закључак: Резултати овог истраживања по први пут показују да су испитиване линије карцинома хетерогена популација туморских ћелија које садрже и CSC. Такође да конвенционални хемиотерапеутици могу да помогну али могу и да промовишу пролиферацију CSC. Полиестиренска нанопластика представља значајну ноксу у настанку малигног фенотипа. Имплементација математичког моделирања представља важан фактор у разумевању тумора и избору терапије.

Кључне речи: Канцерске матичне ћелије, математичко моделирање, хемиотерапеутици, полиестиренска нанопластика

ABSTRACT

Introduction: The complex tumor microenvironment with heterogeneous cell types poses challenges in the therapy because even after chemotherapy, CSC remain viable and can again induce tumor formation and metastasis. Therefore, a detailed analysis of the tumor microenvironment, driver markers and cells with different phenotypes are crucial.

Aim: The main objective of this study was the detection of markers that participate in the therapeutic outcome and the identification of noxi that contribute to tumor growth and development.

Material and methods: Markers of resistance to chemotherapeutic drugs and malignancy were CD24, CD44, ABCG2 and ALDH1. Study included anylysis of 24 marker combinations and effects of 5-fluorouracil, leucovorin, irinotecan, oxaliplatin and polyester nanoplastics in a model of colon (HCT-116) and breast cancer cell lines (MDA-MB-231). Mathematical analysis allowed us to better characterize the malignant phenotype.

Results: The impact of chemotherapeutics and nanoplastics on the cure, formation and progression of tumors represent the most significant contribution of this research. The degree of malignancy was determined on the presence of the CSC population, which was defined by the expression of stem markers by flow cytometry and qRT-PCR methods. Viability was evaluated using *in vitro* methods (MTT and RTCA).

Conclusion: Our results showed for the first time that the examined cancer lines are a heterogeneous population of tumor cells that also contain CSCs. Conventional chemotherapeutic agents can help, but also promote the proliferation of CSCs. Polystyrene nanoplastics represent a significant factor in the formation of a malignant phenotype. The implementation of mathematical modeling is an important tool in understanding tumors and choosing a therapy.

Key words: Cancer stem cells, mathematical modeling, chemotherapeutic agent, polystyrene nanoplastics

ЗАХВАЛНИЦА

Неизмерну захвалност поклањам менторки проф. Биљани Љујић, због помоћи, несебичног залагања, одличном менторству и подршци током читавог процеса и израде докторске дисертације.

Захваљујем се својој породици, оцу, мајци, сестри, супругу и својим ћеркама које су са својим малим годинама показале велико стрпљење, љубав и разумевање.

Мина, Диа, ову докторску дисертацију посвећујем вама, јер су знање, рад и дисциплина неке од темељних вредности наше породице.

САДРЖАЈ

1. УВОД	2
1.1. Туморско микроокружење.....	2
1.2. Карцином дојке	6
1.2.1. Маркери матичних ћелија тумора дојке.....	8
1.3. Карцином дебелог црева.....	8
1.3.1. Маркери матичних ћелија тумора дебелог црева	10
1.4. Канцерске матичне ћелије (CSCs).....	11
1.4.1. Први модел „Clonal evolution” модел настанка тумора	12
1.4.2. Други модел; <i>Cancer stem cells</i> (CSC) модел настанка тумора	13
1.4.3. Значај микрооколине (нише) канцерских матичних ћелија	15
1.4.4. Мрежа цитокина.....	15
1.5. Конвенционални тестови у испитивању ефикасности антитуморских лекова	16
1.6. Математички модел туморске прогресије	17
1.7. Полистиренска микро- и нано пластика	18
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ	24
2.1. ЦИЉЕВИ.....	24
2.2. ХИПОТЕЗЕ	24
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	26
3.1. Ћелијске културе	26
3.2. Хемиотерапеутици.....	27
3.3. Третман ћелијских култура честицама полистирена.....	27
3.4. Одређивање експресије различитих површинских маркер матичних ћелија рака (CSC) проточном цитометријом (eng. Flow Cytometry Analysis).....	28
3.5. Одређивање ћелијске вијабилности у реалном времену – RTCA (eng. Real Time Cell Analises)	28
3.6. Квантитативна реакција ланчане полимеризације у реалном времену (eng. QuantitativeReal-time PCR, qRT-PCR)	29
3.6.1. Изолација РНК	29
3.6.2. Реверзна Транскрипција РНК у комплементарну ДНК (RT-PCR).....	30
3.6.3. Квантитативна реакција ланчане полимеризације у реалном времену (eng. QuantitativeReal-time PCR, qRT-PCR).....	30
3.7. Математички модел туморске прогресије. Модел машинског учења (ML) генетски алгоритам (GA).....	31
3.8. Статистичка анализа.....	33
4. РЕЗУЛТАТИ.....	35

4.1. Маркери CSC анализирани проточном цитометријом	35
4.1.1. Маркери CSC анализирани проточном цитометријом код ћелија третираних PSNP	43
4.2. Одређивање ћелијске вијабилности у реалном времену – RTC (<i>eng. Real Time Cell Analises</i>).....	45
4.3. Анализа експресије гена	49
4.4. Генетски алгоритам (GA)	51
4.4.1. Генетски алгоритам (GA) CSCs третираних са PSNP.....	54
5. ДИСКУСИЈА	62
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	72
7. ЛИТЕРАТУРА	75

I

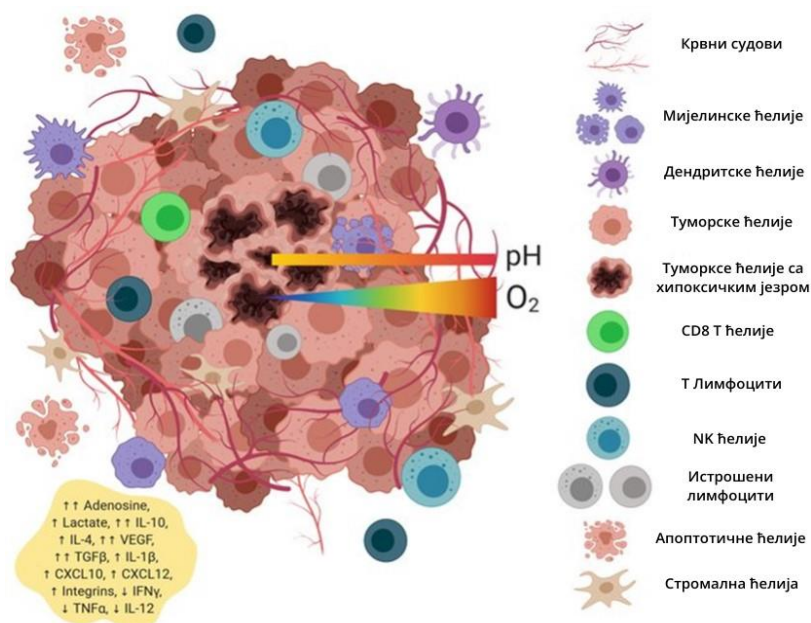
УВОД

1. УВОД

1.1. Туморско микроокружење

Један од најсложенијих биолошких система је туморско микроокружење, које се састоји од екстрацелуларног матрикса (нећелијска компонента) и ћелијске компоненте која поред туморских укључује: стромалне, имунске и матичне ћелије рака (*eng. Cancer stem cells; CSCs*) које даље утичу на прогресију, развој и метастазирање тумора, али и доприносе стварању резистенције на конвенционалан антитуморску терапију (1). Ова хетерогеност туморског микроокружења је главна препрека за лечење тумора тако да је већина терапијских интервенција палијативна, али не и куративна.

Стромалне ћелије (*tumor-associated stromal cell – TASCs*) представљају главну ћелијску компоненту која има улогу у промовисању раста тумора, међутим у неким случајевима могу да инхибирају његов раст тако да их је могуће таргетирати у циљу лечења тумора (2). Уколико терапија циља само туморске ћелије, не добијају се жељени резултати, јер стромална компонента TME (*tumor-micro-environment; TME*) може да утиче на развијање отпорност на терапију. У том смислу иновативна терапија у лечењу тумора, тј. дизајн лекова, мора осим туморских, циљати и стромалне ћелије (3). Популацију стромалних ћелија чине: CAFs (*Cancer-associated fibroblasts*), MSCs (*Mesenchymal stem cells*), CAAs (*Cancer-associated adipocytes*), TEC (*Tumor blood vessels and tumor-associated endothelial cells*) и PC (*Pericytes*) (1).



Фигура 1. Хетерогена средина тумора која се састоји из: стромалне ћелије, дендритске ћелије, DC; природно убилачка ћелија: NK; M1/M2 макрофаги асоцирани са тумором: M1/M2 TAM; N1/N2 неутрофили асоцирани са тумором: N1/N2 TAN; мијелоидне супресорске ћелије: MDSC; CD4+T лимфоцит/CD8+T лимфоцит/регулаторне Т ћелије: CD4+T ћелије/CD8+T ћелије/Treg; регулаторни В лимфоцити: ћелије апоптозе.⁹⁵

- CAFs (*Cancer-associated fibroblasts*) – Фибробласти обично инхибирају формирање тумора док CAFs показују и промовишући туморски фенотип, што је карактеристика већине CAFs. Промовишућа улога CAFs укључује: туморогенезу, развој и отпорност на терапију. Супротно CAFs, могу имати улогу инхибирања пролиферације и раста тумора. CAFs су најчешћа компонента туморске строме, посебно у интерстицијуму карцинома дојке, карцинома простате, панкреаса и желуца (2). Показано је да 80% нормалних фибробласта у ткиву стиче CAFs фенотип током прогресије тумора. На пример, код рака дојке, CAFs могу промовисати метастазе преканцерозних и малигних епителних ћелија дојке, док нормални фибробласти промовишу епителиоидни фенотип и инхибирају метастазе. CAFs се могу формирати привлачењем фибробласта из суседних ткива кроз утицај: трансформишућег фактора раста- β (TGF- β), фактора раста који потиче од тромбоцита (PDGF), фактора раста фибробласта-2 (FGF-2) или екзозома које луче туморске ћелије као и трансдиференцијацијом нормалних фибробласта и TASCs (као што су MSCs, TECs, CAAs, и PCs) у туморском ткиву. На основу особине већине CAFs у TME који промовишу тумор, могућа стратегија у лечењу тумора је таргетирање управо ових ћелија, директно или индиректно. Директно таргетирање CAFs подразумева: спречавање њихове инфилтрације, инхибицију активације, смањење броја или репрограмирање CAFs (враћање у фенотип мирних фибробласта или претварање CAFs у инхибиторни фенотип). Стога је инвазивна терапија усмерена ка развоју вакцина и лекова чија је терапијска мета CAFs. Индиректно таргетирање CAFs укључује радиотерапију, хемиотерапију, као и таргетирање имунских ћелија и сигналних путева повезаних са CAFs (1).
- MSCs (*Mesenchymal stem cells*) су ћелије које се налазе у строми тумора и могу имати различите улоге у зависности од свог фенотипа, акомулираних генских мутација али и од фазе туморогенезе. У раној фази тумора показују инхибиторне ефекте док у касној фази туморогенезе различитим имunosупресивним механизмима промовишу развој тумора. С обзиром да MSCs партиципирају у свим фазама развоја тумора, могу се користити као идеални носачи лека за лечење тумора, јер поседују способност хоминга у туморско ткиво па самим тим могу „однети” лек директно у туморско ткиво и на тај начин зауставити раст тумора без нежељених штетних ефеката на здраве ћелије, које бивају оштећење током примене радио или хемио терапије. MSCs специфично експримирају маркере на основу којих можемо закључити да ли оне учествују у инхибицији или промоцији раста тумора. На пример, CD73 (претпоставља се да CD73 игра важну улогу у канцерогенези пошто аденозин промовише прогресију тумора, а ћелијске линије рака које експримирају CD73 су агресивније) (4); CD90 (експресија CD90 потврђена је у неколико типова рака укључујући јетру, кожу и мозак); и CD105 (Ендоглин CD105) је предложен као одговарајући маркер за туморску ангиогенезу и неоваскуларизацију. Неколико студија показује да неки од ових маркера имају значајну улогу у постављању дијагнозе тумора, прогнози и примени терапије (нпр. ендоглин CD105). Као што је већ поменуто, MSCs могу да мигрирају на место тумора кроз интеракцију различитих хемокинских рецептора (CCR-1, CCR-2, CCR-3, CCR-4, CCR-5, CCR-7, CXCR-1, CXCR-2, CXCR-3, CXCR-4) исказаних на мембрани MSCs а стимулираних цитокинима или хемокинима секретованим из туморске микросредине. MSCs, такође, могу да побољшају васкуларизацију тумора тако што повећавају експресију VEGF и

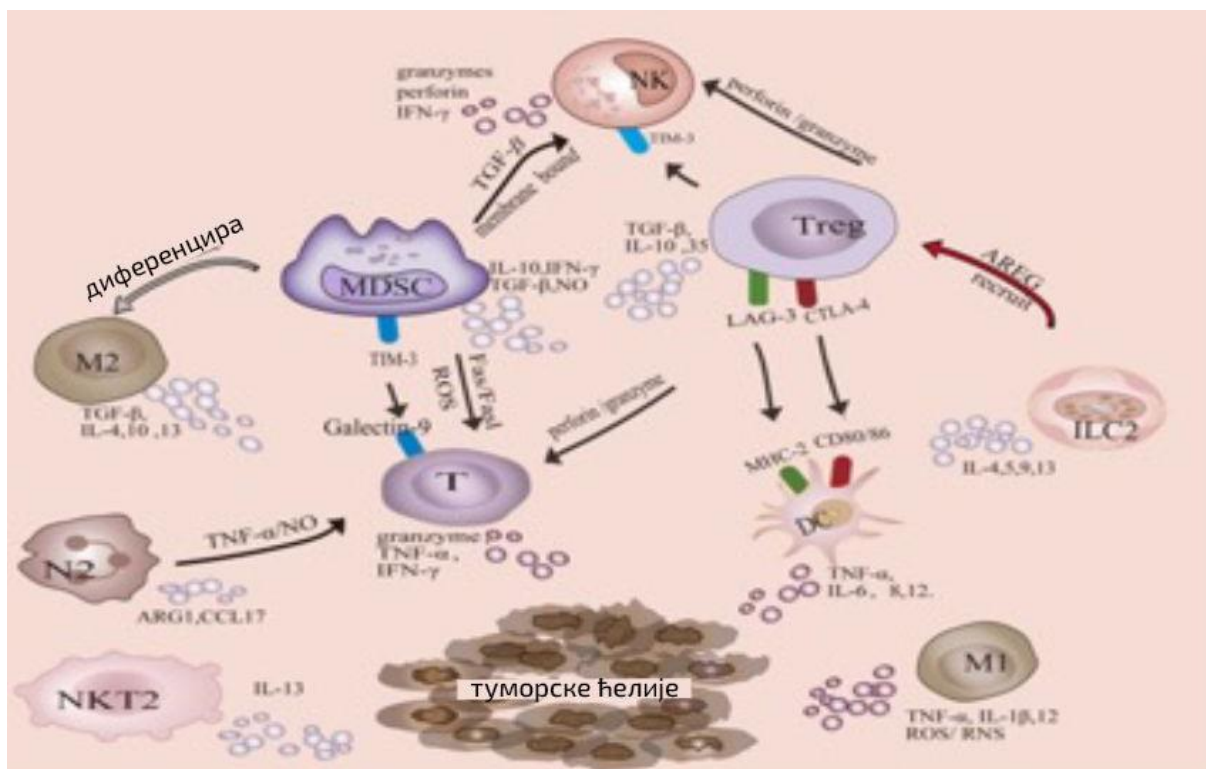
IL-6, и промовишу прогресију и метастазирање канцера лучењем CCL5, CCL7 и TGF- β . Осим директног утицаја на туморске ћелије, MSCs може индиректно утицати смањењем антитуморске имунолошке функције појединих имунских ћелија, као што су NK (*Natural killer cell*) и DC (*dendritic cells*), тако што инхибирају њихове антитуморске активности. Такође, MSCs индукују поларизацију макрофага M2 у имуносупресивни M2 фенотип, промовишу производњу и пролиферацију *Tregs* а, уз то, смањују активацију В лимфоцита. Ипак, због способности MSCs да вођене хемокинима инфилтришу се у ТМЕ, могу се користити као носачи за таргетирање тумора у којима ће испољити антитуморске ефекте кроз испоруку ћелијских фактора против канцера, про-апоптотских протеина и хемиотерапеутика. Такође, оне могу ублажити нежељене ефекте антитуморске терапије након трансплантације хематопоетских матичних ћелија, тако да је употреба неких својстава мезенхималних матичних ћелија за лечење тумора обећавајућа стратегија (2).

- CAAAs (*Cancer-associated adipocytes*). Иако се адипоцити сматрају инертном ћелијском популацијом, лоцирани у ТМЕ „активирају” туморске ћелије са малигнијим фенотипом, посебно код тумора као што су рак дојке, јајника, простате, бубрега, желуца и дебелог црева. Акумулација масног ткива поред туморског ткива повезана је са повећањем стопе инциденције, напредовања и метастаза рака дојке. CAAAs могу промовисати туморогенезу и развој тако што луче велики број цитокина (нпр. IL-6, IL-8, и хемокине), адипокина (лептин, адипонектин, аутотаксин и резистин), метаболита липида (слободне масне киселине и β -хидроксибутирна киселина киселина) и егзозома који повољно делују на раст тумора. Трансформисање CAAAs у нормалне адипоците, инхибирање сродних биоактивних молекула и егзозома ефикасне су методе за циљање CAAAs у лечењу тумора (нпр. метформин може да испољава антитуморске ефекте регулацијом лептина из адипоцита и реверзијом дисфункционалних адипоцита и њиховом нормализацијом) (1-4).
- TECs (*Tumor-associated endothelial cells*) у интеракцији са туморским ћелијама индукују неоваскуларизацију, која је од суштинског значаја за раст тумора и промовисање метастаза. На овај начин се тумору обезбеђују кисеоник и хранљиве материје и ствара резистенција на антитуморску терапију. Туморски крвни судови се разликују од нормалних крвних судова по фенотипу и морфологији. Они су хаотични, нехијерархијски, абнормално проширени и имају карактеристике високе пенетрације и ниске перфузије. Поред тога, ови судови не служе као нормалне баријере, због недостатка одговарајуће периваскуларне покривености. TECs, које чине крвне судове тумора, такође се значајно разликују од нормалних ендотелних ћелија, које су крхке, непропусне и веома пролиферативне и ангиогене. TECs су неправилног облика и величине и брже се размножавају и мигрирају. У исто време, TECs се, такође, манифестују као цитогенетске абнормалности и показују карактеристике нестабилности хромозома као што су анеуплоидија, транслокације и делеције хромозома. Оне се такође разликују од нормалних ендотелних ћелија и на молекуларном нивоу (1-4).
- PCs (*Pericytes*) су паријеталне ћелије које се налазе на унутрашњој површини крвних судова и играју важну улогу у регулисању васкуларне стабилности, пермеабилности и одржавању интегритета крвно-мождане баријере. PCs

регулишу ангиогенезу и на тај начин учествују у прогресији тумора кроз различите механизме (нпр. регулисање имунолошких одговора у ТМЕ). PCs у туморима су важни посредници за одржавање интегритета крвних судова тумора и они у интеракцији са ECs формирају високо функционални туморски васкуларни систем. PCs такође промовишу раст и прогресију тумора кроз регулацију имунолошког одговора у ТМЕ лучењем солубилних фактора и транзицијом у друге стромалне ћелије. Такође, посредују у отпорности тумора на антитуморску терапију. Током процеса раста тумора, пролиферација PCs доводи до васкуларних абнормалности које утичу на испоруку антитуморских лекова (1-4).

- Иmunске ћелије, повезане са тумором, могу се поделити у две категорије – антитуморске и туморске. Антитуморске имунске ћелије укључују ефекторске Т ћелије (цитотоксичне CD8+Т ћелије и ефекторске CD4+Т ћелије), NK ћелије, дендритске ћелије и M1- поларизоване макрофаге. Иmunске ћелије, које промовишу раст тумора, углавном су Tregs, MDSC (*Myeloid-derived suppressor cell*), M2-поларизовани макрофаги, N2-поларизовани неутрофили, NKT2 и ILC2. Поред тога, метаболичке и биохемијске компоненте секретоване у туморској микросредини значајно утичу на функцију имунских ћелија (2).

Иmunски систем може да елиминише ћелије тумора кроз „имунски циклус карцинома”. Овај процес се не одржава дуго јер тумори могу постепено обликовати имунолошко микроокружење тумора у имуносупресивно стање како би се борили против имунског одговора домаћина, а баланс између про- и антитуморских инфламаторних медијатора може одредити судбину тумора. Тумори су развили различите механизме за избегавање имунолошког надзора, као што је јачање негативних имунолошких регулаторних путева и регрутовање имунских ћелија које промовишу тумор. У том случају долази до резултата који показују да је функција антитуморских имунских ћелија блокирана па долази до слома антитуморског имунског одговора. Ефикасност антитуморског имунског одговора у времену одређују две компоненте и њихов однос, тј превага антитуморске или протуморске активности (5). Упркос хетерогености између различитим типовима и популацијама карцинома, улога времена у прогресији тумора је слична. Циљ имунотерапије је да обнови убијајући ефекат антитуморских имунских ћелија, посебно цитотоксичних Т лимфоцита (CTL). Међутим, протуморске имунске ћелије, као што су регулаторне Т ћелије (Tregs), мијелоидне супресорске ћелије (MDSCs), макрофаги повезани са тумором (TAM) и урођене лимфоидне ћелије тип 2 (ILC2s) играју важну улогу у оштећењу антитуморског имунског одговора и обликовању имуносупресивног микроокружења. Проучавање функција и механизма имунолошких ћелија, које промовишу раст тумора, помоћи ће да се побољша стопа позитивних одговора на имунотерапије и да се развију нове имунотерапеутске стратегије (2-5).



Фигура 2. Имунске ћелије у туморској микросредини⁵

1.2. Карцином дојке

Карцином дојке (*breast cancer*, BC) најчешће је дијагностикован карцином и водећи узрок смрти од карцинома код жена широм света. Истраживања показују да је забележено скоро два милиона нових случајева тог карцинома и да је изазвао 626.700 смртних случајева у 2018. години. Такође, показано је да је у развијеним земљама скоро половина жена погођена овом болешћу услед које чак 40% пацијенткиња умре. Најмања стопа обољевања од тумора дојке је у Азији и Африци. Упркос великом напретку у истраживању карцинома, карцином дојке остаје велики здравствени проблем и тренутно представља главни приоритет биомедицинских истраживања. Карцином дојке је хетерогена болест у коју су укључени генетски фактори и фактори животне средине. Карциноми дојке би се могли поделити у три групе: BC који експримира хумани епидермални рецептор 2 (HER2+), BC који експримира хормонски рецептор (рецептор естрогена ER+) или рецептор прогестерона (PR+) и троструко негативан карцином дојке (TNBC) (ER-, PR-, HER2-) (6).

Сложеност молекуларних механизма који регулишу иницијацију и прогресију тумора одређује хетерогеност рака дојке. На молекуларном нивоу ова разноликост представља изазов у избору опција лечења и прогнозе болести. До сада постоји пуно доказа, код људи и експерименталних животиња, да обе ћелијске линије (луминалне епителне ћелије и миоепителне ћелије), од којих се састоји епител млечне жлезде, воде порекло од матичних ћелија епитела дојке (MaSCs). Генетске и епигенетске промене и

абнормалне активација сигналних путева могу промовисати малигну трансформацију нормалних матичних ћелија.

Унутар карцинома дојке идентификована је популација CSCs која се назива матичне ћелије рака дојке (BCSCs) и идентификују се по експресија површинских маркера, као што су CD44, EpCAM, CD133, CD49f, CD61 и одсуство површинских маркера, као што су CD24, CD2, CD3, CD10, CD16, CD18, CD31 и CD64, а које, такође, показују висок ниво алдехид дехидрогеназе-1 (ALDH1). BCSCs су главни фактор који утиче на агресивност тумора и главна препрека за постизање ефикасног лечења услед хемио и радио-резистенције у терапији тумора, па су стога главни изазов у лечењу (7). Као и остале матичне ћелије, BCSCs показују деликатну равнотежу између самообнављања и диференцијације ради одржавања хомеостазе тумора (8). BCSC реагују преко фактора раста и мреже цитокина са ћелијама унутар туморског микроокружења. Такође, постоје нови докази који сугеришу да BCSC промовишу рецидив тумора, а самим тим доводе и до лоше прогнозе у лечењу. На молекуларном нивоу хетерогеност карцинома дојке представља изазов у избору опција лечења и прогнозе болести.

Код пацијената лечених хемиотерапеутицима показано је, што се тиче имунских ћелија, да повећан број плазма ћелија, неутрофила и макрофага, повезаних са тумором (ТАМ), доводи до мањег укупног преживљавања (OS) пацијената. С друге стране, повећан број Т CD8+, а мали број Т CD4+ ћелија у неопластичним местима дојке, корелира са повећаним преживљавањем пацијената. У недостатку CTL, Т CD4+ ћелије активирају ТАМ и промовишу метастазе код пацијената са карциномом дојке. Један од најважнијих подтипова Т CD4+ ћелија, које играју кључну улогу у имунском одговору на тумор, су Т регулаторне ћелије, које нарушавају функцију ефекторских имунских ћелија. Оне потискују антитуморски имунски одговор различитим механизмима тако што на њих делују директним контактом или производњом регулаторних цитокина. Студије показују да је Treg инфилтрација у корелацији са инвазивнијим фенотипом ВС код пацијената. Такође, резултати истраживања показују да пацијенти са ВС имају повећан број MDSC, а највећа заступљеност ових ћелија бележи се код пацијената са метастазама. MDSC могу да поларизују макрофаге у M2 фенотип и индукују експанзију Treg ћелија. Присуство M2 макрофага повећава васкуларну густину тумора дојке и праћено је лошом прогнозом код пацијената са ВС.

Традиционална хемиотерапија утиче на све ћелије које расту, укључујући и имунске ћелије, чиме се умањује ефикасност антитуморског имунског одговора. Са друге стране, хемиотерапија има позитивне ефекте на имунске ћелије у микроокружењу тумора тако што инхибира раст протуморских имунских ћелија. Хемиотерапеутски агенси могу помоћи или одмоћи имунском систему да искорени или бар сузбије раст тумора. Поред тога, удео матичних ћелија рака дојке (BCSCs) у туморима се повећава након хемио и/или радиотерапије, што даље повећава хетерогеност тумора и присуство BCSCs, а касније доводи до терапијског неуспеха или рецидива карцинома. Искорењивање CSCs, за које се претпоставља да су основни узрок иницијације, прогресије и рецидива карцинома, сматра се обећавајућим приступом за побољшање преживљавања од карцинома или чак за излечење карцинома. У истраживању елиминасања CSCs развијене су многе обећавајуће методе, укључујући молекуларну циљану терапију, терапију засновану на микро РНА (miRNA), терапију диференцијације, терапију која циља на микроокружење тумора и имунотерапију.

Напредак у молекуларном истраживању омогућио је боље разумевање ћелијских путева који управљају развојем тумора дојке, олакшавајући напредак у идентификацији дијагностичких маркера и развоју нових терапијских стратегија (9). Такође, нови биолошки маркери, јединствени за појединачне пацијенте, омогућавају постизање оптималне ефикасности употребом циљане терапије. Проучавање молекуларне основе карцинома дојке довело је и до увођења генске терапије као ефикасног терапијског приступа. Она укључује слање генетског материјала кроз вектор у циљне ћелије након чега следи корекција, додавање или супресија гена. Генска терапија може бити успешна када вектори или преносиоци могу да делују на циљани начин и испоручују одређени ген циљним ћелијама (10).

1.2.1. Маркери матичних ћелија тумора дојке

Површински маркери, који се користе за изолацију и идентификацију матичних ћелија тумора дојке, одликују се јединственим својствима. По први пут током 2003. године BCSC су изоловане и идентификоване као ћелије са CD44 + / CD24- / Lin- фенотипом. Од тада CD44+CD24- маркери се користе као поуздан фенотип за изолацију BCSC.

CD44 је ћелијски површински гликопротеин и специфични рецептор за хијалурон. То је кључни елемент за адхезију рака дојке, кретање, миграцију и инвазију, те његове интеракције са остеопontiном воде до прогресије тумора. Такође, CD44 има важну улогу у ћелијској пролиферацији и ангиогенези тумора. Супротно од тога, CD24, као други површински маркер, BCSC је гликопротеин изражен у ниским количинама па повећава способност тумора да расте и метастазира. Упркос растућој листи CSC маркера, неки истраживачи не сматрају ове маркере погодним за идентификацију CSC. Неки резултати, на пример, показују да CD44+/ CD24- није присутан у свим ћелијским линијама тумора дојке (11).

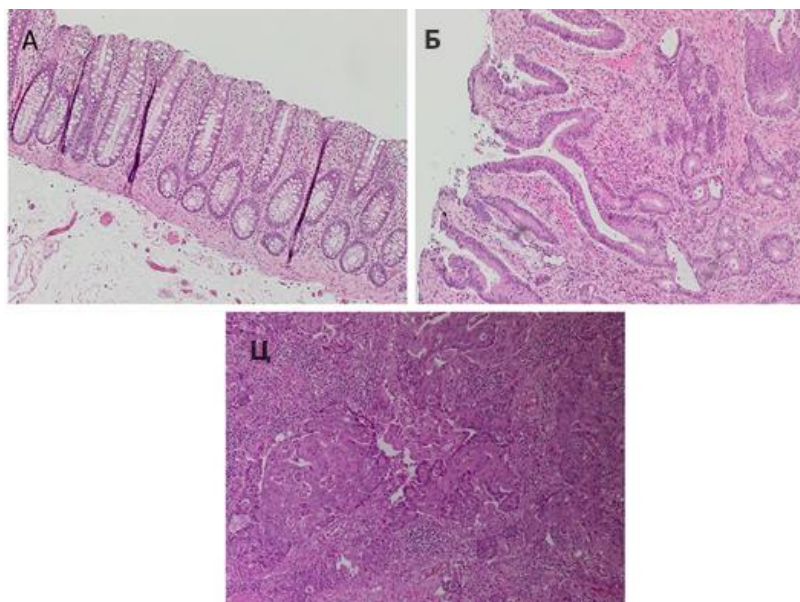
Још један поуздан маркер за BCSC је алдехид дехидрогеназа (*Aldehyde dehydrogenase*-ALDH) који се састоји од породице цитосолних ензима укључених у оксидацију ћелијских алдехида, те оксидира ретинол у ретиноичну киселину током диференцијације елементарних матичних ћелија. Доминантан облик ензима код сисара је ALDH1, који посредује у конверзији ретиналдехида у ретиноичну киселину. Остали маркери који су коришћени за бољу идентификацију BCSC су CD133, као и CD44+ CD49+Fhi, CD133+ ^{hi} фенотипи (11).

1.3. Карцином дебелог црева

Колоректални карцином (CRC) је заступљен са 9% свих карцинома у свету, што га чини другим најчешћим карциномом код жена и трећим по учесталости код мушкараца. Аденокарцином, који настаје из епитела дебелог црева и ректума, чини 90% случајева CRC. Више од 70% смртних случајева повезаних са CRC узроковано је метастазама на јетри. Иако операција може потенцијално довести до излечења, мање од 25% случајева је операбилно са стопом рецидива до 70%. Неоперабилни, рекурентни или метастатски CRC се углавном лече палијативном хемиотерапијом. CRC, чији је

раст ограничен на зид црева (стадијум I и II) потенцијално је излечив због раног откривања и лечења, и има петогодишњу стопу преживљавања између 70% и 90%. Међутим, већина земаља нема скрининг програм који омогућава рано откривање. Просечно петогодишње преживљавање за регионални стадијум (нодални; стадијум III) и удаљени стадијум (метастатски; стадијум IV) CRC је приближно 50%–70% односно 10%–14%. Инциденца CRC драматично расте након педесете година живота, јер 90% случајева детектованог CRC припада овој старосној групи (10).

Епител нормалног дебелог црева је правилног облика са равномерно распоређеним неразгранатим криптама. Крипте у CRC приказују хаотичну архитектуру коју карактеришу гранасте крипте, неправилан облик и велике количине дезмопластичне строме. Аденокарциноми високог степена имају чврсто збијене туморске ћелије, а жлезде чине мање од 50% запремине тумора.



Фигура 3. А) Дебело црево без промена; Б) Аденокарцином ниског, степена; Ц) Аденокарцином високог степена¹⁰

Како је резистенција на терапију и даље највећи проблем у лечењу карцинома у последње две деценије, пажња је усмерена на улогу специфичне популације ћелија тумора, односно матичних ћелија. На основу многобројних испитивања применом ћелијских култура животињских модела и пацијената са тумором, постављен је концепт по коме CSCs имају главну улогу у отпорности на конвенционалну терапију. У ћелијској култури карцинома дебелог црева директна анализа апоптозе показала је да су диференциране ћелије тумора и не-туморске матичне ћелије након хемиотерапије мртве док су CSCs преживеле третман. Ова варијација у осетљивости према терапији није резултат разлика у стопама пролиферације између CSCs и више диференцираних ћелија рака, јер смрт изазвана терапијом не зависи од пролиферативног статуса ћелија. Преживеле CSCs чак могу ефикасно да репопулишу ћелијску културу колоректалног

карцинома показујући њихову незаменљиву улогу у изазивању неуспеха хемиотерапије и рецидива рака код пацијената (12).

1.3.1. Маркери матичних ћелија тумора дебелог црева

CD26 је идентификован као маркер матичних ћелија карцинома који учествује у прогресији тумора кроз процесе као што су миграција, адхезија, инвазија, апоптоза и имуномодулација. CD26 остварује интеракцију са колегенима тип I и III и фибронектином, и на тај начин промовише метастазе. На основу способности да регулише биолошке молекуле кроз своју ензимску активност, CD26 може деловати као супресор или активатор тумора. Студије су показале да пацијенти са метастатским колоректалним карциномом имају висок ниво овог ензима у серуму у поређењу са здравим јединкама. Колико је значајан CD26 молекул, не само у идентификацији CSCs већ и у одговору на терапију, показују резултати студије у којој након третмана са 5FU охалиплатин и CH-38 (активни метаболит иринотекан) долази до повишене експресије CD26 у HT-29, T84, HRT-18, SW480 и SW620 CRC ћелијским линијама (13).

Осим тога, показано је да је експресија CD26 повезана са бржом прогресијом тумора дебелог црева. Осим CD26 маркера, користи се и маркер CXCR4 за процену агресивности тумора. CXCR4 рецептор хемокина је посебно експресован код агресивних колоректалних карцинома као и повезан са повећаном инциденцом метастазирања у лимфне чворове. Лимфни чворови су битан прогностички параметар када говоримо о карциному дебелог црева. Највећи узрок mortalитета од примарног колоректалног карцинома јесте следећи профил: висока експресија овог хемокина са инвазијом лимфних чворова и појава метастаза у јетри.

β -catenin је протеин укључен у регулисање и координацију ћелијско-ћелијске адхезије и транскрипције гена и помаже у одржавању матичности нормалних цревних ћелија. Студије су показале акумулацију нуклеарног β -catenin у 80% случајева дијагностикованог CRC. Редукција или губитак овог протеина, са друге стране, доводи до формирања метастаза у јетри, што говори у прилог томе да је избалансирани ниво β -catenin у ћелијама од изузетног значаја за раст или супресију раста тумора.

Инсулину сличан фактор раста (*insulin-like growth factor 1*, IGF1R) је трансмембрански гликопротеин који утиче на ћелијску пролиферацију, диференцијацију, ангиогенезу и апоптозу. Повећана експресија овог протеина је повезана са повећаним ризиком од CRC-а. Уочено је да се метастатски случајеви CRC-а одликују повећаном експресијом IGF-1 у односу на примарне CRC-туморе.

Студије су, такође, идентификовале гене и сигналне путеве који су укључени у формирање карцинома дебелог црева. KRAS (*Kirsten rat sarcoma virus*) је онкоген који кодира мале протеине који се везују за гуанинске трифосфате. Он поседује GTP-азне активности као трансдуктер. KRAS протеини, такође названи p21, налазе се и на ћелијској мембрани и мутације у овом гену јављају се у кодонима 12 (82-87%) повезаним са формирањем мукозног CRC (13%-18%) повезаних са немукозним CRC-ом, који је агресивнији са већом појавом метастаза. Када постоје мутације у KRAS гену, оне доводе до континуираног активирања путање трансдукције сигнала и, као резултат тога, долази до трансформације и неефикасности анти-епидермалног фактора раста (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) терапије антителима. TP53 је цитоплазматски

протеин који регулише циклус ћелија, апоптозу, мировање (енгл. *senescence*) и поправку DNK, а кодира га ген који припада тумор супресор генима. TP53 има фундаменталну улогу у очувању стабилности и спречавању мутације генома па се стога другачије и зове „чувар генома”.

TP53 мутације се детектују код отприлике 60% колоректалних тумора и могу довести до преласка са аденома на CRC карцином. Стога, идентификација ове мутације представља предиктивни маркер код пацијената, указује на агресивно стање тумора и лошу инциденцу преживљавања. Фосфатидилинозитол 3 киназе (*phosphatidylinositol 3-kinases*, PI3K) киназе су породица ензима укључених у регулисање ћелијских функција као што су раст, пролиферација, диференцијација, мобилност, преживљавање и регулација интрацелуларног протока сигнала и молекула. Повећана експресија PI3K је један од фактора за активацију RAS пута који је укључен у ширење тумора, трансформацију и прогресију CRC карцинома. Показано је да мутација гена за PI3K, као и KRAS гена, значајно редукује време преживљавања код пацијената са CRC карциномом.

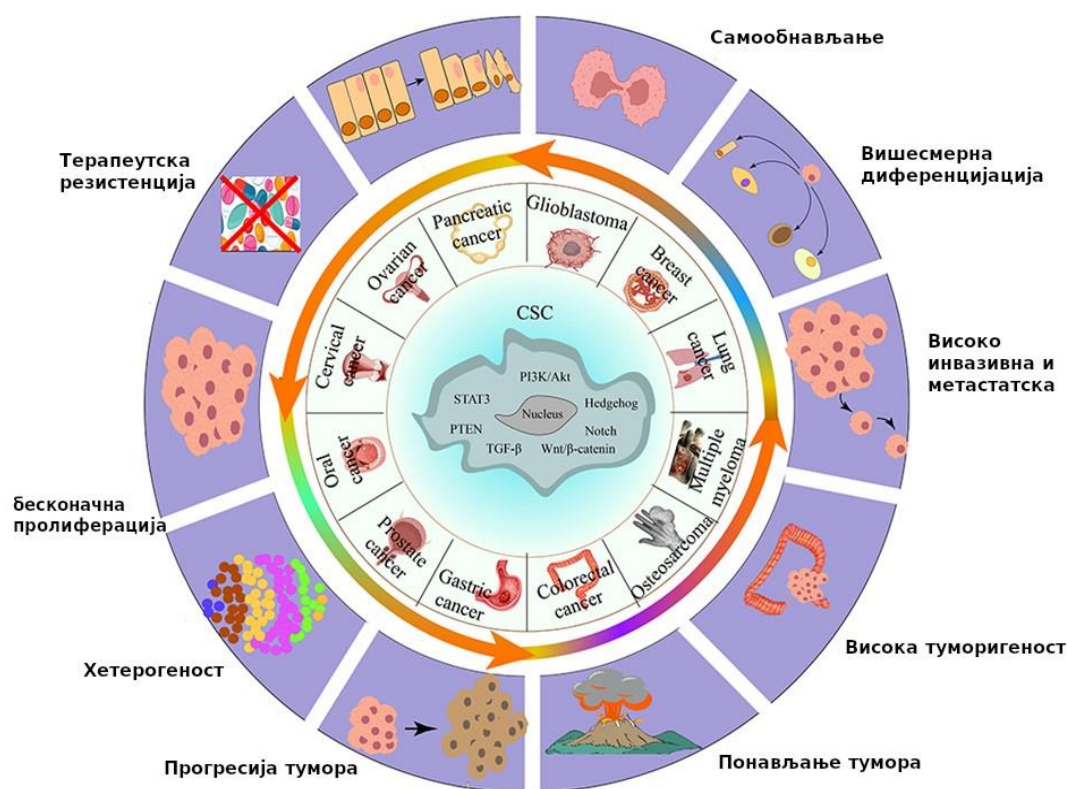
Холог фосфатазе и тензина (*phosphatase and tensin homologue*, PTEN) је протеин кога кодира тумор супресорски ген за сузбијање тумора а има улогу у регулацији сигналних путева који су активирани активношћу PI3K. PTEN је убиквитарни протеин који се налази у скоро свим ткивима људског тела. Забележено је да се код виших туморских градуса CRC-а дешава хиперметилација у промотору PTEN гена, што доводи до његове хипопродукције. Мутирани PTEN чак може представљати и повољан предиктивни маркер код пацијената (13).

1.4. Канцерске матичне ћелије (CSCs)

Појава тумора и адекватно лечење тумора представљају велики здравствени проблем широм света. Поред тога што је један од водећих узрока смрти на глобалном нивоу, важан је и фактор који омета продужавање животног века људи. Око 80% типова тумора потиче од неких карцинома укључујући дојке, дебело црево, јајнике, панкреас и плућа. У 2020. години процењено је да има 19.3 милиона нових случајева малигних тумора и скоро 10 милиона смртних случајева. Очекује се да ће се стопа смртности од карцинома скоро удвостручити до 2040. године због штетних ефеката пандемије COVID-19 (14).

Матичне ћелије рака CSCs су специјализоване подгрупе ћелија у туморском ткиву са високим самообнављањем, потенцијалом вишесмерне диференцијације, туморогеном способношћу и представљају покретачку снагу малигне пролиферације, инвазије, метастаза, резистенције на лекове и рецидива тумора. Канцер је веома хетерогено ткиво и различити механизми доприносе његовој хетерогености, као што су генетске мутације, микроокружење и присуство CSCs. Оне одржавају туморе и диференцирају се у хетерогене ћелије рака, што доводи до прогресије примарних тумора и развоја нових. CSCs могу бити изведене из самообнављајућих нормалних матичних ћелија или из прогениторских ћелија које имају стечени капацитет самообнављања услед мутације или дедиференцијације зрелих туморских ћелија. Студије су показале да се нормалне матичне ћелије постепено развијају у

преканцерозне матичне ћелије и CSCs након прве онкогене мутације, а затим даље акумулирају мутације под дејством мутагена и микроокружења како би се повећала хетерогеност тумора, што резултира неконтролисаним растом ћелија и промоцијом развоја тумора, метастаза, отпорност на лечење и рецидива (14). Као што смо већ поменули, CSCs специфично експримирају различите маркере као што су CD24, CD26, CD44, CD133, CD166, алдехиддехидрогеназа (ALDH), адхезиони молекул епителних ћелија (EPCAM). Експресија ових површинских маркера повезаних са матичним ћелијама може значајно да унапреди туморогенезу и олакша изолацију и идентификацију матичних ћелија. Поред тога, CSCs заједно одржавају карактеристике матичне ћелије-матичност на основу својих биолошких карактеристика (заустављање ћелијског циклуса, оштећење ДНК, ефлукс лека, епително-мезенхимску транзицију (EMT) итд.) и заштитни ефекат туморског микроокружења (хипоксична средина, фибробласти повезани са раком, хронична инфламација, итд.), што отежава лечење тумора. Поред тога, епигенетски механизми играју кључну улогу у формирању и функционисању CSCs, хетерогености тумора, развоју тумора и метастазама. Према моделу настанка тумора, постоје две различите теорије – модел клоналне еволуције и модел матичне ћелије тумора (14).



Фигура 4. Улога CSC у расту, прогресији и метастазирању тумора¹⁹

1.4.1. Први модел „Clonal evolution” модел настанка тумора

Соматски или еволуцијски модел настанка тумора објашњава настајање тумора сходно Дарвиновој теорији, где тумори настају из једне мутиране ћелије која акумулира додатне мутације током свог раста. Ове промене производе субпопулације, а свака од ових субпопулација има способност да се дели и мутира даље. Временом добија еволуцијску предност над осталим ћелијским популацијама и постаје доминантна. Овај модел први пут предложио је Peter Novell 1976. године. Према овом моделу, тумор настаје из једне мутиране ћелије која је продукт генетских варијабилитета и агресивније субпопулације као доминантније преживљавају као и код теорије природне селекције.

Постоје две методе еволуције канцерогене ћелије. Линеарна експанзија (*linear expansion*), где се мутације акумулирају у туморсупресор генима, „*driver*” генима, ДНК репарационим ензимима и такви нарушени системи једне ћелије доводе до клоналне експанзије ћелија тумора, где настале ћелије имају све накупљене мутације. Други механизам (*branch expansion*) представља модел ширења где је мутација резултат геномске нестабилности, формирање субпопулација и под притиском селекције неке мутиране субпопулације настављају да се гранају и врше експанзију док неке изумиру. Пратећи Дарвинову теорију еволуције и природне селекције, Vajnberg и сарадници су успоставили шест главних принципа настанка и раста тумора иако су истакли комплексност мреже којом тумори оперирају. Генетске промене трансформишу нормалну ћелију у канцерогену, која се карактерише са 6 главних тачака: 1) самодовољност у сигнаlima раста; 2) несензитивност према сигнаlima антираста; 3) заобилазак апоптозе; 4) нелимитирани репликативни потенцијал, 5) стимулација ангиогенезе; 6) способност инвазије ткива и метастазе (15).

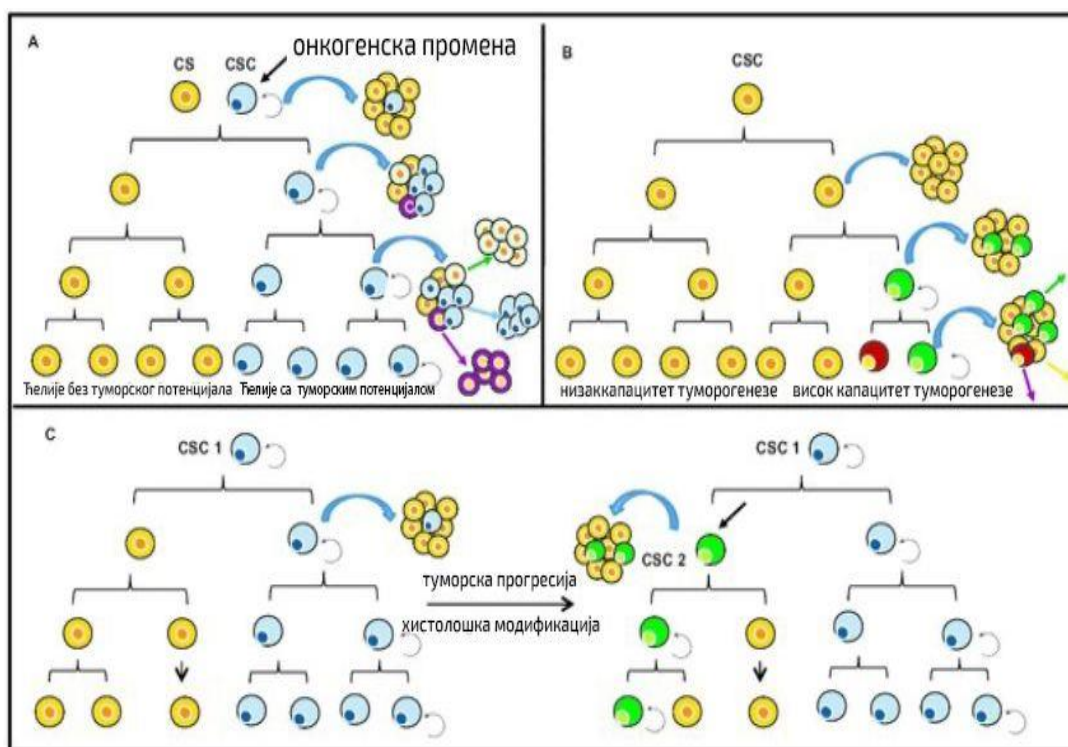
1.4.2. Други модел; *Cancer stem cells (CSC)* модел настанка тумора

Други модел, модел матичних ћелија тумора, базира се на тврдњи да у оквиру популације ћелија тумора постоји само мали подскуп ћелија које су туморогене ћелије. Ове ћелије се називају матичне ћелије тумора, а одликују се способношћу самообнављања и диференцијације. Према CSC хипотези, тумори су хијерархијска организација где самообнављајуће CSC индукују туморогенезу, док диференциране ћелије формирају хетерогеност. Овакав CSC модел се разликује од традиционалног еволуцијског модела канцерогенезе у којем свака ћелија може имати једнак малигни потенцијал.

Да би се откриле ефективне туморске терапије, битно је одредити које ћелије рака имају потенцијал да допринесу развоју самог тумора. Уколико све ћелије рака имају потенцијал да допринесе прогресији болести и метастазирају, онда практично све ћелије морају бити елиминисане да би се болест излечила. У складу са овим ставом, традиционалне терапије тумора су захтевале да се елиминише што више ћелија рака, а не да се циља одређена популација ћелија рака. Насупрот овом приступу, модел матичних ћелија рака се базира на теорији да су раст и прогрес многих тумора зависни и вођени малом субпопулацијом матичних ћелија тумора. Овакав модел матичних ћелија тумора се не оптерећује питањем да ли тумори настају из нормалне матичне ћелије, већ ставком да већина тумора има хијерархиску организацију као и нормална ткива.

CSC ћелије подлежу многим епигетским променама које су ирверзибилне или ретко реверзибилне као што су губитак нормалне контроле ћелијског циклуса. У складу са моделом канцерогених матичних ћелија, одређени тумори (укључујући неке герминативне ћелија канцера и неке леукемије) обухватају неопластичне ћелије, које диференцирају у пост-митотске деривате. Герминативне ћелије тумора производе високо диференциране ћелије, слично ћелијама које сачињавају неурална ткива. Неке леукемије доводе до настанка високо диференцираних хематопоеетских ћелија. Ове врсте тумора су очигледно хијерархијски организовани. Према подацима досадашњих студија на туморима, као што су тумори дојке, малигни герминативни мозга и дебелог црева прате модел настанка матичних ћелија тумора. У сваком од ових само мала субпопулација ћелија може да пренесе болест код имунокомпрмитованих NOD/SCID мишева. Такође су идентификовани маркери који могу разликовати леукемијске / канцерогене ћелије рака из масе популације не-леукемијских / канцерогених ћелија.

Способност да се предвиди које ћелије су канцерогене на основу маркера нам говори да су канцерогене ћелије различите од не-канцерогених и да се тумори не састоје само од канцерогених ћелија. Канцерогене ћелије стварају различите фенотипе и тиме доприносе заједно са не-канцерогеним ћелијама хетерогености тумора. Према овом моделу, пар ћелија, субклонова, има могућност самообнављања и тиме представљају гориво за туморе, и то је разлог зашто након терапије рецидиви и зашто и након јаких хемиотерапије болест се враћа (16).



Фигура 5. (А) У моделу матичних ћелија рака (CSC) само CSC ћелије могу да генеришу тумор на основу својих својстава самообнављања и огромног пролиферативног потенцијала. (Б) У моделу клоналне еволуције све недиференциране ћелије (CSC) у почетку имају сличан туморогени капацитет а

касније, због акумулације низа мутација, стичу доминантне клонове. (Ц) Оба модела тумора су укључени у туморогенезу. У почетку, раст тумора покрећу одређене CSC (CSC1). Са прогресијом тумора још један посебан CSC (CSC2) може настати као резултат клоналне еволуције CSC1 због стицања додатних мутација или епигенетских модификација. CSC2 је агресивнији и постаје доминантан и управо води до формирања туморске масе.⁹⁶

1.4.3. Значај микрооколине (нише) канцерских матичних ћелија

Као и нормалне матичне ћелије, CSC се налазе у оквиру одређених целина где, путем интеракције са другим околним ћелијама и стромом, обезбеђују сигнале неопходне за њихово преживљавање и одржавање матичности. Брзина дељења ових ћелија надмашује обезбеђену количину кисеоника од постојећих крвних судова па је хипоксија један од кључних елемената канцерских ниша. Хипоксија у овим нишама поспешује експресију сигнала који одржавају матична својства, супресију апоптозе или промоцију аутофагије, стимулацију епително-мезинхималне транзиције, појачану ангиогенезу, промовишу удаљене метастазе, док продукти тумор инфилтришућих макрофага повећавају резистенцију CSC на хемотерапеутике. Хипоксија, такође, утиче на геномску нестабилност, због повећане производње реактивних кисеоничних врста (*reactive oxygen species*, ROS), и промене у сигналним путевима поправке оштећене ДНК (17).

Биомаркери CSC ћелија експримирају јединствени сет ћелијских маркера који се користе за њихову карактеризацију и изолацију. Најзначајнији маркери удружени са карактеристикама матичности су CD133, CD44, ЕpCam и активност ALDH. Ови маркери представљају и терапијске мете и окупирају пажњу истраживача. Ови маркери се не експримирају искључиво у CSC, али је доказано да моноклонална антитела на наведене маркере се са већим афинитетом везују за ћелије које показују карактеристике CSC него за друге туморске или нормалне ћелије. CD133 (проминин), гликозилисани мембрански протеин, један је од највише истраживаних и тренутно се испитује имунотоксин усмерен на CD133, који је показао добру ефикасност на мишјем моделу троструко негативног карцинома дојке. CD44 је значајан површински биомаркер у многим неопластичним болестима. То је трансмембрански протеин који је рецептор за хијалуронску киселину, а укључен је у ћелијску адхезију, покретљивост и пролиферацију. Алдехид дехидрогеназа изoenзими (ALDH) представљају интрацелуларне цитопротективне ензиме који су описани као маркер CSC у различитим туморима, укључујући карцином дојке, плућа и панкреаса.

Матичне ћелије тумора први пут су изловане из карцинома дојке где је издвојена популација ћелија са профилем површинских CD44⁺ и CD24⁻. Профили CD44⁺ и CD24⁻ карактеришу резистенцију на терапију, лошу прогнозу и већу инвазију тумора, док додавањем трећег маркера чини још снажнију малигну фенотипску комбинацију (CD44⁺/CD24^{-low}/ЕpCAM^{high}) (18).

1.4.4. Мрежа цитокина

Веза између инфламације и тумора је стари концепт који је доказан истраживањима хепатитиса Ц, хроничног панкреатитиса, HPV-а и њихове улоге у

стварању тимора. Ова хронична инфламаторна стања су вођена цитокинима IL-1 β , IL-6, и IL-8. Генетски полиморфизми у овим цитокинима дају предиспозицију са којима инфициране особе током дукотрајне инфламације могу развити тумор.

Ови инфламаторни цитокини стимулишу самообнављање матичних ћелија тумора које промовишу касније раст тумора и метастазе. IL-6 и IL-8 су укључени у хроничне инфламације и раст тумора. У микроокружењу тумора многе ћелијске врсте, као што су макрофаге, имунске ћелије, мезенхималне ћелије, секретују оба цитокина, IL-6 и IL-8. Код тумора дојке повишени серумски нивои оба цитокина су повезани са лошијом прогнозом. Већ је показано да је IL-6 директни регулатор процеса самообнављања канцерских матичних ћелија дојке преко IL-6 рецептора GP130 комплекса, активацијом STAT сигналног пута. Такође, IL-6 Jagged1/Notch сигнални пут промовише метастазе тумора дојке на костима. Због ових и многих других доказа, IL-6 се прати као терапијски таргет канцерских матичних ћелија. Интересантно је да је цитотоксична терапија, која је индуковала ћелијску смрт у диференцираним канцерским ћелијама, резултирала повећаном продукцијом IL-8. Повећана продукција IL-8 је стимулисала канцерске матичне ћелије дојке активирајући хемокинске рецепторе CXCR1. Молекул репараксин, инхибитор CXCR1, значајно смањује заступљеност канцерске матичне ћелије дојке у ксенографту, инхибирајући раст и метастазе. Продукција ових цитокина је регулисана NF κ B сигналним путем који игра кључну улогу у инфламацији и карциногенези.

Породица NF κ B се састоји од пет повезаних транскрипционих фактора: p50, p52, RelA (p65), c-Rel, и RelB. У HER2/neu мишијем моделу супресија NF κ B резултира одложеном стварањем HER2/neu – индукованих тумора, смањеном ангиогенезом и инфилтрацијом макрофагама. Повишени нивои прогестерона током трудноће утичу на продукцију RANK лиганда (RANKL) путем диференцираних епителних ћелија дојке. RANKL затим стимулише самообнављање матичних ћелије рака дојке, активирајући NF κ B у овим ћелијама. Повећана инциденца агресивних тумора дојке, који су повезани са трудноћом, вероватно резултирају као последица активације ових путева у канцерским матичним ћелијама дојке (19).

1.5. Конвенционални тестови у испитивању ефиканости антитуморских лекова

Конвенционални тестови (проточна цитометрија, RTCA и MTT) до сада су коришћени у одређивању пролиферације и вијабилности ћелија током третмана специфичним цитотоксичним агенсима. Разликовање виталности ћелија и ћелијске смрти од суштинског је значаја за експерименталне и клиничке примене и кључна компонента у експериментима проточне цитометрије. Проточна цитометрија може осетљиво да открије и ефикасно сортира ћелије на основу флуоресцентних сигнала интегрисаних у ћелијске маркере протеина или ДНК. Широко се примењује за процену деобе ћелија, апоптозе и за изоловање ћелија укључујући матичне ћелије.

Анализа CSC помоћу проточне цитометрије је поуздан, ефикасан и лак приступ за скрининг агенаса који циљају CSC. Анализа тетираних CSC постаје ефикаснији начин за процену нових терапеутских агенаса за рак. Код рака дојке код људи, ћелије са CD44+/CD24– ниским маркерима су идентификоване као матичне ћелије рака дојке BCSCs. Проточна цитометрија се може користити за процену BCSCs у успостављеној

ћелијској линији након третмана (20). Проточна цитометрија је једна од метода која се користи у процени адјувантне терапије за рак дојке. ДНК плоидност, заједно са измереним капацитетом пролиферације као фракција ћелија у С-фази ћелијског циклуса, показано је да помаже у идентификацији пацијената са високим или малим ризиком за рецидив тумора. Додатно, пацијенти са анеуплоидним туморима и пацијенти са диплоидним туморима и висока фракција С-фазе су већи ризик од рецидива. Ипак, проточна цитометрија не може као једина метода да пружи информације о природи потребе адјувантне терапије (21).

Међутим, ови тестови имају многе недостатке: они могу одредити само крајње физиолошко стање ћелија; због различитих корака укључених у протокол, могу се добити лажно позитивни резултати; не постоје информације о стању ћелија током периода третмана, осим ако нема много временских тачака, што само по себи може бити извор грешке. Сви такви тестови не дају тачан приказ стања ћелија током периода пролиферације или миграције, већ се мере крајње тачке.

Тренутно једини апарат помоћу кога се могу добити све временске тачке, са лакоћом и поновљивом прецизношћу, је RTCA. Анализатор ћелија у реалном времену (енг. *Real time cell analyzer*, RTCA) је нова техника која омогућава праћење ћелијске пролиферације, миграције и цитотоксичности супстанци у директној или индиректној кокултури у реалном времену. На овај начин добијају се информације о стању ћелија у многобројним временским тачкама. Рачунарски модели (компјутерска симулација) омогућавају проучавање феномена са променљивим временским скалама као и визуелизацију тродимензионалне биолошке симулације. Рачунарско моделирање (рачунарска симулација) омогућава увид у појаве са променљивим временским скалама и омогућава визуелизацију тродимензионалних биолошких симулација.

1.6. Математички модел туморске прогресије

Математичко моделирање биолошких процеса се широко користи за побољшање квантитативног разумевања биомедицинских феномена. Ово квантитативно знање се може применити како у клиничким тако и у експерименталним условима. Важна примена моделирања је из области биологије рака. Многи математички модели су развијени да представе неке аспекте рака. Ови модели се разликују од једноставних модела који покушавају да симулирају раст запремине тумора софистицираним моделима укључујући многе биолошки важне молекуларне процесе (22).

Математички модели су развијени да би се разумео динамички процес пролиферације ћелије рака. Математички модели помажу да се предвиди величина тумора и оптимизује поступак лечења. У детерминистичком облику постоји седам модела, укључујући експоненцијални, Менделсонов, логистички, линеарни, површински, Гомпертз и Барталанфи (*Gompertz and Bartalanffy*), који су коришћени за описивање раста и пролиферације ћелија рака. Модели су дизајнирани да предвиде стопу промена запремине тумора у односу на промене у времену.

Експоненцијални модел је природни опис раних фаза раста рака. У експоненцијалном моделу, свака ћелија рака се поделила на две ћерке ћелије у захваћеном подручју константном брзином. Експоненцијални модел има ограничења за

предвиђање дугорочне стопе раста и пролиферације ћелија рака. Да би се превазишли ови проблеми, уведен је логистички модел који објашњава понашање ћелија рака, раст и пролиферацију. *Gompertz and Bartalanffy* модел има способност да предвиди латентне стадијуме тумора. Показало се да пружа најбољи квалитет предвиђања за раст рака дојке и плућа. Модел који је увео *Von Bartalanffy* показује да се запремина тумора смањује са смрћу ћелије и повећава у односу на површину. Сви поменути модели имају ограничења да предвиде последње фазе раста рака и не могу предвидети дугорочну стопу раста тумора (23).

1.7. Полистиренска микро- и нано пластика

Распрострањеност пластичних честица у глобалној биосфери изазива све већу забринутост из перспективе животне средине и здравља људи. Микропластика (MP) представља пластичне честице величине до 5mm, док нанопластика (NP) представља честице у субмикронском опсегу, односно $<1\ \mu\text{m}$ (24). Недавне студије показују да су људи стално изложени микро- и нано честицама пластике кроз ланац исхране. Показано је да је више од 690 морских врста (укључујући рибу и остриге) контаминирано са MP/NP (25). Присуство MP/NP потврђено је у морским плодовима и у више прехранбених производа, као што су мед, пиво, кухињска со, млеко и вода за пиће, што све укупно сугерише на то да је изложеност људи MP/NP неизбежна (26). Од 2019. године научници су открили да пластични чепови за флаше, пластичне кесе за чај (27) (28) као и бочице за храњење одојчади (29) ослобађају значајан број MP/NP.

Једна од најчешће коришћених врста пластике са укупном светском производњом од 15,61 МТ у 2019. години је полистирен (енгл. *polystyrene*, PS). PS настаје као резултат полимеризације стирена, док се стирен добија каталитичком дехидрогенизацијом етилбензена. Осим тога, PS се лако хемијски модификује и користи за синтетисање честица различитих величина (30).

Разматрано је 133 студија које су се бавиле штетним дејством PSMP/NP (31) и од тога 16 је показало да утицај PSMP-NP на здравље људи није забрињавајући, док је 117 потврдило њихов штетан утицај. Такође је показано да токсичност PSMP/NP делује на дозно зависан начин, при чему већа концентрација доводи до већих токсиколошких ефеката. Важну улогу, такође, игра облик PSMP/NP, о чему сведочи неколико студија. Површински напон, такође, значајно утиче на интеракцију између PSMP/NP и ћелија. Показано је да PS-NH₂ значајно смањује вијабилност ћелија код три ћелијске линије: Сасо-2, HT29-MTX-E12, ТНР-1 (35). Примећен је и статистички значајан пораст оштећења ДНК код Сасо-2 и HT29-MTX-E12 ћелија третираних са PS-NH₂. У студији коју су спровели Jeon et al., 2018. године примећена је позитивна колерација између количине интернализованих честица и зета потенцијала (на основу фагоцитних диференцираних ТНР-1 ћелија или нефагоцитних А549 ћелија) (36). Како су макрофаги примарне фагоцитне ћелије у цревном тракту, плућима и јетри, постоји неколико студија које су испитивале токсично дејство PSMP/NP и показано је да се макрофаги подвргавају диференцијацији (при концентрацији 50 $\mu\text{g/mL}$ и величини честица од 0.2 μm). Приликом повећања концентрације на 100 и 200 $\mu\text{g/mL}$ долазило је до повећања реактивних врста кисеоника (РОС) и оштећења лизозома у макрофагима (37,38).

У последњих неколико година интензивирала су се истраживања о утицају PSMP/NP на дигестивни систем, с обзиром да је гутање окарактерисано као главни пут изложености. Хронична изложеност Сасо-2 ћелија (репрезентативне за танко црево код људи) PSMP/NP (тј. концентрацијама од 12,5 до 50 $\mu\text{g/mL}$) има тенденцију да изазове цитотоксичност повезану са повредом епителних ћелија и променама у функцији баријере црева, оксидативним стресом, деинтоксикацијом и нивоом транскрипције гена укључених у многе метаболичке путеве (39). Такође, да би се разјаснили механизми уласка и транспорта PSMP/NP употребом ћелија хуманог епитела желуца (GES-1), спроведене су студије чији резултати показују да су PSMP/NP у ћелије домаћина доспеле путем вишеструких путева ендоцитозе или макропиноцитозе (40).

Откривено је да конзумирање PSMP/NP, поред утицаја на микробиоту црева, имају тенденцију да превазиђу цревну баријеру и да се акумулирају у телу. *Schwarzfischer* и сарадници су 2021. године показали да код мишева третираних сферним PSMP/NP величине око 50 nm у дози од 0.2 mg по дану долази до акумулације PSMP/NP у танком цреву и удаљеним органима, укључујући слезину и јетру (41).

Хепатотоксичност, коју изазивају PSMP/NP код мишева, истраживали су Ми и сарадници 2022. године (42). Експериментални мишеве су третирали PSMP/NP величине 5,0 μm у концентрацијама 0,1, 0,5 и 1 mg/mL током 4 недеље. Показано је да изложеност PSMP/NP може оштетити структуру и функцију јетре и изазвати оксидативно оштећење и пероксидацију липида у јетри, што сугерише да су се пироптоза и фероптоза појавиле у повредама јетре које су индуковане PSMP/NP и праћене интензивним оксидативним стресом и упалом. Истраживачи *Meng* и сарадници открили су да се PSMP/NP (величине 50 μm , 300 μm , 600 μm , 4 μm) биоаккумулирају у бубрезима мишева третираних раствором када су третирали раствором PSMP од 5 mg/дан током 4 недеље (43). Примећен је и губитак тежине мишева као и повећана стопа смртности. Код мишева који су третирали PSMP/NP величине 5 μm у две дозе од 0,1 и 0,5 mg примећена је хепатотоксичност као и то да изложеност PSMP/NP има утицај на експресију гена (44).

Утицај PSMP/NP такође је испитиван на ћелијској линији A549 (репрезентативна за епителне ћелије људских плућа) и показано је да се значајно смањила вијабилност ћелија на дозно зависан начин, да су изазвале заустављање С фазе ћелијског циклуса, активирале инфламаторну транскрипцију гена и промениле експресију протеина повезаних са ћелијским циклусом и про-апоптозом (45). Студије су испитивале и комбиновану изложеност PSMP/NP и различитим лековима на ћелијским линијама риба показујући да измењена фармацеутска токсичност изазвана честицама PSNP може бити повезана са стопама инкорпорације, капацитетом асорпције и механизмима одбране ћелије. Током последњих неколико година спроведене су различите *in vivo* и *in vitro* студије на сисарима у циљу испитивања штетног дејства PSMP/NP (Табела 1.). Међутим, ефекти PSMP/NP (самих или у комбинацији са хемотерапеутицима) на људске ћелије рака остају непознати.

PSMP/NP доводе до значајног убрзања раста тумора јајника код мишева као и до смањења вијабилности ћелија рака јајника (46). *Xu* и сарадници су сумирали 21 студију користећи *in vitro* моделе Сасо-2 ћелија за процену ефеката пластичних честица (47). *Domenech* и сарадници су истраживали дугорочне ефекте полистиренске нанопластике на ћелије аденокарцинома дебелог црева (Сасо-2 ћелије) (48). Открили су да се PSNP лако акумулирају у изложеним ћелијама и то на дозно зависан начин. Заправо,

приликом изложености вишим концентрацијама PSNP, неке ултраструктурне промене у митохондријама су биле евидентне, што сугерише да би изложеност PSNP могла изазвати дисфункцију органела (48). Што је најважније, интернализација PSMP/NP од стране нормалних људских ћелија дебелог црева индукује метаболичке промене при акутном и хроничном излагању промовишући оксидативни стрес, повећавајући гликолизу преко лактата да би се одржао енергетски метаболизам и метаболизам глутаминa за одржавање анаболичких процеса (49). Ови подаци пружају снажне доказе да изложеност PSMP/NP може деловати као фактор ризика од рака за људско здравље.

Цитотоксични ефекти PSMP/NP су, такође, потврђени на HepG2 ћелије хуманог хепатома (50). Као *in vitro* модел људске јетре, ћелијска линија хуманог хепатоцелуларног карцинома (HepG2) коришћена је у пет недавних студија (45). PSNP величине 50 nm су брзо интернализоване од стране HepG2 ћелија које показују велики негативан утицај на виталност ћелија услед ћелијског оксидативног оштећења и уништавања антиоксидативних способности (50).

Barguilla и сарадници такође упозоравају на потенцијални канцерогени ризик који проистиче из дуготрајне изложености микро- и нанопластичним честицама, посебно нанопластици од полистирена (47). Бројне студије упозоравају да PSNP представља нову претњу карциному желуца и изазива резистенцију на терапију (51). Утврђено је да орална примена полиетиленске нанопластике значајно утиче на цревну микроокружење код мишева. Овај поремећај микроокружења фаворизује развој колоректалних тумора услед промена у адаптивном имунолошком одговору (52). Комбинована токсичност микро- и нанопластике изазива озбиљна оштећења цревне баријере. Узимајући у обзир да већина студија о микро- и нанопластици PS до сада истражује само једну величину честица, могуће је да су здравствени ризици повезани са изложеношћу PS микро- и нанопластици у телу потцењени (53).

Наша студија имала је за циљ да истражи везу између нивоа експресије CSC маркера и хемиосензитивности, као и да анализира ефекат PSNP на обрасце експресије ових маркера. Наш циљ био је да боље упознамо основне молекуларне механизме у ћелијама канцера.

Биолошки модел	MNPs произвођач	Врста полимера	Величина честица	Концентрација	Резултати
<i>In vivo</i> : епителни карцином јајника мишији модел	Huge Biotechnology (China)	polystyrene	100 nm	10 mg/L 27 дана	Изложеност PS-NP је убрзала ЕОС раст тумора код мишева
<i>In vitro</i> : Ћелије хуманог аденокарцинома	Spherotech, Inc., Chicago, IL, USA	polystyrene	50 nm	Различите концентрације у опсегу: 0, 6.5, 13, 26,	Акумулација PSNPs је дозно зависна у третираним

дебелог црева (Caco-2)				and 39 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	ћелијама
<i>In vitro</i> : хумане интестиналне ћелије (CCD-18Co)	Sigma-Aldrich	polystyrene	0.5 μm and 2 μm	Различите концентрације у опсегу (1-5-10-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Изложеност PSMP/NP изазива оксидативни стрес
<i>In vitro</i> : HepG2 ћелије	DK Nano Tech (Beijing, China)	polystyrene	50 nm	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 12h	Смањена вијабилност ћелија
<i>In vitro</i> : мишије ембрионалне фибробласти	Spherotech (Chicago, USA)	polystyrene	50 nm	Различите концентрације PSNPLs (10, 25, 75, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) у току 24 h	Прогресија канцера
<i>In vivo</i> : BALB/c nude мишеви <i>In vitro</i> : ћелијске линије хуманог карцинома желуца (AGS, MKN1, MKN45, NCI-N87 and KATOIII)	Cospheric, USA	polystyrene	9.5-11.5 μm	<i>In vivo</i> : 1.72×10^4 честица/mL <i>In vitro</i> : 8.61×10^5 честица/mL	Индукује резистенцију на терапију хемо- и моноклонским антителима
<i>In vitro</i> : ћелијске линије хуманог карцинома дојке: MDA-MB 231, and MCF-7	Thermo Fisher Scientific	polystyrene	60 nm	1, 10, и 100 mg/ml	Утичу на вијабилност и пролиферацију ћелија
<i>In vivo</i> : C57BL/6 J мишеви	Magsphere (Pasadena, California, USA)	polyethylene	50.7, 503.6, and 5047.0 nm	20 mL/kg у току 28 дана	Узрокују озбиљну дисфункцију цревне баријере

Табела 1. *In vitro* и *in vivo* истраживања у којима су коришћене PSMP/NP³¹

II

ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

2.1. ЦИЉЕВИ

Основни циљ овог истраживања је да се испитају свих 16 комбинација одређивања маркера матичности код канцера колона и дојке без и у третману комерцијаним хемиотерапеутицима, са или без присуства полистиренске нанопластике. Укупно експерименталних и контролних група ће бити 48. Поред тога, ови резултати истраживања матичности биће корелирани са резултатима добијеним у испитивању ћелијске вијабилности и генске експресије. Методама математичког моделирања биће понуђен најоптималнији начин детекције матичности тумора, тј. одабир једне или неколико од 16 могућих комбинација.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. Испитати методом проточне цитометрије протеинску експресију 4 маркера матичности на модел системима канцера колона (HCT-116), дојке (MDA-MB-231) и здравих ћелија фибробласта (MRC-5).
2. Методама МТТ и RTCA испитати токсично дејство примењених хемиотерапеутика *in vitro*.
3. Испитати утицај хемиотерапеутика на генску експресију параметара матичности.
4. Испитати утицај полистиренске нанопластике на експресију маркера матичности у ћелијским линијама колона и дојке.
5. Методама математичког моделирања предвидети најоптималнију комбинацију параметара који су потребни за најпрецизније одређивање матичности канцера *in vitro*.

2.2. ХИПОТЕЗЕ

1. Поред неколико стандардних комбинација неких од 4 понуђена маркера матичности, постоји комбинација која је оптималнија, посебно у корелацији са типом тумора и примењене терапије.
2. RTCA метода праћења ћелијске вијабилности супериорнија је у овој врсти испитивања од класичног МТТ теста.
3. Варијације у променама у тумору током терапије значајно утичу на промене у матичности туморских ћелија, тј. на њихов метастатски потенцијал.
4. Полистиренска нанопластика повећава експресију маркера матичности.
5. Методе математичког моделирања супериорне су у односу на класичну анализу биолошких параметара, које значајно зависе о људском фактору.

III

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Ћелијске културе

Испитивање *in vitro* ефеката хемиотерапеутика спроведено је на:

- ћелијској линији канцера колона (HCT-116), која је изведена из хуманог колоректалног карцинома,
- ћелијској линији канцера дојке (MDA-MB-231) која потиче од аденокарцинома дојке код људи,
- здравој ћелијској линији фибробласта изолованих из плеуре плућа, MRC-5.

Ове ћелијске линије (HCT-116 и MDA-MB-231) су изабране због њихове важности за одговарајуће типове рака и њиховог добро документованог биолошког понашања. Ћелије HCT-116 карактеришу специфичне генетске мутације и молекуларни путеви, који су симбол колоректалног карцинома, док су ћелије MDA-MB-231 репрезентативне за троструко негативан рак дојке, који је познат по својој агресивној природи недостатку хормонских рецептора.

Свака ћелијска линија представља јединствене изазове у погледу лечења и одражава хетерогеност биологије рака, што је кључно за процену хемиотерапеутске ефикасности и анализу експресије маркера матичних ћелија рака (CSC). Ћелије су култивисане у стандардним условима ECAC (European Collection of Authenticated Cell Cultures). За култивацију наведених ћелија коришћен је медијум DMEM у који је додат фетални говеђи серум, L-глутамин, пеницилин/стрептомицин и неесенцијалне аминокиселине. Ћелије су узгајане у инкубатору на 37°C са 5% CO₂. Након 24 сата изложене су хемиотерапеутским агенсима.

3.2. Хемиотерапеутици

За хемиотерапијске третмане ћелије су биле изложене:

1. 5-флуороурацилу (5-FU) у клинички релевантној концентрацији, која је одређена на основу претходних студија доза-одговор (62,5 μM). Распоред лечења је укључивао давање 5-FU током периода који одражава стандардне клиничке протоколе, са временом излагања у распону од 24 до 52 сата, да би се проценили краткорочни и продужени ефекти. Нетретиране контролне ћелије су одржаване под идентичним условима без излагања 5-FU у свакој временској тачки да би служиле као основне контроле за поређење.
2. Леуковорину, иринотекану и оксалиплатину, а основни раствори за ове хемиотерапеутске агенсе били су 50, 10, 20 и 5 mg/m, односећи се на сваки од наведених.
3. За ћелије MDA-MB-231 и MRC-5 коришћени су доксорубицин, ендоксан, паклитаксел и доцетаксел, а основни раствори за ове хемиотерапеутске агенсе били су 2, 40, 60 и 20 mg/mL редом којим је претходно написано.

3.3. Третман ћелијских култура честицама полистирена

Ћелијска линија хуманог колоректалног карцинома HCT-116 и ћелијска линија рака дојке код људи MDA-MB-231 (купљене из Европске колекције проверених ћелијских *European Collection of Authenticated Cell Cultures – ECACC, London, UK*) узгајане су у ДМЕМ-у (*Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (D5796; Sigma–Aldrich Chemical Company, St. Louis, MO, USA)*) са додатком 10% фаталног говеђег серума (*F4135-500ML; Sigma–Aldrich Chemical Company, St. Louis, MO, USA*) и 1% пеницилина/стрептомицина (*P4333-100ML; Sigma – Aldrich Chemical Company, St. Louis, MO, USA*). Обе ћелијске културе су расле у посудама за културу од 75 cm² и одржаване су у влажној атмосфери са 5% CO₂ на физиолошкој температури од 37°C. Медијум се мењао свака 2 дана и ћелије су трипсинизоване када је било потребно (0,05% трипсина-0,53 mM EDTA). Ћелије хуманог колоректалног карцинома и ћелије рака дојке третиране су медијумом који садржи PS наночестице (2.2 × 10¹⁰ PSNPs/mL). Честице полистирена коришћене у експериментима биле су величине 40nm (црвене) (*red 8793 Thermo Fisher, Waltham, MA, USA*) модификоване карбоксилатом. Пре сваког експеримента са ћелијском културом припремљени су основни раствори PS честица а све суспензије честица су пре примене у експериментима третиране у ултразвучном купатилу (15 min на 42 W/L). Након инкубације од 24 сата, 33 сата, 43 сата, 52 сата и 76 сати, ћелије су сакупљене за анализу.

3.4. Одређивање експресије различитих површинских маркер матичних ћелија рака (CSC) проточном цитометријом (eng. Flow Cytometry Analysis)

У циљу скрининга експресије различитих површинских маркера матичних ћелија рака, ћелије су култивисане у плочи са 6 бунарчића. После инкубације од 24 сата, ћелије су третиране хемиотерапијским агенсом 5-FU. За анализу проточне цитометрије 1×10^5 ћелија сакупљено је 24, 33, 43- и 52 сата након третмана и инкубирано са анти-хуманим CD24, CD44, ALDH1 и ABCG2 моноклонским антителима коњугованим са APC (allophycocyanin), PerCP (peridinin chlorophyll protein), PE (phycoerythrin) или FITC (fluorescein isothiocyanate) од произвођача BD Biosciences, San Jose, CA, USA, пратећи упутства произвођача.

Важно је напоменути да су за детекцију интрацелуларног ALDH1A1, који није површински протеин, ћелије пре инкубације са антителима пермеабелизоване коришћењем комплета раствора за фиксацију/пермеабелизацију BD Biosciences према датом протоколу. Овако је омогућено интрацелуларно бојење ALDH1A1 и његова детекција поред површинских маркера. Проточна цитометријска анализа је спроведена на *BD Biosciences FACSCalibur*, а подаци су анализирани комерцијалним софтвером Flowing. За контролне ћелије идентичне процедуре су праћене без додавања 5-FU да би се обезбедила упоредивост података.

Обележавање (eng. *gating*) се користи за идентификацију ћелија од интереса на основу величине ћелија (FSC eng. *Forward Scatter*) и грануларности (SSC eng. *Side scatter*). У нашим узорцима са ћелијама HCT-116 и MDA-MB-231 овај метод обележавања првог нивоа био је кључан за идентификацију ћелија од интереса. Ова стратегија ографивања је, такође, коришћена за искључивање ћелијског дебриса и мртвих ћелија. Мртве ћелије су пронађене у доњем левом углу графикана FSC у односу на SSC густину. Мртве ћелије и ћелијски дебрис карактеришу ниже вредности FSC/SSC (ниже вредности FSC указују на непролиферативне ћелије, а веће вредности SSC указују на формирање гранула током апоптозе), стога се лако искључују из групе ћелија од интереса.

3.5. Одређивање ћелијске вијабилности у реалном времену – RTCA (eng. *Real Time Cell Analises*)

Праћење ћелијског индекса третираних ћелија је обављено коришћењем есеја *Real Time Cell Analises* на *xCELLigence RTCA DP* систему (*Roche Applied Science*, Швајцарска) према приручнику произвођача. *xCELLigence* се састоји од три дела: i) RTCA анализатор за мерење импедансе на златним микроелектродама постављеним на Е- плочу; ii) RTCA SP је оперативна јединица смештена унутар инкубатора на којој су постављене три Е- плоче; iii) RTCA управљачки софтвер (вер. 1.2.1.1002) који се може контролисати даљински путем интернет веза у реалном времену. Такав

интегрисани микроелектронски систем за биолошка мерења садржи биосензоре који су лаки за коришћење и који прате адхезију и вијабилност ћелија у реалном времену. Уколико се на златној електроди налази већи број залепљених (живих) ћелија, мери се већа импеданса. Измерена вредност без јединица под називом ћелијски индекс (енгл. *Cell Index*, CI) представља резултат мерења дефинисан следећом једначином: $CI = (R_{tn} - R_{to})/F$.

Где је:

R_{tn} – отпор мерен у тренутку t_n ,

R_{to} – отпор измерен у тренутку t_o ,

F – константна: $15 \text{ } \Omega$ на 10 kHz , $12 \text{ } \Omega$ на 25 kHz и $10 \text{ } \Omega$ на 50 kHz .

Након 24 сата од сејања, ћелије су третиране са 5FU. CI је праћен током преосталог периода дајући информације о третману у реалном времену. Сви експерименти су изведени у три понављања а сваки независни експеримент, такође, у три понављања. Интервални нагиб је аутоматски израчунат софтвером да би се проценила брзина промене индекса ћелија. Да би се одредио резултат третмана, ћелијски индекс је нормализован на приближну вредност у временској тачки нормализације, односно 24 сата. Нормализовани ћелијски индекс (NCI) је радна функција са подацима, где се бира одређено време (тј. када су ћелије третиране), што се затим утврђује као 1.0 (100%) од стране самог софтверског пакета. Након тога, све вредности се означавају у сразмери са овом вредношћу. NCI је погодан за апроксимацију процентуалне варијације у ћелијској адхезији.

3.6. Квантитативна реакција ланчане полимеризације у реалном времену (*eng. Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR*)

Ћелије (1×10^6) су засејане у плочу од 25 cm^2 и након 24 сата третиране хемиотерапеутицима. Након 24 и 72 сата од третмана ћелије су коришћене за изолацију РНК, реверзну транскрипцију РНК и квантитативну реакцију ланчане полимеризације у реалном времену (qPCR –PCR).

3.6.1. Изолација РНК

Узорци су хомогенизовани у тризолу и центрифугирани на $12000 \text{ rpm}/5 \text{ min}/4^\circ\text{C}$. Након хомогенизације третираних ћелија, у сваки узорак је додат хлороформ и мешан 15 секунди. Након тога, епрувете су остављене да се инкубирају (2-3 мин) на собној температури. После центрифугирања од 15 минута/ $1200 \text{ rpm}/4^\circ\text{C}$ примећене су три фазе, где је горња фаза (која садржи РНК) пребачена у нову микроепрувету. Додато је $500 \text{ } \mu\text{L}$ изопропанола, РНК је преципитирана 10 минута, а узорци су поново центрифугирани ($12000 \text{ rpm}/10 \text{ min}/4^\circ\text{C}$). Супернатант је уклоњен, а преципитат је испран са 1 mL 70% етанола, а затим центрифугиран на $7500 \text{ rpm}/5 \text{ min}/4^\circ\text{C}$. Супернатант је уклоњен, а етанол је остављен да се осуши на ваздуху (2-3 мин.). РНК остатак је ресуспендован у $20 \text{ } \mu\text{L}$ воде, а затим инкубиран на 55°C у термоблоку на 2-3

мин. Концентрација РНК је мерена у узорцима коришћењем биофотометра (*Eppendorf BioPhotometer Plus*).

3.6.2. Реверзна Транскрипција РНК у комплементарну ДНК (RT-PCR)

Реверзна транскрипција мРНК у комплементарну ДНК изведена је применом кита за реверзну транскрипцију (*cDNA Synthesis Kit*) са 2 μL узорка РНК, који је додат у главну мешавину (енгл. *Master Mix, Faste Gene Scriptase Basic*). Комплементарна ДНК је добијена коришћењем апарата *Multigene OptiMAKS (Labenet International)*.

3.6.3. Квантитативна реакција ланчане полимеризације у реалном времену (eng. *Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR*)

Добијена комплементарна ДНК је коришћена за процену релативне експресије *housekeeping* гена β -actin као и гена од интереса: *Caspase 3, Caspase 9, Fasceptor, Bcl-2, Bax*, применом комерцијално кита (*FasteGene IC Green 2k kPCR Universal Mix*, Немачка). Реакцијска смеша је направљена за сваки циљани ген посебно додавањем мешавине forward/reverse прајмера (0,5 μL forward прајмера и 0,5 μL reverse прајмера, концентрација 10 μM) у 10 μL qPCR Master Mix-а, након чега је додато 1 μL кДНК и 8 μL воде (енгл. *Nuclease-free H₂O*). Сваки qPCR циклус је започео кораком активације полимеразе, а затим је следило 40 циклуса који се понављају. Сваки од њих се састоји од три корака: 1) денатурација ДНК на 95°C/15 сек; 2) хибридизација прајмера на 60°C/30 сек; 3) елонгација на 72°C/30 сек. Након амплификације, релативна експресија гена је израчуната коришћењем формуле:

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = \Delta\text{Ct1} - \Delta\text{Ct2}$$

ΔCt1 = разлика између вредности Ct испитиваног гена у узорку третиране групе и Ct вредности β -actin у узорку третиране групе;

ΔCt2 = разлика између вредности Ct испитиваног гена у контролној групи и Ct вредности β -actin у контролној групи.

У Табели 2. приказани су прајмери који су коришћени у истраживању.

Гени	<i>Forward sequence</i>	<i>Reverse sequence</i>
<i>Caspase 3</i>	5'- GCACCTGGTTATTATTCTTGGC - 3'	5' - GGACTCAAATTCTGTTGCCACC - 3'
<i>Caspase 9</i>	5' - ACTTTCCCAGGTTTTGTTTCC - 3'	5' - CAAGATAAGGCAGGGTGAGGG - 3'
<i>Fasreceptor</i>	5' - TGGAAATAAACTGCACCCGGA - 3'	5' - TCCTTTCTTCACCCAAACA - 3'
<i>Bcl-2</i>	5' - TCCTTTCTTCACCCAAACA - 3'	5' - GACTTCACTTGTGGCCCAGAT - 3'
<i>Bax</i>	5'- GACTTCACTTGTGGCCCAGAT - 3'	5'- CAATCATCCTCTGCAGCTCCA - 3'
<i>β-actin</i> (<i>Housekeepinggene</i>)	5'- CTCACCCTGAAGTACCCCATC - 3'	5'- CTCACCCTGAAGTACCCCATC - 3'

Табела 2. Прајмери коришћени за qRT-PCR анализу

3.7. Математички модел туморске прогресије. Модел машинског учења (ML) генетски алгоритам (GA)

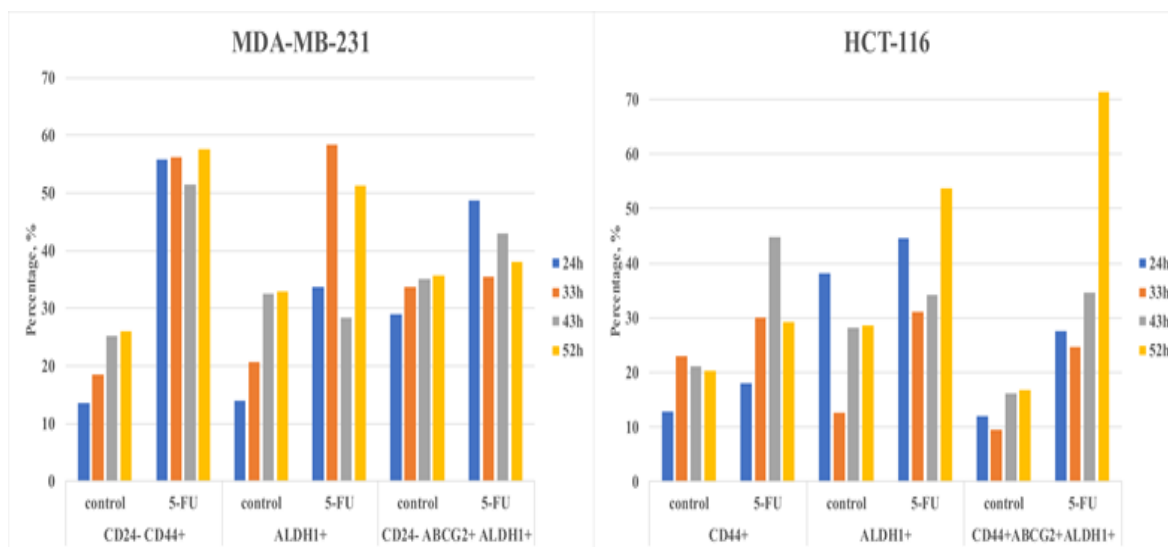
У нашој методологији компонента машинског учења користи генетски алгоритам (GA) у оквиру генетичког програмирања (GP), посебно користећи симболички регресор. Овај избор је мотивисан способношћу GP симболичког регресора да генерише математичку функцију која не само да тачно представља улазне податке већ и производи излаз који је разумљив и преносив у друге апликације или окружења.

Новина нашег приступа лежи у специфичној примени овог регресора на предвиђање експресије CSC маркера након хемиотерапије. За разлику од метода које су описали *O'Neill et al.*, наш модел укључује јединствени скуп карактеристика изведених из наших експерименталних података, који укључује не само стандардне профиле експресије гена већ и низ ћелијских одговора на третман са 5-FU. Ово омогућава нашем моделу да симулира биолошко понашање ћелија рака након хемиотерапије и прецизније предвиди динамику експресије CSC маркера током времена.

Да бисмо побољшали транспарентност и репродуктивност, пружамо детаљан опис конфигурације GA у додатним материјалима, укључујући величину популације, стопе мутација и механизме селекције. Штавише, спровели смо серију експеримената валидације да бисмо упоредили предвиђања нашег модела са емпиријским подацима, потврђујући робусност и предиктивну моћ нашег приступа.

Ови резултати показују да наш модел машинског учења може послужити као вредан алат за симулацију сложених биолошких процеса повезаних са CSC понашањем и резистенцијом на лекове. У GP-у математичка функција представљена је као стабло са листовима који служе као променљиве или константе, а функције служе као чворови (тачке гранања). Чворови имају могућност да буду различите функције са листе у скупу функција [адд, суб, мулт, див, скрт, лог, абс, нег, инв, мак, мин, син, цос и тан], а листови могу бити одређена у терминалском скупу за константне вредности дефинисаног опсега или променљивих. Чворови и листови се првенствено добијају насумично; укрштање и репродукција мутација их мењају. У циљу процене ефикасности резултата и одабира најбољих за укључивање у следећу итерацију генетског алгорита, испитана је популација деце након спроведене генетске операције. Петља је прекинута када је алгоритам достигао праг заустављања или максимални број генерација.

Принципе рада су детаљно описали и описали *O'Neill* и сарадници (17). GP није секвенцијалан или временски зависан и нема меморију. То је једноставан алгоритам који поставља претходне улазне вредности временских серија у више тачака и друге варијабле за предвиђање будуће вредности. Улазни подаци за обуку GA и уклапање коришћени су из експерименталних мерења на проточној цитометрији експресије CSC маркера у ћелијама рака третираним са 5FU и без третмана. Неколико маркера (CD24, CD44, ALDH1 и ABCG2) је мерено у времену (24 сата, 33 сата, 43 сата и 52 сата). Резултати мерења на 52 сата коришћени су за валидацију GA модела. **Фигуром 6.** приказани су измерени подаци за ћелијске линије MDA-MB-231 и HCT-116 за улазне податке.



Фигура 6. Експресије CSC маркера (*CD24*, *CD44*, *ALDH1* и *ABCG2*) у ћелијама рака третираним са 5FU и без третмана; мерено након 24 сата, 33 сата, 43 сата и 52 сата.

3.8. Статистичка анализа

Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20. Пре статистичке обраде података испитано је да ли добијене вредности имају нормалну расподелу (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). Када је број анализираних вредности већи од 50, користили смо *Kolmogorov-Smirnov* тест, а када је мањи од 50 *Shapiro-Wilk* тест. За вредности које имају нормалну расподелу коришћен је параметарски *Student*-ово тест, док у случају када вредности немају нормалну расподелу непараметарски *Mann-Whitney*-ев тест. Резултати експеримента изражени су као средња вредност $\pm$ стандардна грешка (енгл. *Standard Error*, SE). За статистички значајну разлику у добијеним вредностима између група када је $p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0.01$.

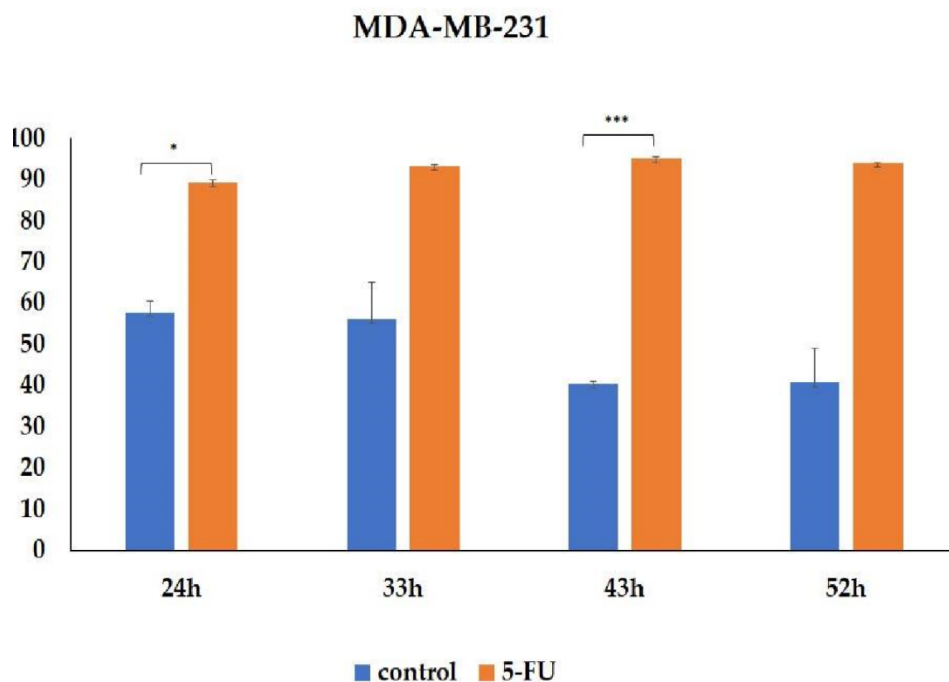
IV

РЕЗУЛТАТИ

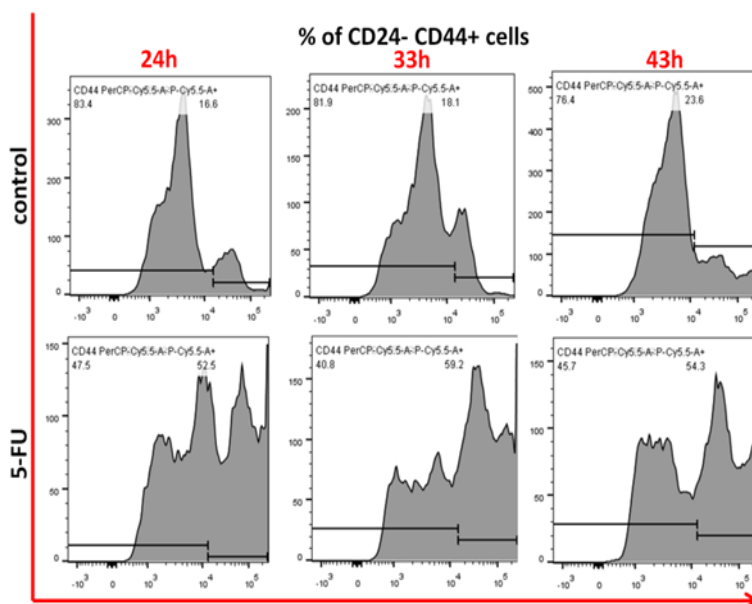
4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Маркери CSC анализирани проточном цитометријом

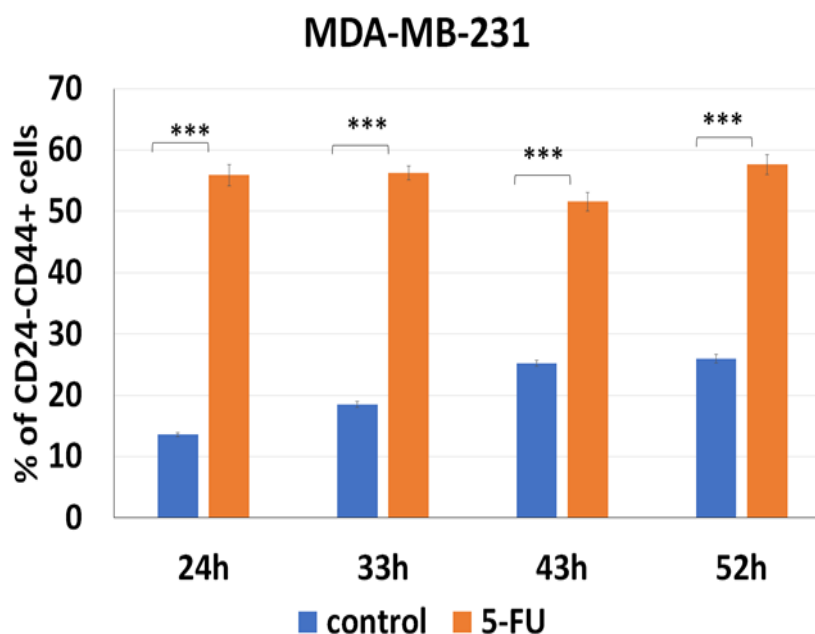
На почетку нашег истраживања процењивали смо ефекат третмана 5-FU на проценат туморских ћелија које експримирају CSC маркере. Анализа је обављена на вијабилним ћелијама MDA-MB-231, а проценти мртвих ћелија током инкубације са 5-FU и у контролама су представљени са **Фигуром 7**. Репрезентативним дот плотовима експресије CD24-CD44⁺, ALDH1 и ABCG2 маркера на MDA-MB-231 ћелијској линији (контролна група и група третирана 5-FU) приказани су **Фигуром 8**. Како је процењено проточном цитометријом, проценат CD24-CD44⁺ MDA-MB-231 ћелија третираних са 5-FU током 24-, 33-, 43- и 52 сата значајно је повећан у поређењу са нетретираним ћелијама ($p < 0.001$) (**Фигура 9.**). Поред тога, туморске ћелије третиране са 5-FU показале су високу стопу експресије за CSC маркер ALDH1 у поређењу са њиховим одговарајућим контролним ћелијама ($P < 0,001$, **Фигура 10.** и **Фигура 11.**). Иако разлика није достигла статистичку значајност у свим временским тачкама, наша анализа је открила повећано присуство CD24-ABCG2⁺ ALDH1⁺ популације након третмана 5-FU, што указује да је ова популација била отпорна на третман 5-FU хемиотерапеутиком (**Фигура 12.** и допунска **Фигура 13.**).



Фигура 7. Проценти мртвих ћелија током инкубације са 5-FU Подаци су представљени као средња вредност $\pm$ SEM три независна експеримента: * $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Графикони представљају кумулативне податке од 24 до 52 сата.

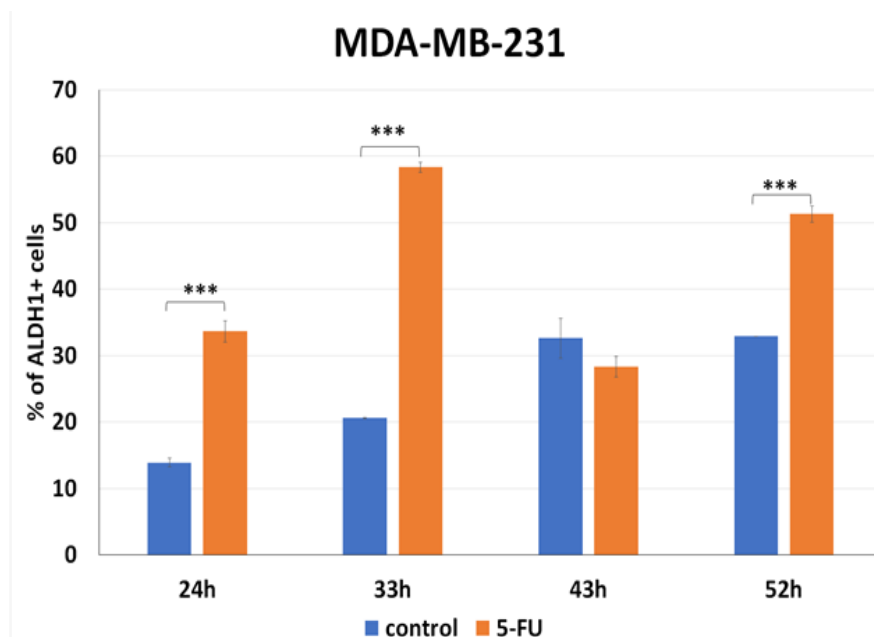


Фигура 8. Репрезентативни дот плотови CD24- CD44+ маркера на ћелијској линији MDA-MB-231 (контролна група и група третирана 5-FU). Хистограми детаљно приказују специфичну експресију маркера до 43 сата због уоченог засићења експресије маркера изнад ове тачке, што није допринело додатним увидима у ефекте третмана.

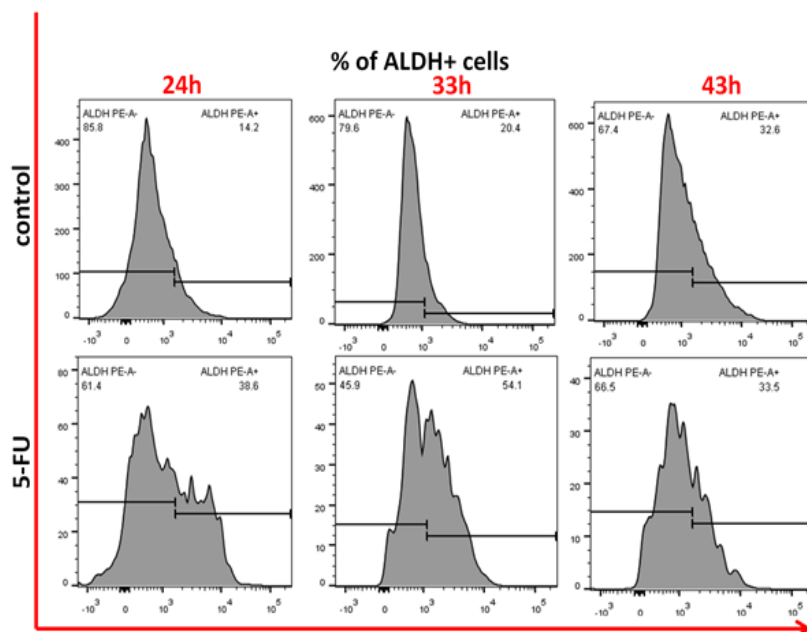


Фигура 9. Експресија CSCs маркера у MDA-MB-231 ћелијама. Проценат CD24-CD44+маркера на ћелијској линији MDA-MB-231 (контролна група и група третирана са 5-FU) анализирано проточном цитометријом. Подаци су представљени као средња

вредност $\pm$ SEM за три независна експеримента: $**p<0.01$, $***p<0.001$. Графикони представљају кумулативне податке од 24 до 52 сата.



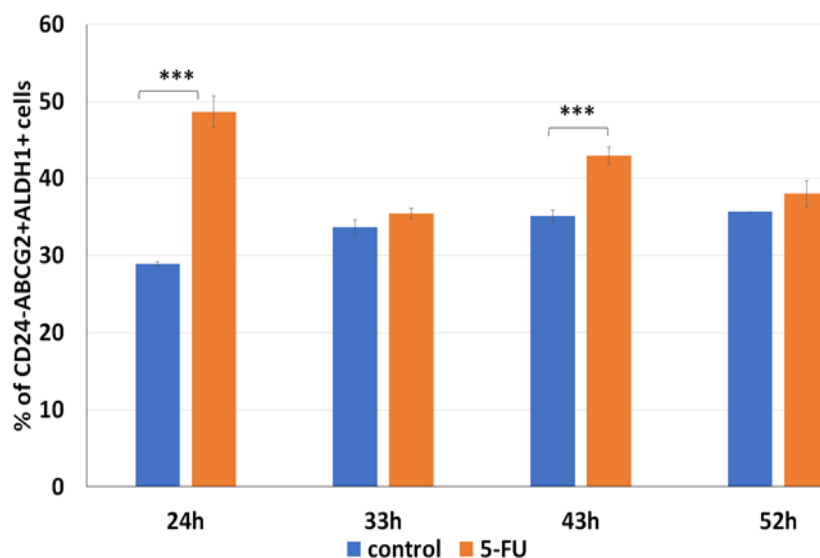
Фигура 10. Експресија CSCs маркера у MDA-MB-231 ћелијама. Проценат ALDH1+ туморских ћелија третираних и не третиране 5-FU, анализирано проточном цитометријом. Подаци су представљени као средња вредност $\pm$ SEM за три независна експеримента: $**p<0.01$, $***p<0.001$. Графикони представљају кумулативне податке од 24 до 52 сата.



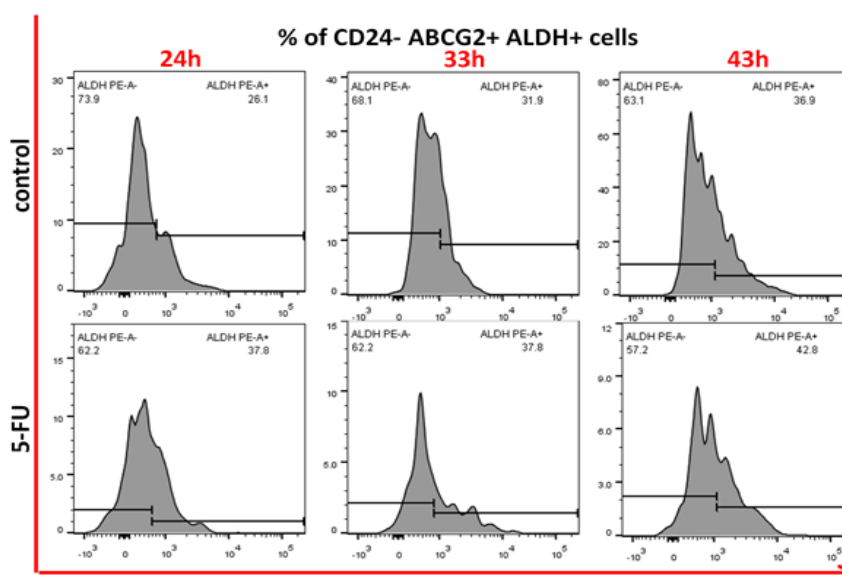
Фигура 11. Репрезентативни дот плотови експресије маркера ALDH1+ на ћелијској линији MDA-MB-231 (контролна група и група третирана са 5-FU). Хистограми

детаљно приказују специфичну експресију маркера до 43 сата због уоченог засићења експресије маркера изнад ове тачке, што није допринело додатним увидима у ефекте третмана.

MDA-MB-231



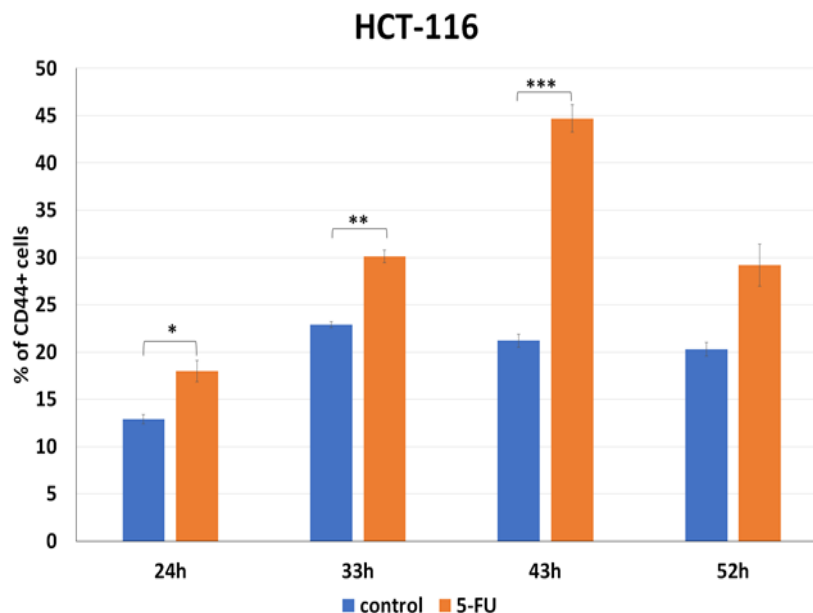
Фигура 12. Експресија CSCs маркера у MDA-MB-231 ћелијама. Проценат CD24-ABCG2+ALDH1+ туморских ћелија третираних и не третиране 5-FU, анализирано проточном цитометријом. Подаци су представљени као средња вредност $\pm$ SEM за три независна експеримента: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Графикони представљају кумулативне податке од 24 до 52 сата.



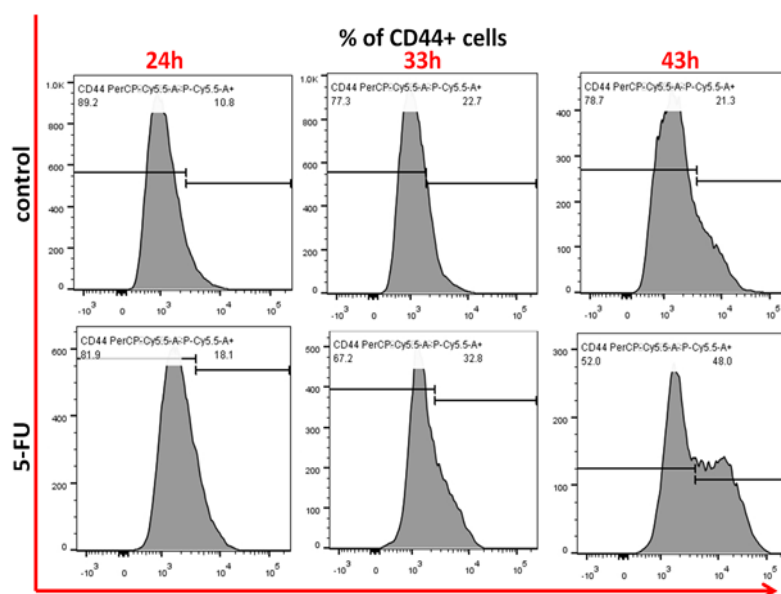
Фигура 13. Репрезентативни дот плотови експресије маркера CD24- ABCG2+ ALDH+ на ћелијској линији MDA-MB-231 (контролна група и група третирана са 5-FU). Хистограми детаљно приказују специфичну експресију маркера до 43 сата због уоченог засићења експресије маркера изнад ове тачке, што није допринело додатним увидима у ефекте третмана.

Временске тачке (**Фигура 9.** и **Фигура 8.**) приказане на графиконима и хистограмима разликују се због уочене засићености експресије маркера изван ове тачке. На пример, дуже временске тачке су укључене у графиконе (до 52 сата) да би илустровали свеукупне трендове, док су хистограми били ограничени на 43 сата да би се фокусирали на најзначајније промене у експресији маркера. Хистограми приказују експресију маркера до 43 сата, а касније је уочена засићеност уочена без додатних увида у ефекте лечења. Репрезентативни дот плотови цитометрије илуструју проценат ћелија које експримирају CSC маркере у MDA-MB-231 третираним са 5-FU у поређењу са нетретираним контролама у различитим временским тачкама. Штавише, открили смо тренд значајног повећања експресије маркера повезаних са CSC (CD44, ALDH1 и ABCG2) у ћелијама HCT-116 третираним са 5-FU током времена (24 до 52 сата). Као што је приказано **Фигурама 14.** и **15.** проценат CD44+HCT-116 ћелија значајно расте у присуству 5-FU током 24-, 33- и 43 сата. Слични обрасци експресије су примећени 52 сата након третмана, али није било значајних разлика између група.

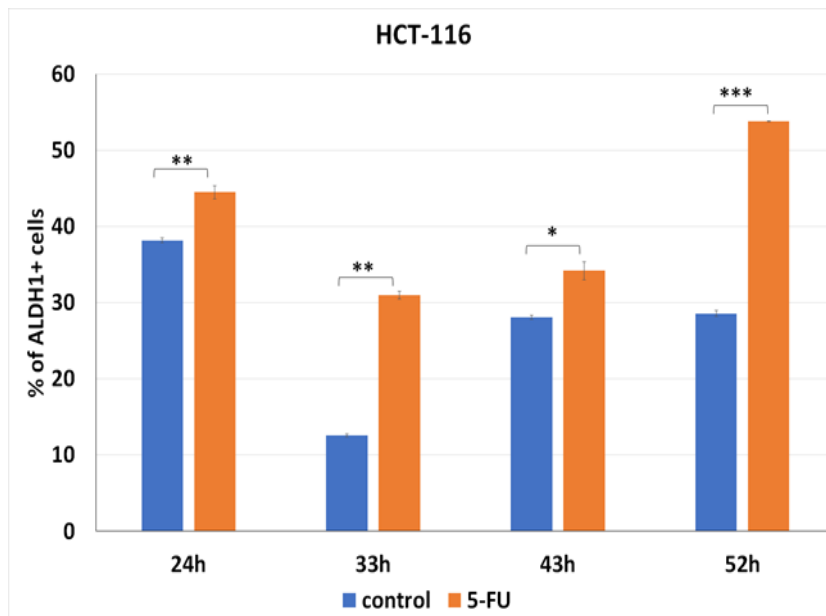
Исто се примећује и са маркером ALDH1, индикатором метастаза. Конкретно, 5-FU третман је побољшао експресију ALDH1 у поређењу са нетретираним ћелијама HCT-116 на начин који зависи од времена (**Фигуре 16.** и **17.**). Такође смо открили да се присуство CD44+ ALDH1+ ABCG2+ туморских ћелија стално повећава током времена ($p < 0,001$, **Фигуре 18.** и **19.**). После 52 сата третмана проценат популације CSC је већи него у контролним ћелијама за око 3,5 пута. Временске тачке приказане **Фигурама** од **15.** до **20.** показују варијације у графиконима и хистограмима првенствено због уочене засићености експресије маркера изнад одређеног прага. Да би се разјаснило, графикони обухватају продужене временске интервале да би приказали свеобухватне трендове, док су хистограми ограничени на 43 сата, наглашавајући најупечатљивије промене у експресији маркера. Конкретно, графикони илуструју експресију маркера до 43 сата јер након ове тачке засићење експресије маркера није дало даљи увид у ефекте третмана. Дот плотови проточне цитометрије који показују стратегију гејтинга која се користи за идентификацију CD44+, ALDH1+ и CD44+ABCG2+ALDH1+HCT-116 ћелија третираних са 5-FU 24, 33, 43 и 52 сата након третмана.



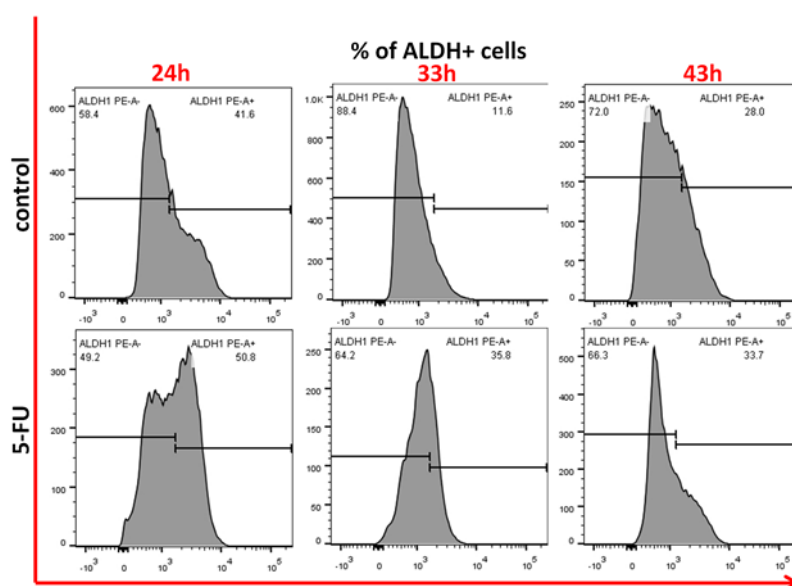
Фигура 14. Експресија CSCs маркера у HCT-116 ћелијама. Проценат CD44+маркера на ћелијској линији HCT-116 (контролна група и група третирана са 5-FU) анализирано проточном цитометријом. Подаци су представљени као средња вредност $\pm$ SEM за три независна експеримента: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Графикони представљају кумулативне податке од 24 до 52 сата.



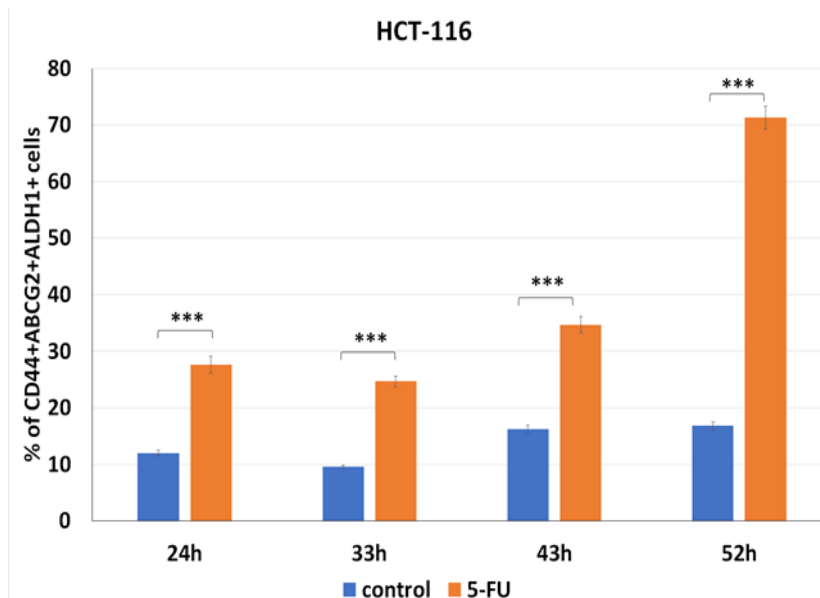
Фигура 15. Репрезентативни дот плотови CD44+ маркера на ћелијској линији НСТ-116 (контролна група и група третирана са 5-FU). Хистограми детаљно приказују специфичну експресију маркера до 43 сата због уоченог засићења експресије маркера изнад ове тачке, што није допринело додатним увидима у ефекте третмана.



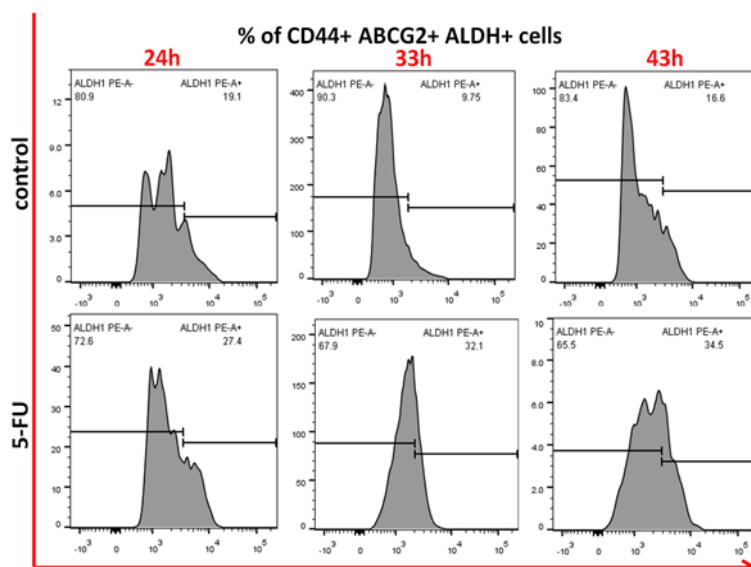
Фигура 16. Експресија CSCs маркера у НСТ-116 ћелијама. Проценат ALDH1+ туморских ћелија третираних и не третиране 5-FU, анализирано проточном цитометријом. Подаци су представљени као средња вредност $\pm$ SEM за три независна експеримента: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Графикони представљају кумулативне податке од 24 до 52 сата.



Фигура 17. Репрезентативни дот плотови експресије маркера ALDH1+ на ћелијској линији HCT-116 (контролна група и група третирана са 5-FU). Хистограми детаљно приказују специфичну експресију маркера до 43 сата због уоченог засићења експресије маркера изнад ове тачке, што није допринело додатним увидима у ефекте третмана.



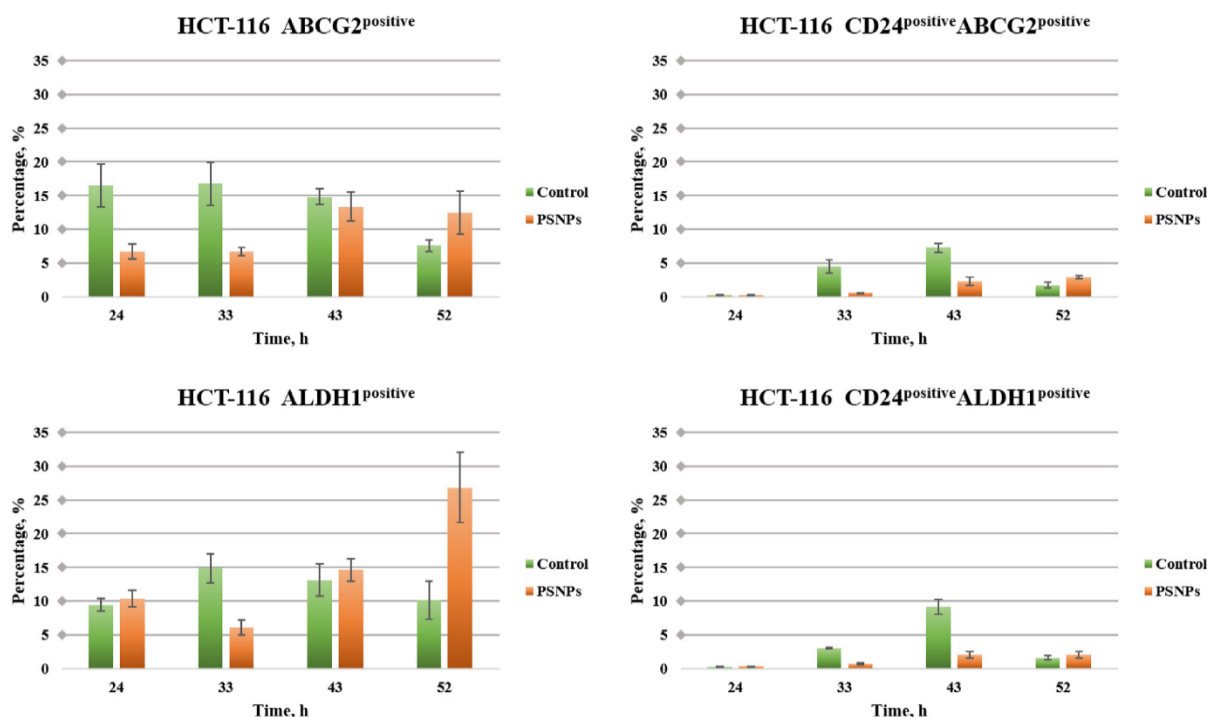
Фигура 18. Експресија CSCs маркера у HCT-116 ћелијама. Проценат CD24-ABCG2+ALDH1+ туморских ћелија третираних и нетретираних 5-FU, анализирано проточном цитометријом. Подаци су представљени као средња вредност $\pm$ SEM за три независна експеримента: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Графикони представљају кумулативне податке од 24 до 52 сата.



Фигура 19. Репрезентативни дот плотови експресије маркера CD24- ABCG2+ ALDH+ на ћелијској линији HCT-116 (контролна група и група третирана са 5-FU). Хистограми детаљно приказују специфичну експресију маркера до 43 сата због уоченог засићења експресије маркера изнад ове тачке, што није допринело додатним увидима у ефекте третмана.

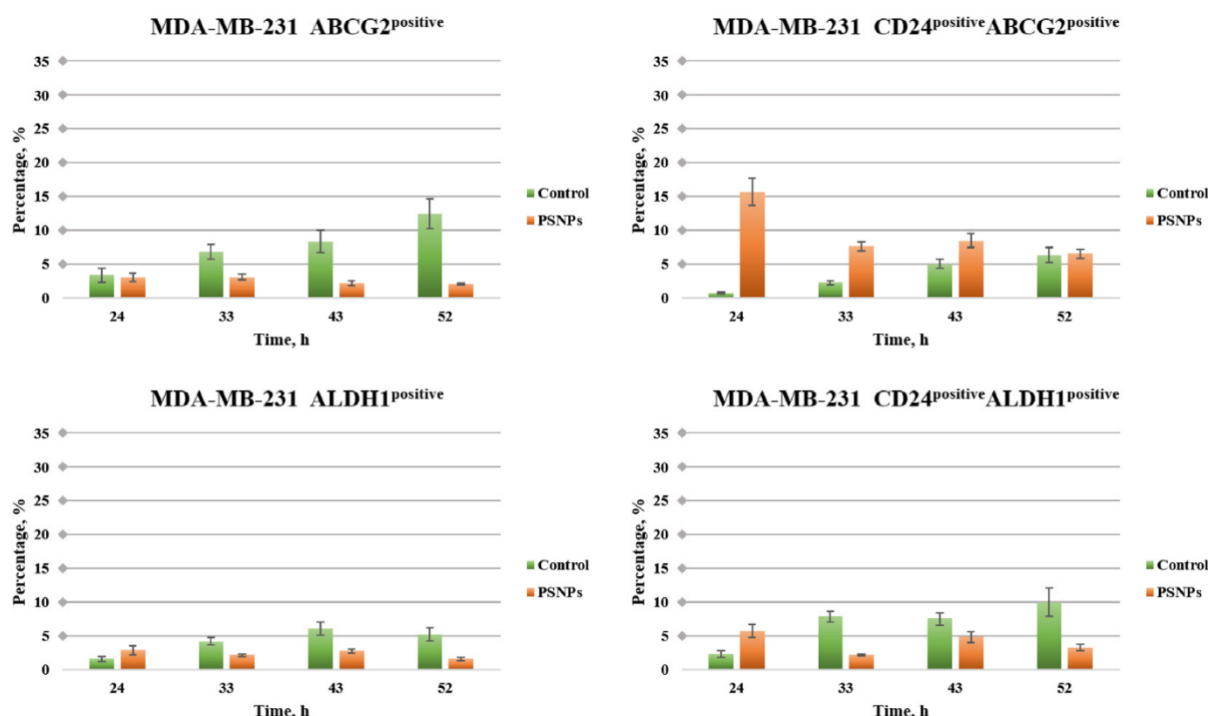
4.1.1. Маркери CSC анализирани проточном цитометријом код ћелија третираних PSNP

PSNPs у раним периодима инкубације током третмана ћелија HCT-116 изазивају смањење, док у каснијим периодима (43 и 52 сата од третмана) индукују повећање маркера ABCG2 (**Фигура 20.**). Уочен је тренд значајног повећања експресије ABCG2 са временом. Исто се примећује и са маркером ALDH1, који се током времена стално повећава. После 52 сата третмана експресија маркера ALDH1, индикатора метастаза, већа је него у контролним ћелијама за око 2,5 пута. CD24+/ ABCG2+ субпопулација у ћелијама HCT-116 такође расте стално и значајно током времена. До 43 сата од третмана детектована субпопулација је већа у контролним ћелијама, док је после 52 сата ова субпопулација значајно заступљенија у ћелијама третираним PSNP. CD24+/ALDH1+ субпопулација у третману PSNP расте у првим периодима лечења, али у каснијим периодима ова популација се стабилизује и генерално није значајно израженија него у контролним.

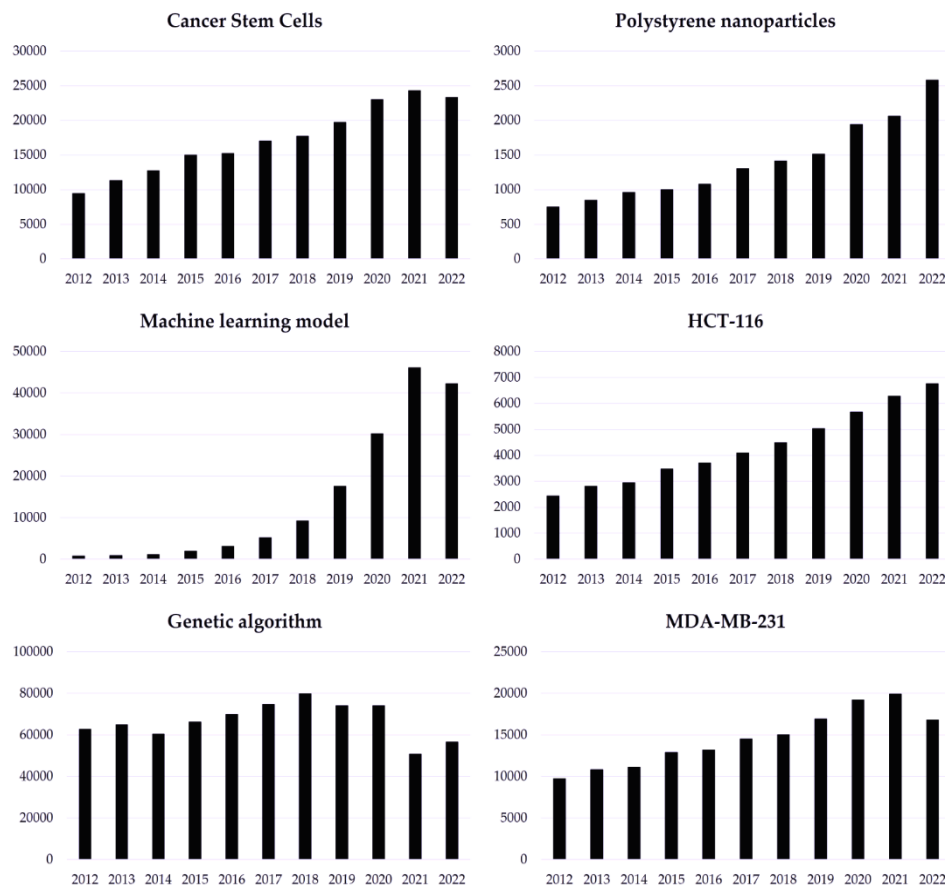


Фигура 20. Ефекти PSNPs на брзину експресије CSC маркера у ћелијама HCT-116. Брзина експресије нетретираних, као и ћелија третираних са PSNPs, анализирана проточном цитометријом. Подаци су представљени као средња вредност $\pm$ СЕМ три независна експеримента.

У ћелијама MDA-MB-231, за разлику од ћелија HCT-116, приметили смо у третману PSNPs да се ABCG2 маркер смањује током времена и да је све време значајно нижи него у контролним ћелијама (**Фигура 21.**). Исто важи и за експресију маркера ALDH1, која такође опада током времена и статистички је значајно нижа него у контролним ћелијама. Опет, за разлику од ћелија HCT-116, у ћелијама MDA-MB-231 CD24 +/ ABCG2+ субпопулација има највећи акутни ефекат (тј. након 24 сата третмана). У каснијим периодима инкубације ова субпопулација је значајно мање али стабилно заступљена и израженија него у контролним ћелијама. Субпопулација CD24 +/ ALDH1+ у третману PSNPs у ћелијама MDA-MB-231 била је најзначајније изражена на почетку третмана (24 сата), док је касније константно опадала и била мање изражена него у контролним ћелијама. Удео експресије ћелијских маркера у ћелијским популацијама HCT-116 и MDA-MB-231 представљен је **Фигуром 22.**



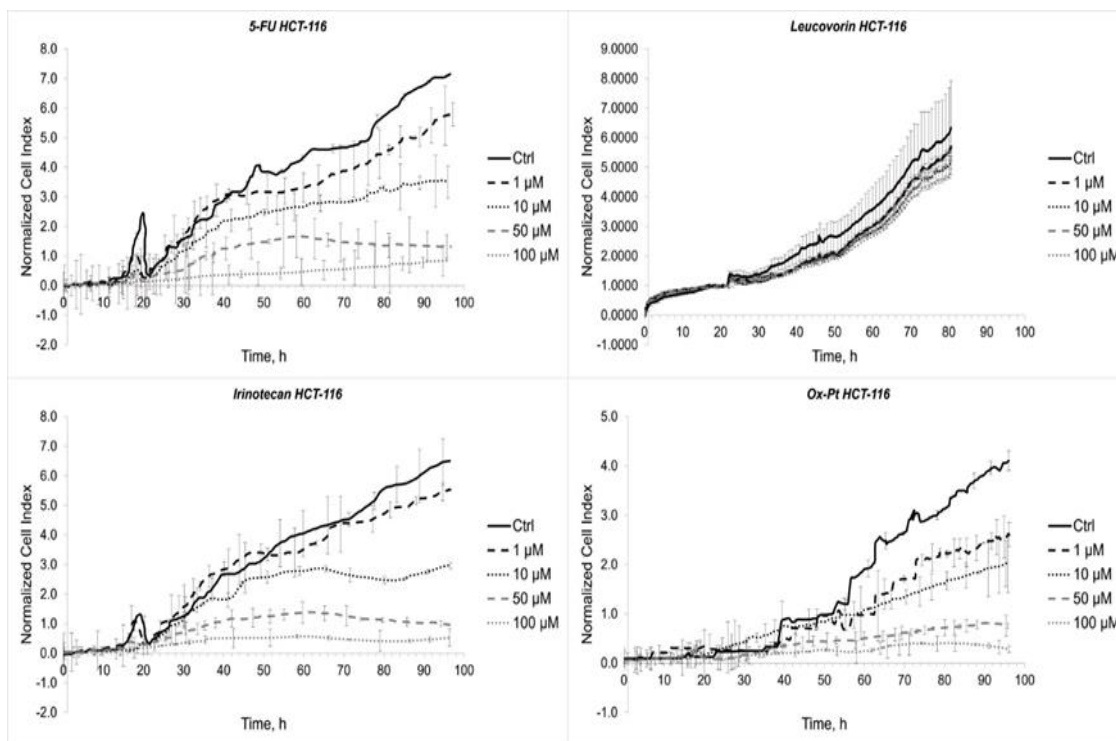
Фигура 21. Ефекти PSNPs на брзину експресије CSC маркера у ћелијама MDA-MB-231. Брзина експресије нетретираних, као и ћелија третираних са PSNPs, анализирана проточном цитометријом. Подаци су представљени као средња вредност $\pm$ СЕМ три независна експеримента.



Фигура 22. Удео експресије ћелијских маркера у ћелијским популацијама НСТ-116 и МДА-МВ-231

4.2. Одређивање ћелијске вијабилности у реалном времену – RTC (*eng. Real Time Cell Analises*)

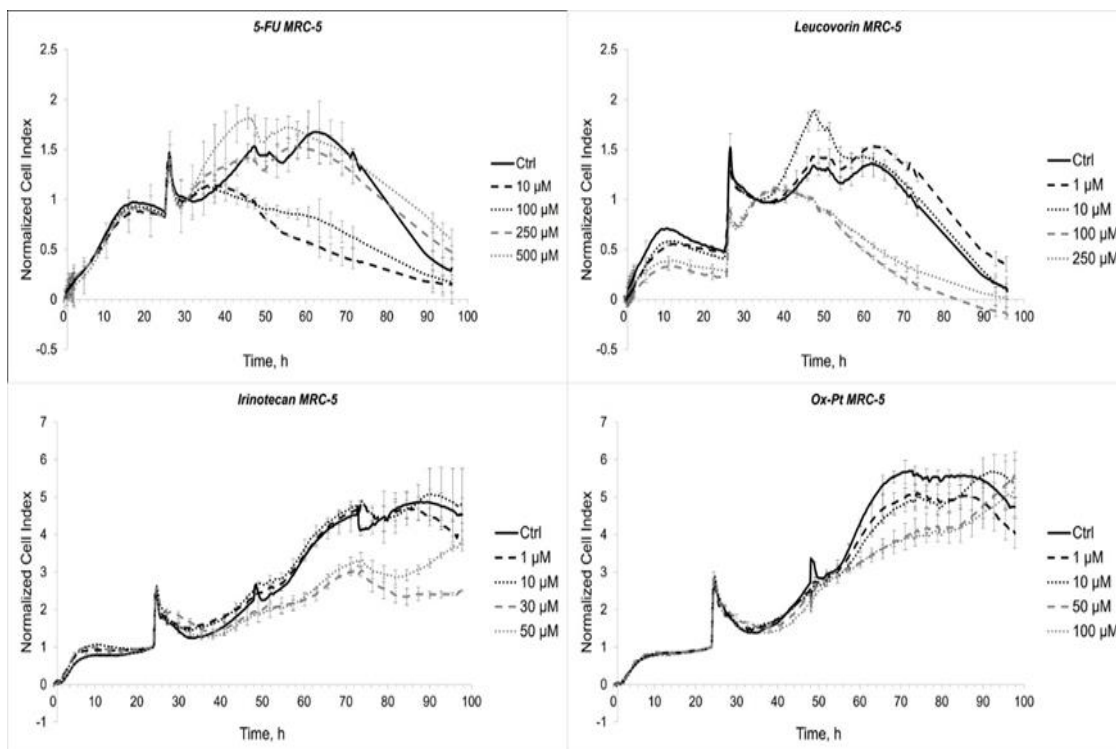
За праћење виталности ћелија у великом броју временских тачака у (реалном) времену користили смо RTC методу. У третману ћелија НСТ-116 са 5-FU добили смо значајан одговор третираних ћелија у смислу смањења вијабилности ћелија на начин који зависи од дозе. Сличан резултат смањене вијабилности ћелија примећен је у ћелијама НСТ-116 и третману леуковорином, иринотеканом и оксалиплатином (Фигура 23.).



Фигура 23. Кинетика нормализованог ћелијског индекса (NCI) HCT-116 ћелија изложених хемиотерапеутицима у поређењу са контролом (нетретиране ћелије). Временски и дозно зависно смањење NCI, смањење вијабилности ћелија.

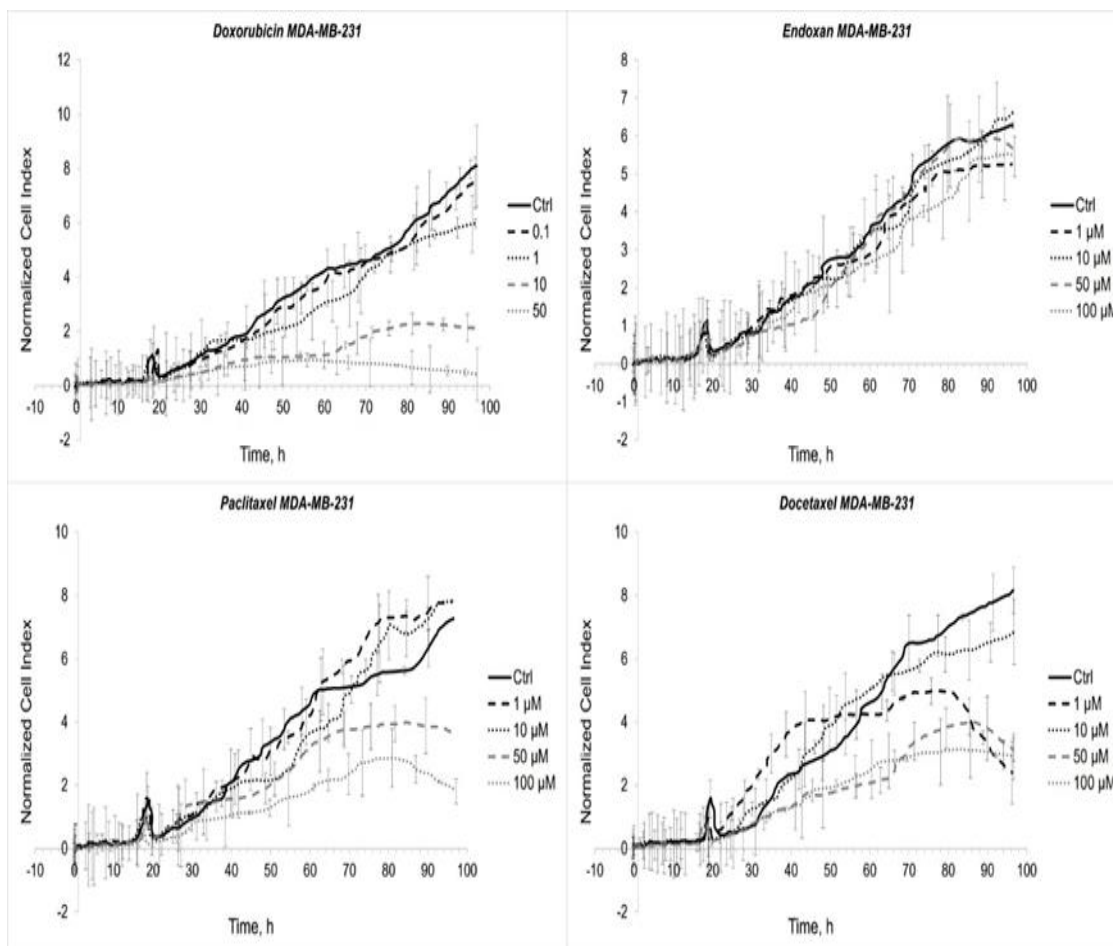
Најзначајније смањење вијабилности добијено је у третману 5-FU и оксалиплатином, док су леуковорин и иринотекан показали најмање значајан утицај на вијабилност ћелија. Поређења ради са резултатима ова 4 хемиотерапеутика на здравим MRC-5 ћелијама, приметили смо сличан цитотоксични ефекат са 5-FU у нижој концентрацији (10 μM), док примена веће концентрације (100 μM) (Фигура 24.) показује значајно нижу цитотоксичност код здравих ћелија у поређењу са карциномом дебелог црева (Фигура 23.), што указује на значајну селективност 5-FU, што је једна од карактеристика због којих се овај лек користи у клиничкој пракси.

Леуковорин показује мању селективност према ћелијама HCT-116, посебно у вишим концентрацијама. Иринотекан показује значајно нижу цитотоксичност према MRC-5 ћелијама и свакако јаку селективност. Можда најзначајнији резултат добијен је применом оксалиплатина, где је постигнут изузетан резултат селективности према HCT-116 ћелијама. Резултати деловања ових лекова на ћелије MRC-5 приказани су Фигуром 24., док су ефекти на рак дебелог црева приказани Фигуром 23.



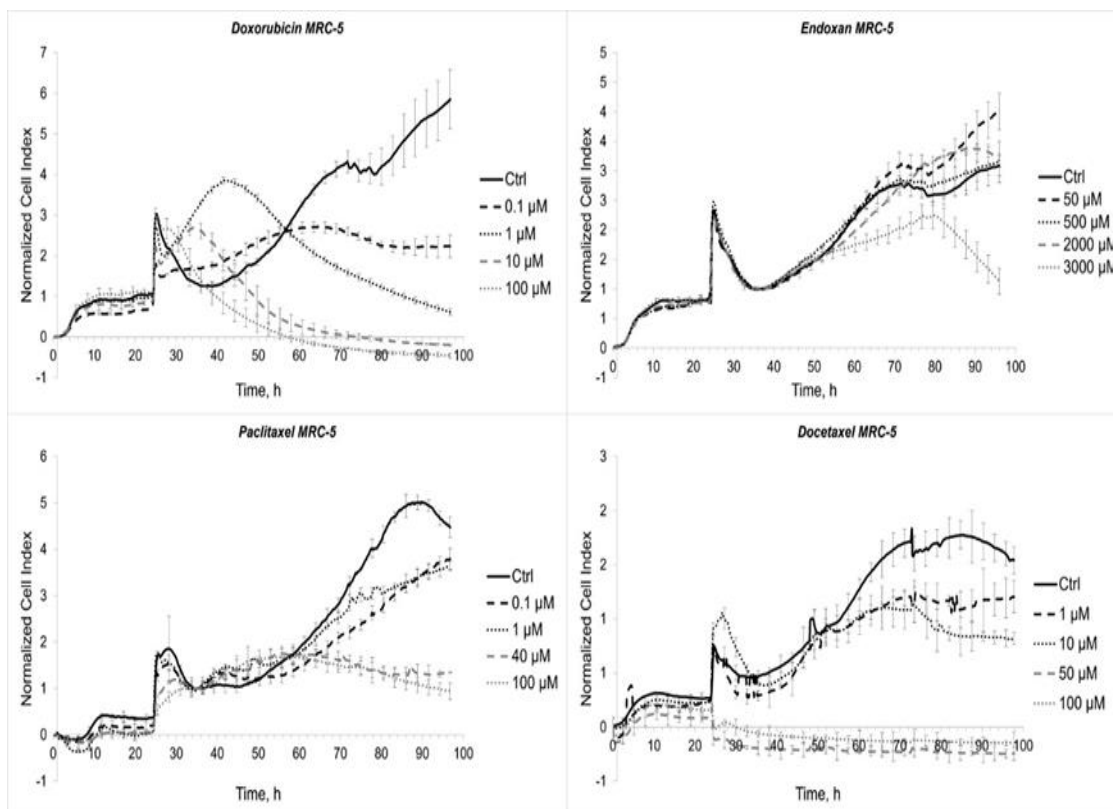
Фигура 24. Кинетика нормализованог ћелијског индекса (NCI) ћелија MRC-5 изложених хемиотерапеутицима у поређењу са контролом (нетретиране ћелије). Временски и дозно зависно смањење NCI, смањење вијабилности ћелије.

Узимајући у обзир употребу доксорубицина, ендоксана, паклитаксела и доцетаксела против ћелија рака дојке MDA-MB-231 и упоређујући их са ефектом на здраве MRC-5 ћелије, дошли смо до сличних занимљивих закључака. Чак и најниже примењене концентрације доксорубицина (0,1 и 1 μM) показују значајан цитотоксични ефекат, док веће концентрације (10 и 50 μM) показују изузетно цитотоксично дејство, што се и очекује у складу са природом примењеног лека. Ендоксан, с друге стране, показује значајно ниже цитотоксичне ефекте, посебно у нижим концентрацијама (1 и 10 μM). Паклитаксел и доцетаксел показују значајан цитотоксични карактер на начин који зависи од времена и дозе на ћелијама MDA-MB-231 (Фигура 25.).



Фигура 25. Кинетика нормализованог ћелијског индекса (NCI) MDA-MB-231 изложеног хемиотерапеутици у поређењу са контролом (нетретиране ћелије). Смањење NCI у зависности од дозе и времена, а тиме и виталности ћелија.

Употреба ових лекова показује да су здраве ћелије посебно осетљиве на третман доксорубицином и доцетакселом (нарочито после 72 сата третмана) (**Фигура 26.**). Као и ћелије MDA-MB-231, ендоксан не показује значајну цитотоксичност на MRC-5 ћелијама. У третману паклитакселом ћелије MRC-5 показују значајну резистенцију осим у највишој дози, после 72 сата третмана.



Фигура 26. Кинетика нормализованог ћелијског индекса (NCI) ћелија MRC-5 изложених хемиотерапеутицима коришћеним у терапији карцинома дојке у поређењу са контролом (нетретиране ћелије). Временски и дозно зависно смањење NCI, смањење вијабилности ћелија.

4.3. Анализа експресије гена

Ради бољег разумевања молекуларних механизма откривеног процеса апоптозе у лечењу предложеним хемиотерапеутицима, испитани су параметри гена укључених у ове процесе. У том смислу је анализиран скуп гена који су стандардно укључени у процесе апоптозе: *Bcl-2*, *Bax*, *Caspase3*, *Caspase9*, and *Fas*. У ћелијама HCT-116 (Табела 3.) *Bcl-2* и *Bax* гени показују повећану експресију што указује да ови хемиотерапеутици индукују апоптозу на начин који зависи од дозе и времена.

Ако узмемо у обзир апсолутне бројке и усклађеност са другим методама, закључујемо да ово повећање траје за огромну већину третмана, али не за све. Међутим, важно је приметити да је тренд биолошке евалуације у значајнијој сагласности. Ово повећање није равномерно. Иринотекан и посебно оксалиплатин изузетно снажно индукује повећање експресије ова два гена. У MRC-5 ћелијама, с

друге стране, такође примећујемо снажан одговор гена у смислу повећане експресије ова два гена, посебно са иринотеканом и 5-FU. У ћелијама MDA-MB-231 експресија *Bcl-2* и *Bax* гена је генерално јаче изражена у поређењу са ћелијама HCT-116 (осим у лечењу доцетаксолом). Лекови за лечење рака дојке примењени на здраве ћелије, такође, указују на значајну индукцију транскрипције ова два гена, али у мањој мери него у ћелијама рака. Анализом друге групе гена (*Caspase3* и *Caspase9*) фокусирали смо се на расветљавање питања пута иницијације процеса апоптозе. Тако смо закључили да *Caspase3* у HCT-116 показује умерено повећану експресију у зависности од дозе и времена, док *Caspase 9* углавном показује снажан али акутни ефекат, односно већу експресију након 24 сата (Табела 3.). За поређење, у MRC-5 ћелијама ова 4 лека показују још значајнију експресију *Caspase 3*, док *Caspase 9* показује флукутирајућу и нижу експресију. Слично, у ћелијама MDA-MB-231 испитивани лекови индукују експресију ова два гена генерално на начин који зависи од дозе и времена.

С друге стране, лекови за лечење рака дојке који се користе у здравим MRC-5 ћелијама такође показују снажан ефекат на експресију ова два гена. Коначно, након испитивања гена одговорних за извршење апоптозе (*Bcl-2* и *Bax*) и гена који указују на јак унутрашњи пут апоптозе (*Caspase 3*, *Caspase 9*), такође смо испитали експресију гена *Fas* рецептора одговорног за спољашњи пут апоптозе. Резултати на све три ћелијске линије указују на доминантно смањење или благу флукутацију експресије *Fas* гена, што указује да спољашњи пут апоптозе није фаворизован у овим третманима.

		HCT-116										MRC-5									
		<i>Bcl</i>		<i>Bax</i>		<i>Cas3</i>		<i>Cas9</i>		<i>Fas</i>		<i>Bcl</i>		<i>Bax</i>		<i>Cas3</i>		<i>Cas9</i>		<i>Fas</i>	
		24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
5-FU	10 μ M	5.86	4.13	1.10	3.10	1.20	5.50	7.20	0.80	0.70	0.01	4.84	150.64	3.75	1.64	26.21	9.06	1.89	2.46	0.69	0.89
	100 μ M	5.36	7.26	0.70	1.50	1.40	2.10	17.90	0.50	0.40	0.40	1.66	3.87	36.25	7.38	25.35	7.58	3.22	3.40	1.12	1.14
Leucovorin	10 μ M	5.45	5.98	2.10	0.70	0.46	0.54	0.94	1.24	0.43	0.38	3.94	2.58	0.75	1.68	17.46	40.20	0.66	1.72	0.01	0.03
	100 μ M	4.80	7.42	5.70	11.40	10.66	3.40	9.72	0.93	1.57	1.96	6.17	17.17	25.21	8.82	64.04	153.92	1.99	8.63	0.02	0.48
Irinotecan	10 μ M	19.90	40.30	0.25	0.92	1.56	13.97	2.19	16.35	0.44	0.16	0.10	4.29	29.67	15.75	3.16	3.48	2.22	0.74	0.02	1.65
	50 μ M	70.20	142.60	0.23	2.22	2.86	7.62	0.57	8.17	0.58	0.79	20.53	39.72	240.35	14.84	21.61	19.45	14.44	5.72	0.16	2.17
Ox-Pt	10 μ M	309.30	764.30	13.90	2.60	0.01	15.00	35.48	16.81	2.20	3.49	3.16	8.13	1.00	3.14	2.19	39.34	0.58	3.16	0.02	0.01
	100 μ M	660.30	250.40	29.30	0.60	1.30	5.30	36.23	2.81	2.40	0.85	8.22	24.29	6.80	17.55	2.18	49.38	0.60	0.89	0.05	0.54

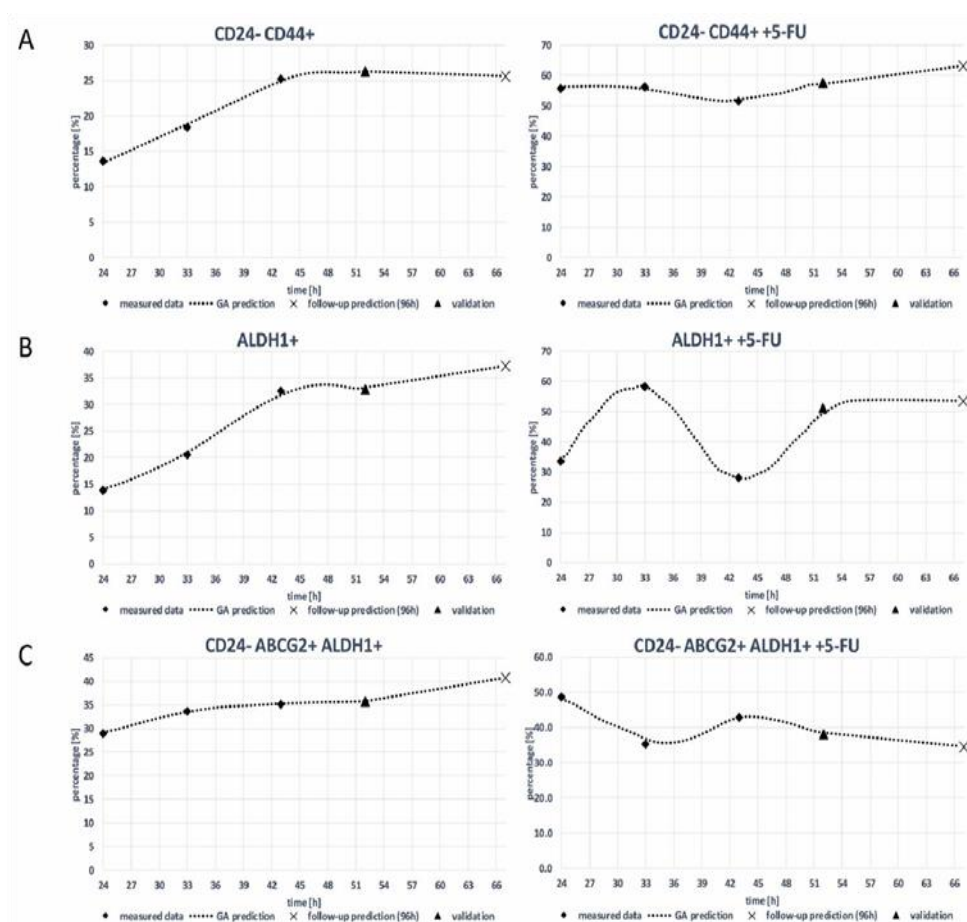
		MDA-MB-231										MRC-5									
		<i>Bcl</i>		<i>Bax</i>		<i>Cas3</i>		<i>Cas9</i>		<i>Fas</i>		<i>Bcl</i>		<i>Bax</i>		<i>Cas3</i>		<i>Cas9</i>		<i>Fas</i>	
		24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
Doxorubicin	0.1 μ M	2.35	22.75	0.05	2.44	0.01	6.27	2.65	9.21	0.01	1.58	17.45	10.77	7.54	10.54	3.29	1.87	3.10	1.83	0.79	1.22
	1 μ M	0.05	22.88	0.08	1.72	10.72	5.91	3.46	5.05	0.01	1.68	4.91	17.64	6.07	5.30	9.67	11.54	2.83	3.55	0.88	0.77
Endoxan	50 μ M	8.36	1.37	0.70	0.03	0.01	0.03	17.35	0.20	0.01	0.04	8.96	20.75	2.97	5.78	4.23	20.59	2.35	4.71	0.19	1.63
	500 μ M	1.08	40.00	1.08	27.51	1.02	13.10	3.59	40.00	0.01	0.62	8.13	28.98	7.45	14.91	21.21	29.77	4.66	7.62	0.73	2.21
Paclitaxel	1 μ M	1.72	50.00	0.44	11.20	12.08	45.29	0.77	15.17	0.02	10.16	3.36	12.14	3.36	8.54	1.12	13.04	0.82	2.88	0.02	0.13
	100 μ M	0.01	67.23	0.56	7.15	4.89	39.12	0.42	5.42	0.01	0.88	6.09	13.61	5.08	9.08	5.94	18.16	1.25	4.36	0.01	0.27
Docetaxel	10 μ M	0.19	3.10	0.37	0.12	4.32	1.61	0.72	0.64	6.99	0.72	5.08	22.50	7.50	9.06	0.03	0.33	1.93	3.14	0.15	0.16
	100 μ M	8.49	1.34	2.86	1.31	11.38	3.42	1.79	4.25	1.66	0.58	1.40	18.33	7.96	6.23	18.23	6.53	6.87	3.24	0.35	0.25

Табела 3. Релативна експресија различитих гена у ћелијама HCT-116, MDA-MB-231 и MRC-5 након третмана хемотерапеутицима. Резултати експресије гена су

представљени као кратка промена у експресији mRNA у циљном узорку, нормализоване на референтни ген и у односу на контролни узорак.

4.4. Генетски алгоритам (GA)

Стварни измерени подаци за MDA-MB-231 ћелијску линију од 24 сата до 43 сата (романтске тачке) и процена GA (испрекидана крива) за период од 24 сата до 67 сати приказани су **Фигуром 27**. Измерени подаци за 52 сата (троугла тачка) коришћени су за валидацију GA модела одлучивања, а резултати предвиђања праћења од 67 сати су представљени као Кс тачке на графику. **Табела 4.** представља резултат процене алгоритма са R2.

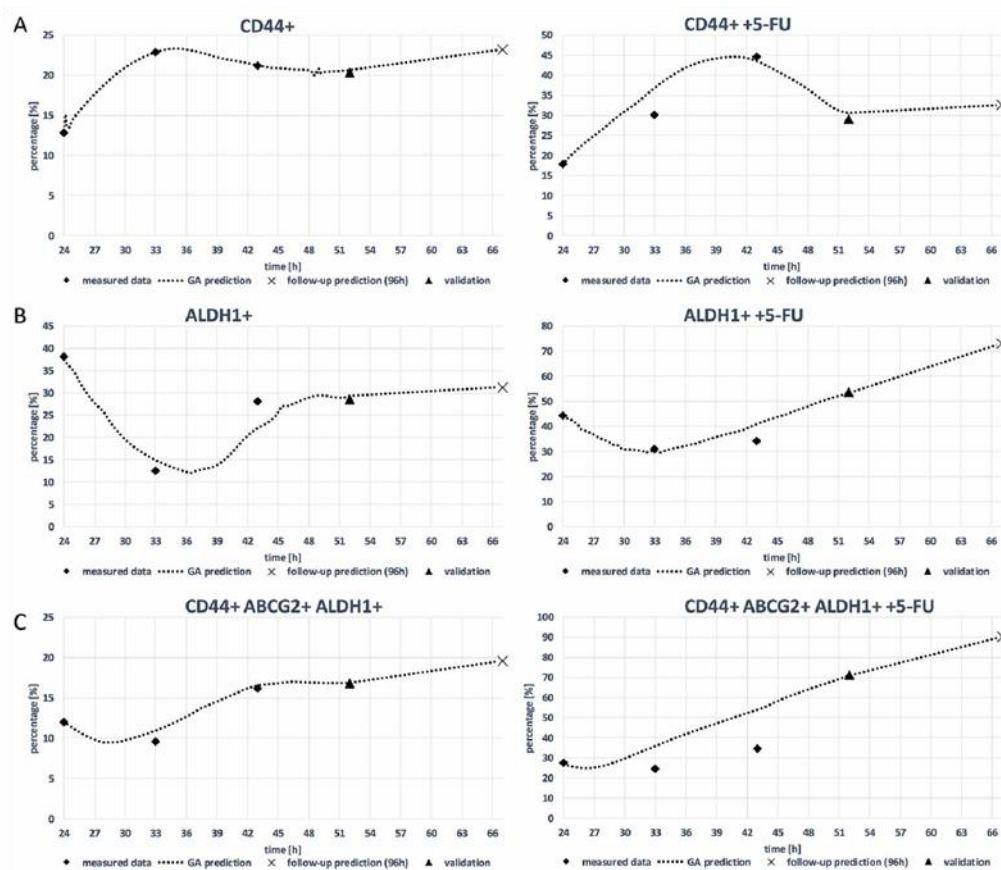


Фигура 27. GA предвиђање брзине експресије CSC маркера.
(A) CD24- CD44+, (B) ALDH1+ и (C) CD24- ABCG2+ALDH1+ на MDA-MB-231 ћелијској линији третираних и нетретираних 5-FU.

Model	R ² —результат предвиђања
MDA-MB-231 CD24- CD44+	0.97
MDA-MB-231 CD24- CD44+ + 5-FU	0.98
MDA-MB-231 ALDH1+	0.96
MDA-MB-231 ALDH1+ + 5-FU	0.98
MDA-MB-231 CD24- ABCG2+ ALDH1+	0.95
MDA-MB-231 CD24- ABCG2+ ALDH1+ + 5-FU	0.96
HCT-116 CD44+	0.97
HCT-116 CD44+ + 5-FU	0.97
HCT-116 ALDH1+	0.98
HCT-116 ALDH1+ + 5-FU	0.93
HCT-116 CD44+ ABCG2+ ALDH1+	0.96
HCT-116 CD44+ ABCG2+ ALDH1+ + 5-FU	0.95

Табела 4. Резултат предвиђања (R²)

Фигура 28. приказује предвиђене стопе експресије три маркера матичних ћелија рака (CSC). CD44+, ALDH1+, и CD44 + ABCG2 + ALDH1+ у HCT-116 cell ћелијској линији, са и без третмана 5-FU, како је предвиђено коришћењем генетског дрво одлучивања алгоритма (GA). GA стабло одлучивања је алгоритам машинског учења који је обучен на скупу података података о експресији гена из ћелија HCT-116. GA стабло одлучивања може се користити за предвиђање експресије CSC маркера у новим HCT-116 ћелијама на основу њиховог профила експресије гена. Ова фигура илуструје резултате предиктивног моделирања стопа експресије CSC маркера у ћелијским линијама HCT-116 након третмана са 5-FU, као што је одређено коришћењем стабла одлучивања генетског алгоритма (GA). GA модел, обучен на подацима о експресији гена из ћелија HCT-116, даје прогнозу нивоа CSC маркера, нудећи увид у потенцијалне обрасце резистенције након хемиотерапије. Штавише, *goodness of fit* (добро уклапање) за предвиђање модела GA је квантификована помоћу R² вредности, које су дате уз сваки дијаграм. На пример, вредност R² од 0,96 указује на висок ниво тачности у моделском предвиђању експресије CSC маркера на ознаци од 52 сата. Одговарајуће вредности R² за сваку временску тачку и комбинацију маркера су детаљно приказане **Фигуром 28.**, обезбеђујући метрику за поузданост предвиђања направљених од стабала одлука GA.



Фигура 28. GA предикција експресије CSCs маркера.

(A) CD44+, (B) ALDH1+ и (C) CD44+ ABCG2+ALDH1+ на HCT-116 ћелијској линији третираној и нетретираној са 5-FU.

Визуелизације и подаци представљени на **табелама 4. и 5.** не само да омогућавају процену предиктивне моћи GA модела, већ такође олакшавају дубље разумевање динамичких промена у експресији CSC маркера као одговор на хемиотерапеутски третман. **Табела 1.** представља резултате P2 за различите моделе и услове третмана на ћелијским линијама MDA-MB-231 и HCT-116, што указује на добро уклапање између модела и стварних података. Више вредности R^2 сугеришу боље перформансе модела.

У моделу MDA-MB-231:

- Модел CD24-CD44+ показује висок R^2 резултат од 0,97;

- Увођење 5-FU у моделу CD24-CD44+ побољшава R^2 на 0,98;
- У моделу ALDH1+ R^2 има вредност је 0,96, док се додавањем 5-FU повећава на 0,98;
- У моделу CD44 + ABCG2+ ALDH1+ модел показује вредност R^2 од 0,95, при чему 5-FU побољшава резултат на 0,96.

У моделу HCT-116:

- Модел CD44+има вредност R^2 од 0,97; није наведена вредност R^2 за модел CD44+са додатком 5-FU;
- Модел ALDH1+ показује вредност R^2 од 0,97, а 5-FU је повећава на 0,98;
- Модел ALDH1+ показује смањење вредности R^2 (0,93) након третмана са 5-FU;
- Модел CD44 + ABCG2+ ALDH1+ има вредност R^2 од 0,96 при чему 5-FU побољшава резултат на 0,95.

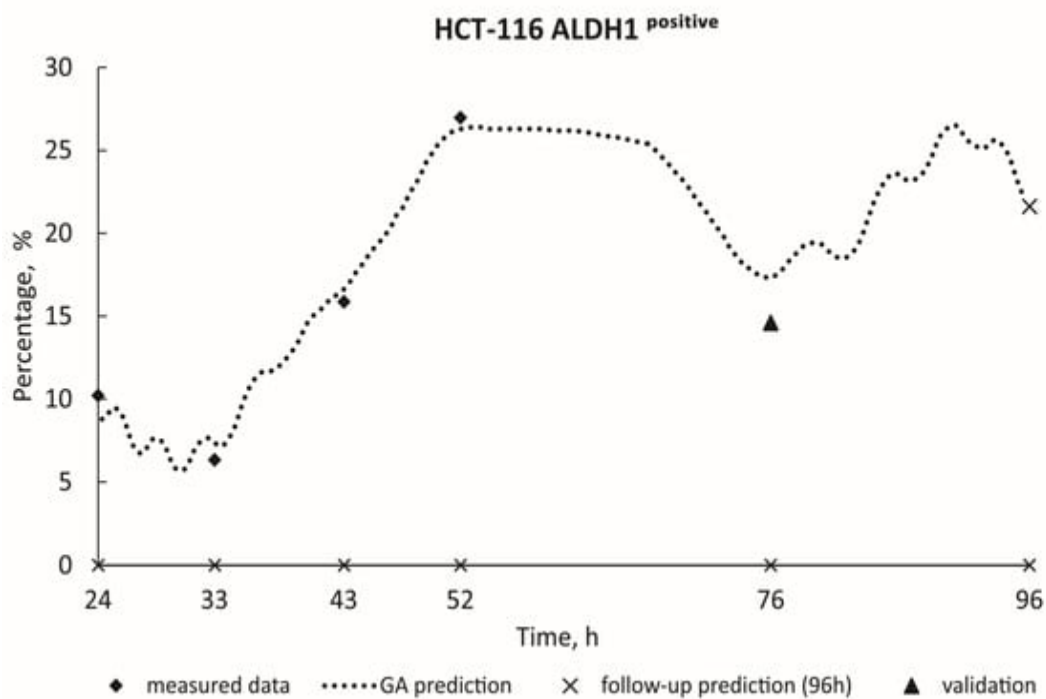
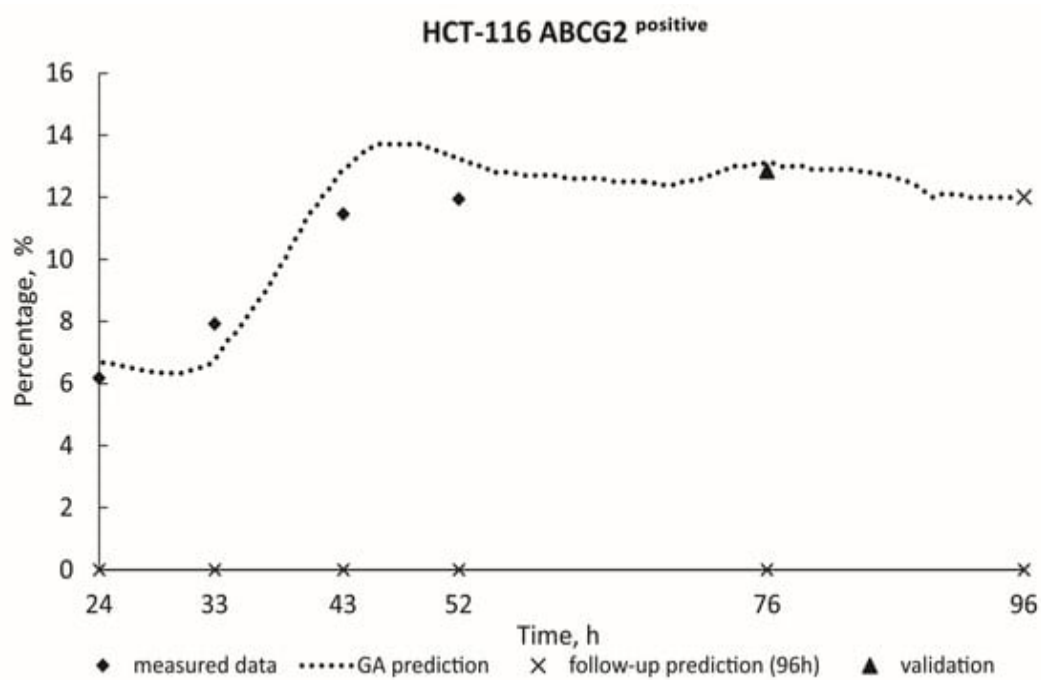
Додавање 5-FU често повећава вредности R^2 , што указује на позитиван утицај на тачност модела у процени експресије маркера на површини ћелија. Међутим, постоје изузеци, као што је смањење вредности R^2 у моделу HCT-116 ALDH1+ након третмана са 5-FU.

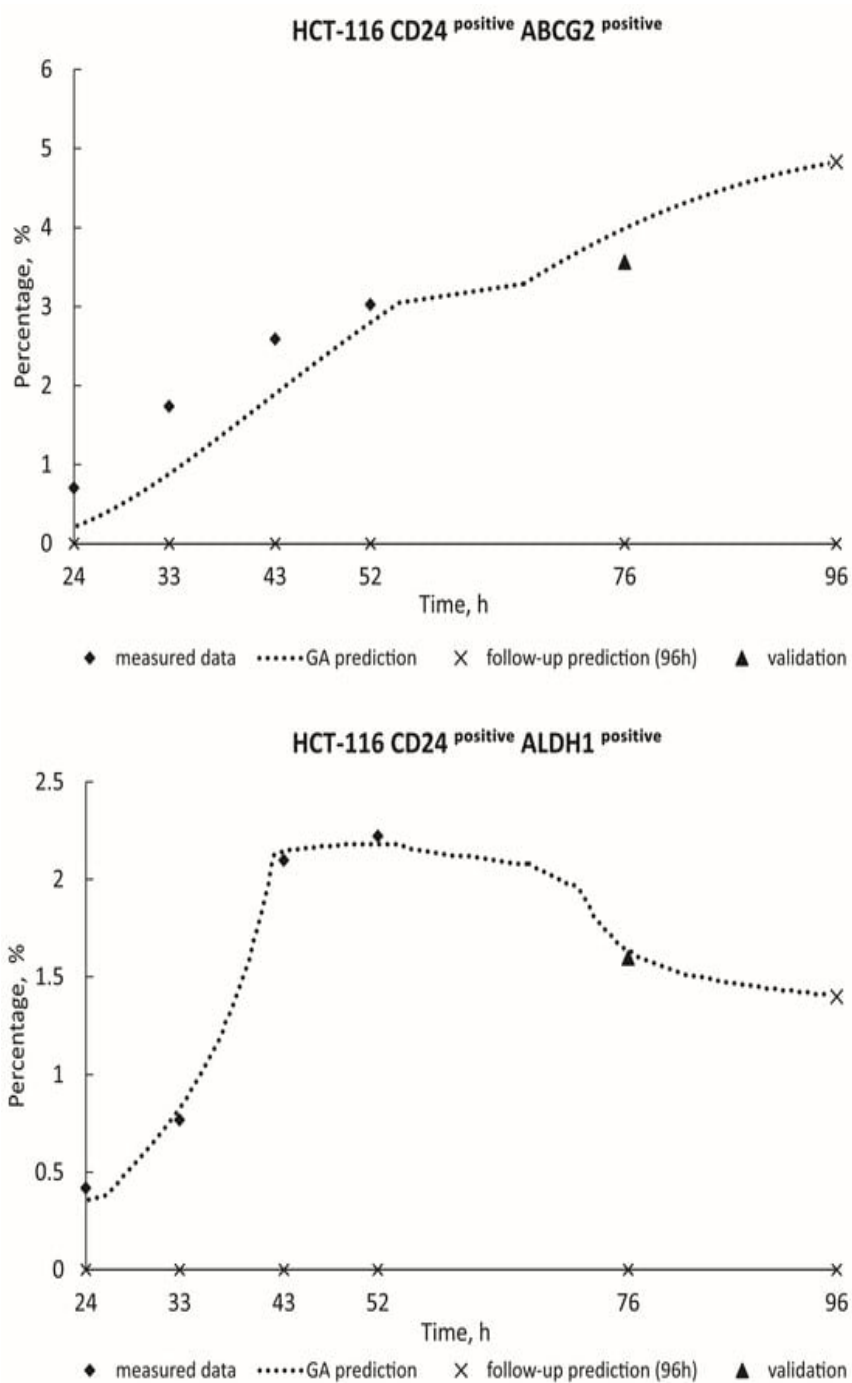
4.4.1. Генетски алгоритам (GA) CSCs третираних са PSNP

Улазни подаци за GA коришћени су из експерименталних мерења CSCs маркера. **Фигурама 29. и 30.** приказани су стварни измерени подаци за HCT-116 (ABCG2+; ALDH1+; CD24+ABCG +; CD24+ ALDH1+) од 24 сата до 52 сата (представљено дијамантским тачкама), поред процене мртвих ћелија (илустроване испрекиданим кривама) у распону од 24 сата до 96 сати.

Улазни подаци за GA коришћени су из експерименталних мерења CSCs маркера. **Фигурама 31. и 32.** приказани су стварни измерени подаци за MDA MB-231 (ABCG2 +; ALDH1+; CD24+ABCG2+; CD24+ ALDH1+) од 24 сата до 52 сата (представљено дијамантским тачкама) заједно са проценом мртвих ћелија у распону од 24 сата до 96 сати.

Измерени слепи подаци на 76 сати (означени тачкама троугла) коришћени су за валидацију GA модела одлучивања са накнадним предвиђањима за ознаку од 96 сати представљеним као X тачке на графику.



Фигура 29. GA предвиђање раста ћелија HCT-116 третираних PSNP: ABCG2+

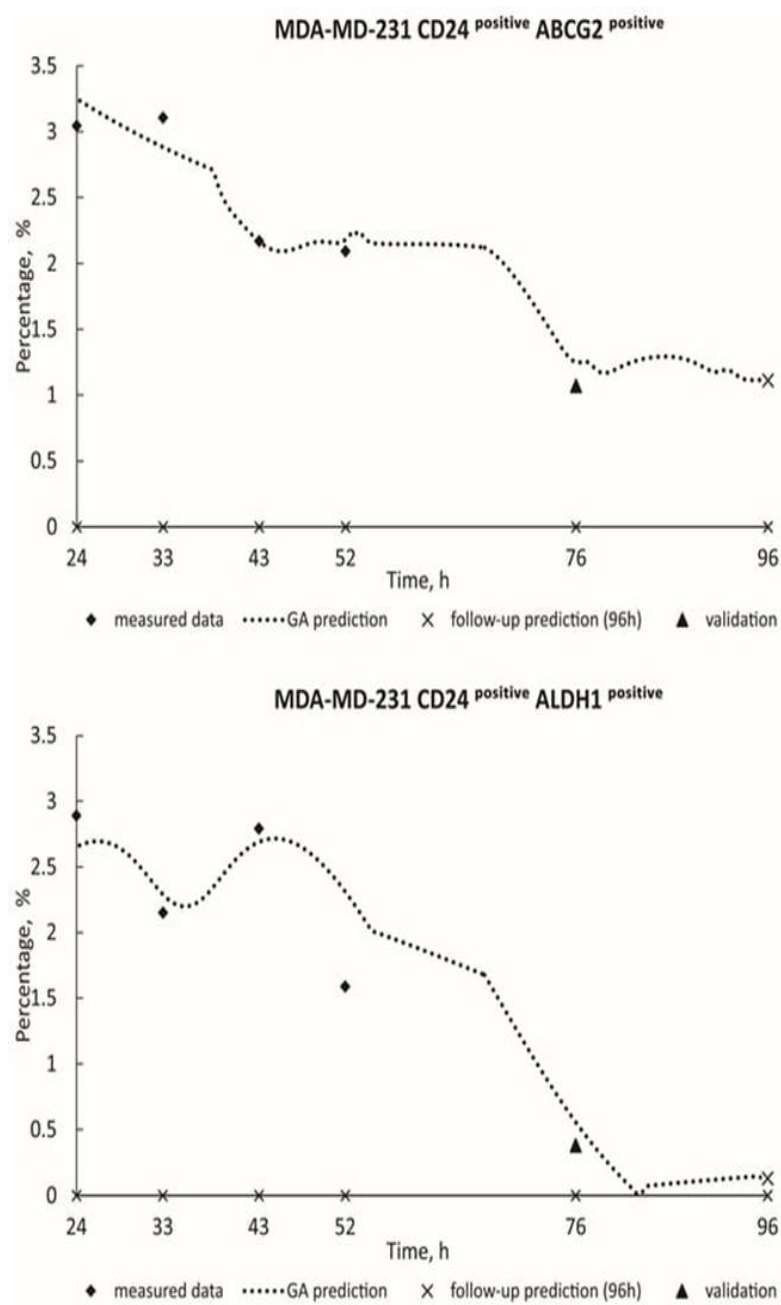
Фигура 30. GA предвиђање раста ћелија HCT-116 третираних PSNP

Резултати процене алгоритама са одговарајућим R^2 вредностима дати су у **Табели 5.**

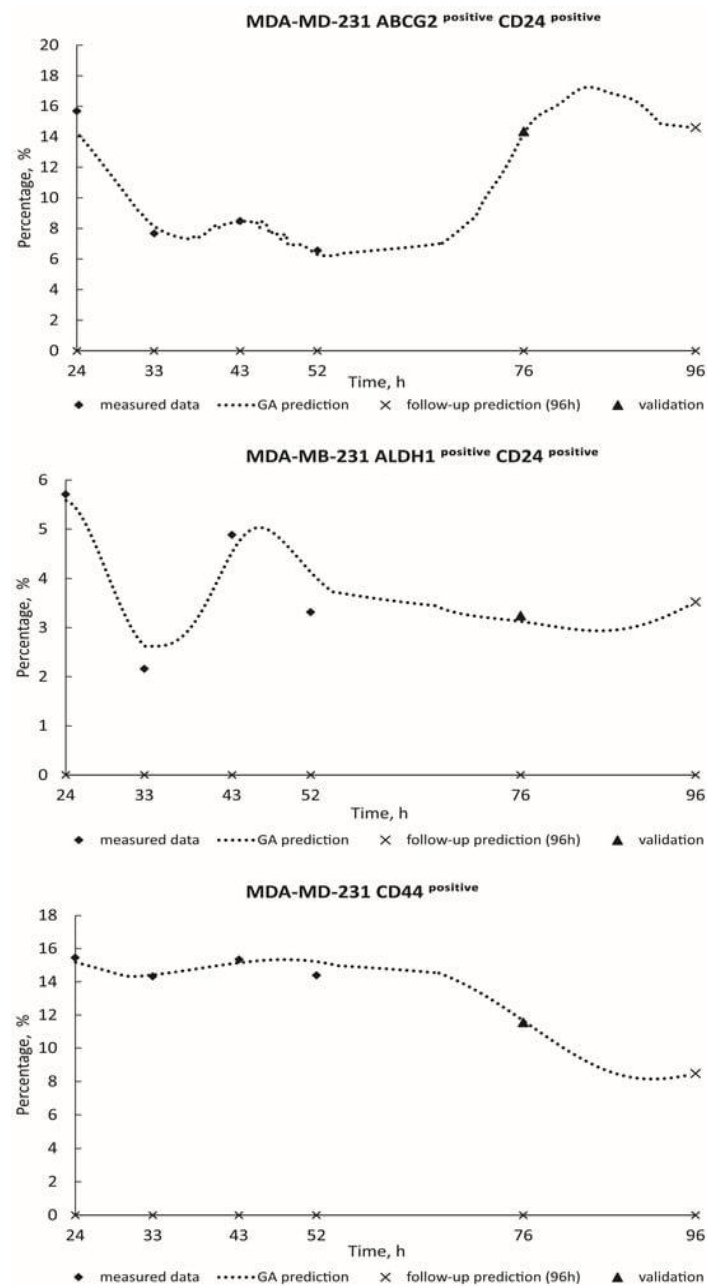
Model System	R^2 —Score of the Prediction
HCT-116 ABCG2 ^{positive}	0.99968
HCT-116 ALDH1 ^{positive}	0.98868
HCT-116 CD24 ^{positive} ABCG2 ^{positive}	0.95683
HCT-116 CD24 ^{positive} ALDH1 ^{positive}	0.99745
MDA-MB-231 CD24 ^{positive} ABCG2 ^{positive}	0.96353
MDA-MB-231 CD24 ^{positive} ALDH1 ^{positive}	0.95011
MDA-MB-231 ABCG2 ^{positive} CD24 ^{positive}	0.99847
MDA-MB-231 ALDH1 ^{positive} CD24 ^{positive}	0.93221
MDA-MB-231 CD44 ^{positive}	0.99055

Табела 5. Резултат предикције

Измерени слепи подаци на 76 сати (означени тачкама троугла) коришћени су за валидацију GA модела одлучивања са накнадним предвиђањима за ознаку од 96 сати представљеним као X тачке на графику (**Фигура 29.** и **Фигура 31.**). **Табела 5.** на сличан начин представља резултате процене алгорита заједно са њиховим одговарајућим R^2 вредностима. Када се коефицијент детерминације R^2 приближи јединици, то означава висок ниво корелације између предвиђених вредности које генерише модел и стварних посматраних података. У овом раду изузетна блискост вредности R^2 са 1 у различитим експерименталним условима наглашава робусност и тачност развијених предиктивних модела. Овако високи R^2 резултати указују на то да модели адекватно хватају основне обрасце и односе унутар података, омогућавајући на тај начин прецизне прогнозе будућих исхода. Ови налази не само да потврђују ефикасност примењених методологија, већ и уливају поверење у поузданост предиктивних модела. Штавише, близина R^2 до 1 сугерише да модели показују минималну грешку у својим предвиђањима, што их чини вредним алатима за доношење одлука и планирање у сценаријима из стварног света.



Фигура 31. GA предвиђање раста третираних ћелија MDA-MB-231



Фигура 32. GA предвиђање раста ћелија MDA-MB-231 третираних PSNP

V

ДИСКУСИЈА

5. ДИСКУСИЈА

Резултати ове докторске дисертације по први пут нуде драгоцене увиде у фенотип CSC и његове импликације на резистенцију на терапију. Њени резултати, такође, наглашавају неопходност даљих истраживања. Применом мултидисциплинарног приступа, који интегрише напредне технологије и персонализоване стратегије лечења, можемо да тежимо побољшању терапеутске ефикасности и неге пацијената у борби против рака.

Канцерске матичне ћелије (CSC) су мале субпопулације ћелија у тумору које имају способност да се саморегенеришу и производе различите типове ћелија у тумору. Сматра се да су ове ћелије одговорне за рецидив тумора и отпорност на хемиотерапију. Један приступ испитивању матичних ћелија рака је употреба имунофенотипске анализе. Ово укључује идентификацију специфичних ћелијских маркера који су карактеристични за CSC и могу се користити за њихово разликовање од других ћелија у тумору. Након раздвајања ове ћелије се могу даље окарактерисати на молекуларном нивоу. Матичне ћелије рака имају способност самообнављања, диференцијације и иницирања раста тумора и метастаза. Идентификација маркера који су специфични за CSC је важна за разумевање њихове биологије и развој циљаних терапија (54).

Експресија маркера CSC варира између подтипова рака дојке и карцинома са различитим клиничко-патолошким карактеристикама. Свака CSC популација може имати различит клинички значај у различитим фенотиповима рака дојке, али је прихваћено да су они потенцијални кључни фактори који покрећу агресивност тумора. Сама хетерогености CSC индуковала је тражење терапијске стратегије засноване на комбинацији вишеструких мета (55).

Године 2003. *Al-Hajj* први пут је идентификовао да фракција ћелија са CD44+/CD24-/Lin- фенотипом у ткивима пацијената са карциномом дојке може изнова генерисати тумор код мишева (56). Касније, 2007. године, *Ginestier* и сарадници открили су да субпопулација ћелија са високом активношћу алдехид дехидрогеназе (ALDH) може иницирати туморе *in vivo* и *in vitro* (57). Од тада фенотип CD44+/CD24- и висока активност ALDH постали су „златни стандард” за матичне ћелије рака дојке (BCSC). Нагомилани докази сугеришу да су BCSC са овим фенотиповима одговорни за прогресију рака и метастазе као и иницијацију тумора (58). Иако хемиотерапија може елиминисати већину туморских ћелија, не успева да елиминише BCSC, чиме ове ћелије чине водећи узрок отпорности на терапију и рецидива (59).

Показано је да је високи CD44+/CD24- однос и ALDH1+ у корелацији са малигнитетом тумора. Међутим, ова два матична маркера су показивала различиту експресију у различитим подтиповима рака дојке и имала различите функције у прогресији тумора. Висок однос CD44+/CD24- био је више повезан са пролиферацијом ћелија и туморогенезом, док је ALDH1+ био јачи индикатор за метастазе. Комбинација високог односа CD44+/CD24- и ALDH1+ може бити прецизнији и поузданији начин да се прецизира дефиниција CSC код рака дојке. Значајно, оба маркера су показала очувану експресију у примарном тумору и удаљеним метастазама, што сугерише да су били стабилни током развоја и метастазирања рака дојке. Узимајући у обзир

уобичајеност ових матичних маркера код различитих карцинома, ова комбинација маркера би стога могла послужити као вредни биомаркери за праћење прогресије различитих врста тумора и предвиђање прогнозе.

Иако се ова студија фокусирала на експресију маркера CD24, CD44, ALDH1 и ABCG2, признато је да биологија CSC није ограничена само на ове маркере. CSC су дефинисани сложеним профилем који може укључивати додатне маркере као што су EpCAM, PROM1, THY1 и други. EpCAM (енг. *epithelial cell adhesion molecule*) није изражен на туморима мезодермалног и ектодермалног порекла, као што су неурогени тумори, саркоми, меланоми или лимфоми. Његова прекомерна експресија обично корелира са смањењем преживљавања, на пример код рака дојке и јајника. Изузетак су бубрежни ћелијски карцином у коме експресија EpCAM корелира са повећањем очекиваног животног века (60). Сходно томе, будуће студије би требало да прошире обим како би укључиле шири спектар маркера CSC, чиме би се обезбедило свеобухватније разумевање фенотипа CSC и његових импликација на терапију. Интеграција ових додатних маркера такође може дати увид у хетерогеност CSC-а и динамичку природу њихове експресије као одговор на хемиотерапеутски третман.

У овој студији експресија CD44+/CD24-, која је била значајно повишена у ћелијама MDA-MB-231 третираним са 5-FU, сматрана је као полазна тачка. Резултати су показали да је експресија CD44+/CD24- статистички значајно повишена у свим тачкама посматрања на површини ћелија MDA-MB-231 третираних 5-FU. Ово указује да је популација CSC обogaћена након третмана хемиотерапијом. Поред тога, експресија ALDH1 је била повишена након 24, 33 и 52 сата, што сугерише да ове ћелије имају побољшане механизме резистенције на лекове и способности метастазирања. Експресија CD24-ABCG2+ALDH1+ је такође била повишена након 24 и 43 сата, што указује да ове ћелије могу имати повећану отпорност на хемиотерапију кроз ефлукс лекова посредованих ABCG2 (61). У ћелијама HCT-116 експресија CD44+ је статистички значајно повишена на површини ћелија третираних 5-FU након 24, 33 и 43 сата. Експресија ALDH 1 је била повишена у свим тачкама посматрања, што указује да и ове ћелије имају побољшане механизме резистенције на лекове. Експресија CD24-ABCG2+ALDH1+ је, такође, била повишена у свим тачкама посматрања, што указује да ове ћелије могу имати повећану отпорност на хемиотерапију кроз ефлукс лекова посредованих ABCG2 (62). Ови налази сугеришу да експресија CD24, CD44, ALDH1 и ABCG2 на површини CSC може послужити као прогностички фактор за отпорност на хемиотерапију код пацијената са карциномом. Штавише, резултати ове студије наглашавају важност развоја циљаних терапија које могу специфично циљати CSC како би се побољшала ефикасност хемиотерапије и спречио рецидив (63).

Испитивање резистенције рецептора CSC након терапије важно је из неколико разлога. Прво – матичне ћелије рака су главни извор раста тумора и преживљавања тумора и сматрају се кључном метом у терапији рака. Имају способност да мењају свој фенотип и прилагођавају се окружењу. Стога, испитивање рецептора на матичним ћелијама рака на резистенцију након цитостатичке терапије може помоћи у разумевању механизма који омогућавају преживљавање матичних ћелија рака након терапије и даљи раст тумора (64).

Цитостатици су уобичајена терапија за рак, али нису сви пацијенти подједнако осетљиви на ове лекове. Испитивање рецептора на матичним ћелијама рака може пружити увид у могуће узроке терапијске резистенције и помоћи у идентификацији

нових терапијских циљева. Идентификовање маркера резистенције на матичне ћелије рака може помоћи у развоју персонализоване терапије рака, која би се заснивала на карактеристикама тумора појединачног пацијента. Предвиђање резистенције на цитостатике је веома важно у медицини и истраживању рака. Ако је тумор отпоран на цитостатике, лечење може бити мање ефикасно и имати много озбиљних нежељених ефеката. Стога је важно препознати пацијенте који можда неће реаговати на терапију цитостатикама (65). Предвиђање резистенције на цитотоксичне лекове може помоћи лекарима да изаберу најбољи третман за пацијента. Укратко, испитивање рецептора на матичним ћелијама рака на резистенцију након цитостатичке терапије је важно за разумевање механизма који омогућавају опстанак матичних ћелија рака након терапије, идентификацију маркера резистенције и развој персонализоване терапије рака. Овај приступ је користан у развоју нових терапија и персонализоване медицине, јер омогућава идентификацију пацијената који би могли имати користи од одређене терапије и предвиђање резистенције на терапију код других пацијената.

Уз помоћ молекуларног тестирања могуће је предвидети који ће пацијенти бити осетљивији на одређене цитостатике, а који не. Поред тога, предвиђање резистенције на цитостатике може бити корисно приликом истраживања нових лекова и развоја персонализоване медицине. Идентификовање молекуларних маркера повезаних са отпорношћу на хемиотерапију може помоћи у развоју нових лекова и терапија за пацијенте који не реагују добро на постојеће третмане (66). Испитивање матичних ћелија рака и предвиђање њихове отпорности на терапију може бити изазовно и сложено.

Улога вештачке интелигенције у предвиђању отпорности на хемиотерапију у контексту CSC је све већа и представља потенцијално моћно оружје у борби против рака. CSC су често одговорни за отпорност на хемиотерапију и стога је развој нових терапија усмерених на ову ћелијску популацију од критичне важности. Вештачка интелигенција се може користити за идентификацију маркера који су специфични за CSC и за развој нових терапија које циљају на ове ћелије. Такође, може се користити за предвиђање ефикасности различитих терапијских режима код пацијената са каециномом (67).

Резултати ове докторске дисертације, у погледу употребе вештачке интелигенције, представљене су кроз GA алгоритам за развој модела за процену експресије CSC маркера на ћелијама рака третираним 5-FU и без третмана. Модел је обучен да предвиди будуће вредности за 52 сата (тачка валидације) и 67 сати (тачка праћења). Сваки појединачни модел предвиђања је постигао високу тачност са високим коефицијентом одређивања R^2 . Просечан R^2 је био 0,96 (мин. 0,93 – мак. 0,98) за предвиђање од 52 сата.

На основу ових резултата можемо закључити да се GA може користити као веома прецизан помоћни алат за *in silico* тестирање, анализу и праћење брзине експресије CSC маркера у ћелијама рака у времену. Предност таквих *in silico* модела је у томе што, за разлику од експерименталних посматрања, која су дискретизована у дискретне временске интервале, омогућавају нам да прецизно пратимо стање експресије CSC маркера у било ком тренутку (68). GA има значајну улогу у предвиђању отпорности на хемиотерапију у контексту CSC. Коришћењем метода машинског учења у анализи великих скупова података могу се идентификовати нови терапеутски циљеви и развити персонализоване терапије прилагођене специфичним

карактеристикама тумора код појединачних пацијената. Ово отвара могућност да се побољшају терапијски исходи код пацијената који болују од рака.

Ова студија је спроведена искључиво *in vitro*, што можда неће у потпуности реплицирати *in vivo* услове и системске ефекте хемиотерапије на CSC популације. Предиктивни модел развијен у овој студији, иако је робустан, изведен је из ограниченог скупа података и стога захтева екстерну валидацију да би се резултати генерализовали. Будућа истраживања би требало да прошире спектар анализираних CSC маркера и да размотре укључивање примарних туморских узорака како би се боље објаснила хетерогеност туморског микроокружења. Лонгитудиналне студије које укључују шири спектар хемиотерапеутских агенаса и њихових комбинација могу пружити дубљи увид у динамичку природу CSC и њихову улогу у резистенцији на лекове.

Клиничке импликације наших налаза су значајне. Разумевање механизма отпорности на хемиотерапију у вези са CSC може водити развоју ефикаснијих терапијских стратегија. Директно циљање на CSC, могуће у комбинацији са традиционалном хемиотерапијом, може побољшати резултате лечења и спречити рецидив. Штавише, примена модела машинског учења, као што је генетски алгоритам коришћен у нашој студији, показује потенцијал рачунарских метода у предвиђању одговора на лечење. На тај начин се отвара пут персонализованим приступима медицине у онкологији.

У овом истраживању, које је снажно засновано на логици медицинске праксе, добили смо резултате који у значајној мери корелирају. Вијабилност ћелије је испитивана RTCA методом, док је тип ћелијске смрти испитиван проточном цитометријом. Молекуларни путеви апоптозе су процењени релативном експресијом гена. Ове три методе су изабране из два разлога: (I) компатибилност тестова цитотоксичности и типа ћелијске смрти и (II) прецизно математичко моделирање захтева много података. RTCA је софистицирани метод за праћење виталности ћелија у реалном времену. Међутим, пошто је RTCA сигнал у корелацији са бројем одрживих ћелија, овај метод детектује само ћелије које су заглављене за златне електроде и не можемо проценити стање тих ћелија, осим ако претпоставимо да су све заглављене ћелије још увек живе. Ово има смисла; међутим, литература сугерише да ћелије у раној апоптози и даље задржавају активне механизме површинске адхезије (68). Апоптоза је облик програмиране ћелијске смрти која је регулисана и укључује низ промена у спољашњој мембрани и цитоскелету ћелије. Током овог процеса ћелије постају заобљеније и могу се везати за површине због ослабљеног цитоскелета и повећане површине. Неке студије показују да чак и ћелије у касној апоптози и даље могу да приањају на површине. Судбина ћелије која је у раној/касној апоптози у тренутку испитивања значајно се мења у следећем тренутку, односно ћелија умире.

qPCR је коришћен за испитивање молекуларних механизма индукције испитиваних ћелија рака у апоптозу. Концентрације третмана у проточној цитометрији и qPCR експериментисању су коришћене као такве – ниже концентрације не би биле значајно цитотоксичне, а веће концентрације да би испољиле цитотоксичност. Наши претходни резултати (69) о цитотоксичности ових хемиотерапеутика омогућили су нам да изаберемо ове две концентрације. На пример, концентрације доксорубицина у третману су биле значајно ниже због екстремне токсичности на ћелије MDA-MB-231- $IC_{50}^{24h} = 37.9 \mu M$, $IC_{50}^{72h} = 0.2 \mu M$ MDA-MB-231(69). Концентрације RTCA третмана за доксорубицин биле су 0,1, 1, 10 и 50 μM , док су за проточну цитометрију и qPCR биле 0,1 и 1 μM .

Највећу токсичност према здравим ћелијама (MRC-5) показали су 5-FU и оксалиплатин (Ох-Pt) који се уклапају у њихов механизам деловања. Иринотекан и леуковорин генерално имају најмање изоловано дејство на ћелије, јер се користе као помоћни лекови за повећање ефикасности и истовремено смањење нежељених ефеката 5-FU и оксалиплатина у комбинованим протоколима. Када упоредимо токсични ефекат одабраних хемиотерапеутика на рак дојке и здраве ћелије, долазимо до сличног закључка као код ћелија НСТ-116. Осим доксорубицина, који је генерално веома токсична супстанца, преостала три лека показују значајну селективност према ћелијама MDA-MB-231, осим у екстремним условима лечења (веома високе дозе и дужина трајања лечења). Ово је такође разумљиво и у клиничкој пракси се дефинише у оквиру веома широког појма нежељених ефеката или нежељених реакција на лек.

Није изненађујуће да 5-FU, иринотекан и Ох-Pt показују значајну селективност према ћелијама рака; 5-FU омета синтезу ДНК, што доводи до инхибиције пролиферације ћелија (70). Пожељно га преузимају ћелије које се брзо деле, укључујући ћелије рака, и инкорпорира се у ДНК, где инхибира активност тимидилат синтазе (Thymidylate synthase) ензима есенцијалног за синтезу ДНК. Ћелије рака више зависе од брзе репликације ДНК и продукције РНК него нормалне ћелије, што их чини подложнијим ефектима 5-FU. Иринотекан је инхибитор топоизомеразе (*Topoisomerase*) који спречава репликацију и транскрипцију ДНК тако што инхибира активност топоизомеразе и ензима есенцијалног за одмотавање ДНК током ових процеса (71).

Ћелије рака имају више нивое топоизомеразе од нормалних ћелија, што их чини подложнијим ефектима иринотекана. Поред тога, иринотекан се у јетри претвара у активни метаболит (СН-38), који је веома токсичан за ћелије рака (72). Оксалиплатин је лек за хемиотерапију на бази платине који формира адукте са ДНК, што доводи до инхибиције репликације и транскрипције ДНК. Ћелије рака су подложније ефектима оксалиплатина због њихове веће стопе репликације и транскрипције ДНК у поређењу са нормалним ћелијама (73). Поред тога, оксалиплатин може индуковати апоптозу, механизам програмиране ћелијске смрти, у ћелијама рака.

Као и средства за лечење колоректалног карцинома, лекови за терапију рака дојке – паклитаксел, доцетаксел и ендоксан такође су испољили одређену селективност ка ћелијама рака. Паклитаксел и доцетаксел припадају класи лекова познатих као таксани, који ометају динамику микротубула и инхибирају деобу ћелија (74). Они се везују за β -тубулинску подјединицу микротубула и стабилизују их, што доводи до инхибиције деобе ћелија и на крају до смрти ћелија рака. Ћелије рака више зависе од микротубула за деобу ћелија и одржавање њиховог облика у поређењу са нормалним ћелијама, што их чини подложнијим ефектима таксана.

Циклофосфамид (енгл. *Cyclophosphamide*) је алкилирајући агенс који оштећује ДНК умрежавањем ланаца ДНК, што доводи до инхибиције репликације и транскрипције ДНК. Ћелије рака су подложније ефектима циклофосфамида због њихове веће стопе репликације и транскрипције ДНК у поређењу са нормалним ћелијама (75). Поред тога, циклофосфамид може индуковати апоптозу у ћелијама рака. У коначници, ови лекови показују селективност према ћелијама рака упркос здравим ћелијама због њихових различитих механизма деловања, који циљају на процесе који су важнији за опстанак и пролиферацију ћелија рака. Међутим, ови лекови такође могу

утицати на нормалне ћелије, што доводи до различитих нежељених ефеката, а њихова употреба захтева пажљиво праћење и управљање од стране здравствених радника.

Молекуларни механизми индукције апоптозе могу се, такође, објаснити хемиотерапеутицима. Апоптотски механизам деловања за сваки од ових лекова су различити; 5-FU инхибира активност тимидилат синтазе, ензима есенцијалног за синтезу ДНК, што доводи до оштећења ДНК и активације p53 пута, добро познатог пута супресора тумора који регулише апоптозу (76). Активација p53 доводи до регулације про-апоптотичких гена, као што су *Bax* и *Puma*, а регулација анти-апоптотичких гена, као што је *Bcl-2*, на крају доводи до активације каспазне каскаде и апоптозе.

Иринотекан инхибира активност топоизомеразе и ензима есенцијалног за репликацију и транскрипцију ДНК, што доводи до оштећења ДНК и активације p53 пута (77). Оксалиплатин формира адукте са ДНК, што доводи до инхибиције репликације и транскрипције ДНК и активације p53 пута. Поред тога, оксалиплатин може да активира пут протеин киназе активиран митогеном, који такође може да изазове апоптозу. Слично лековима за рак дебелог црева, паклитаксел, доцетаксел и циклофосфамид (Ендокан) су хемиотерапеутски агенси који индукују апоптозу у ћелијама рака сличним механизмима деловања. Инхибиција деобе ћелија може довести до активације p53 (77). У коначници, паклитаксел, доцетаксел и циклофосфамид индукују апоптозу у ћелијама рака кроз активацију p53 пута и каспазне каскаде.

Механизам индукције апоптозе терапије колоректалног карцинома молекуларним механизмима преко каспазне каскаде, *Bcl-2* и *Bax*, приказан је у неколико студија (78, 79, 80). Познато је да терапија доксорубицином, паклитакселом, ендоксаном и доцетакселом, између осталог, индукују процесе апоптозе у лечењу рака дојке кроз горе наведене механизме (81, 82, 83, 84).

Рак је сложена болест коју карактерише неконтролисани раст и пролиферација ћелија, што може резултирати стварањем тумора и метастазама. Разумевање одрживости рака и апоптозе, програмираног механизма ћелијске смрти, кључно је за развој ефикасних терапија против рака. Да би се боље разумео овај однос, коришћени су и приступи биолошком и нумеричком моделовању. Биолошки приступ укључује експерименталне методе као што су култура ћелија, проточна цитометрија, релативна експресија гена и праћење виталности ћелија у реалном времену како би се проучавало понашање ћелија рака у различитим условима. Ови експерименти могу помоћи у идентификацији кључних сигналних путева и молекуларних механизма укључених у одрживост рака и апоптозу.

У овој студији, такође, испитан је утицај полистиренских микро- и нано- честица с обзиром да је познато је да је пластика свуда око нас. Процењује се да је само у океанима присутно око 5,25 трилиона пластичних честица, што представља опасност за живе организме, укључујући и људе (85, 86, 87). Ефекти нанопластике су често хронични. Тренутно знамо врло мало о њима, али истраживања показују да повећање

концентрације нанопластике појачава упалне, цитотоксичне и генотоксичне ефекте. Потребно је више токсиколошких истраживања да би се боље разумели негативни ефекти нанопластике на животну средину и људе. Важно је проширити истраживања у овој области како би се пронашло решење за проблем загађења који из тога произилази (88). Студије које истражују утицај PSNP на субпопулацију матичних ћелија рака сматрају присуство наночестица полистирена у свакодневном окружењу као главног загађивача (89).

Употреба генетског алгорита и приступа модела машинског учења у анализи маркера матичних ћелија рака је неистражена област истраживања. У том смислу, уверени смо да је комбинација *in silico* и *in vitro* студија добар систем моделирања у идентификацији биомедицинских маркера матичних ћелија рака. Ефекат PSNP на матичне ћелије рака такође је недовољно истражено подручје.

У оквиру ове докторске дисертације истраживали смо обрасце експресије маркера у ћелијама HCT-116 третираним са PSNP. Удео ћелија које експримирају маркер ABCG2 кретао се од 6,71% према 13,39% у целокупној ћелијској популацији. Слично, субпопулација позитивна на ALDH1 кретала се од 6,13% према 26,8% унутар популације HCT-116, ћелија. Такође смо испитали CD24+/ ABCG2+ субпопулацију, која је чинила 0,31% према 2,94% популације HCT-116 ћелија. Слично, CD24+/ ALDH1+ субпопулација чинила је 0,34% према 2,09% целокупне популације HCT-116 ћелија. Ови налази пружају драгоцен увид у дистрибуцију и пропорције специфичних субпопулација маркера у ћелијској популацији HCT-116 третираној са PSNP. Ова запажања доприносе разумевању ефеката PSNP на обрасце експресије ових маркера у ћелијама рака, наглашавајући потенцијални утицај PSNP на заступљеност матичних ћелија рака и развој циљаних стратегија лечења (89).

Истраживање субпопулације ћелија MDA-MB-231 третираних наночестицама полистирена (PSNP) открило је занимљиве налазе у вези са експресијом специфичних маркера. Проценат ћелија које експримирају маркер ABCG2 кретао се од 2,09% до 3,11% унутар популације MDA-MB-231. Слично, субпопулација ALDH1 је била заступљена у 1,59% до 2,89% укупне популације MDA-MB-231 ћелија. Ова запажања указују на присуство различитих субпопулација унутар ћелијске линије MDA-MB-231. Поред тога, анализа CD24+/ABCG2+ субпопулације показала је распон од 6,56% до 15,69% унутар популације ћелија MDA-MB-231. Субпопулација позитивна на CD24/ ALDH1 кретала се од 2,16% до 5,71% укупне популације MDA-MB-231 ћелија. Ове специфичне субпопулације маркера пружају увид у дистрибуцију и пропорције ћелија које имају повећан малигни потенцијал након третмана PSNP.

Sulukan и сарадници у својој студији показали су ефекат PSNP на различите биолошке процесе повезане са раком користећи модел зебрице (eng. *Zebrafish*). Њихови налази су указали на значајне ефекте полистеринских нановеличинних честица на механизме повезане са раком (90). Разумевање динамике и пропорција ових

субпопулација маркера је критично за процену утицаја PSNP на експресију маркера матичних ћелија рака. Ове наночестице су у стању да промовишу CSC и могу допринети прогресији тумора. Претходне студије су показале да су ABCG2 и хумани кластери диференцијације 33 (CD133) маркери високо експримирани у ћелијским линијама отпорним на лекове и високо туморогеним, као што су MDA-MB-231 и MCF-7, које подсећају на матичне ћелије рака (CSC) (91). Иако су CD24+/ABCG2+ и CD24+/ALDH1+ субпопулације мање заступљене у целим популацијама ћелија, ове комбинације указују на повећану агресивност ћелија рака у смислу прогресивности и потенцијала резистенције на лекове (92). Диференцијална експресија маркера ABCG2 и ALDH1 између ћелија HCT-116 и ћелија рака дојке MDA-MB-231 указује на различите карактеристике и понашање ових ћелијских линија. Већа експресија ABCG2 и ALDH1 у ћелијама HCT-116 указује на потенцијалну улогу у резистенцији на лекове и својствима сличним CSC специфичним за колоректални карцином. С друге стране, ћелије MDA-MB-231, које су метастатског порекла, показују различите карактеристике у поређењу са ћелијама HCT-116.

Метастатске ћелије рака могу се ширити од примарног тумора до удаљених места у телу, што доводи до настанка агресивнијег и инвазивнијег фенотипа. Метастатска природа ћелија MDA-MB-231 може објаснити већу експресију агресивних субпопулација, као што су CD24+/ABCG2+ и CD24+/ALDH1+ ћелије (93). Ове субпопулације су повезане са повећаним туморогеним потенцијалом и отпорношћу на конвенционалне третмане. Стицање метастатских својстава ћелијама MDA-MB-231 доприноси њиховом агресивном понашању и способности да колонизују нова ткива (94). Насупрот томе, ћелије HCT-116 показују умерену инвазивност и смањени метастатски капацитет. HCT-116 ћелије су изведене из примарног тумора и могу имати различите молекуларне карактеристике у поређењу са ћелијама MDA-MB-231.

Примарно окружење тумора се разликује од окружења удаљених метастаза, а ћелије које потичу из ових различитих фаза прогресије рака показују различите обрасце експресије маркера као што су ABCG2 и ALDH1. Диференцијална експресија маркера ABCG2 и ALDH1 између ових ћелијских линија наглашава хетерогеност и сложеност рака. Испитивањем индивидуалних карактеристика сваке ћелије рака стиче се увид у основне механизме који покрећу прогресију тумора и метастазе, што на крају доводи до развоја специфичних циљаних терапија које одговарају одређеним типовима и стадијумима рака.

У овој студији GA алгоритам је коришћен за развој модела који би имао способност да процени раст ћелија третираних PSNP током времена. Модел је обучен да предвиди понашање ћелија у будућем времену у 76 и 96 сати. Сваки појединачни модел предвиђања има архивирану високу тачност са високим коефицијентом детерминације R^2 . Просечан R^2 је био 0,979 (мин. 0,93 – мак. 0,99) за предвиђање од 76 сати. На основу ових резултата можемо закључити да се GA може користити као веома прецизан помоћни алат за *in silico* тестирање, анализу и праћење понашања

субпопулације матичних ћелија рака. Предност оваквих модела је што нам омогућавају да прецизно пратимо стање понашања ћелије у сваком тренутку, за разлику од експерименталних мерења која су дискретизована у временским интервалима.

Главни циљ примене нумеричких симулација у оквиру истраживања прогресије и лечења рака је да се развије модел који може прецизно симулирати понашање ћелија рака и поуздано предвидети раст ових ћелија. Користећи овај модел било би могуће анализирати широк спектар могућих начина терапеутског циљања различитих аспеката ћелија рака *in silico* без потребе за извођењем дуготрајних и скувих експеримената за сваки разматрани третман. Поред тога, математички модел се може користити за предвиђање одговора ћелија рака на различите третмане и идентификовање потенцијалних комбинација лекова које би могле да побољшају њихову ефикасност. Коначно, математички модели се могу користити за симулацију понашања ћелија рака у различитим микроокружењима и предвиђање њиховог понашања *in vivo*. Ове информације могу помоћи у развоју персонализованих терапија рака и побољшати ефикасност тренутних третмана.

VI

ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

Канцер је сложена болест коју карактерише раст и пролиферација туморских ћелија које нису под контролом домаћинских одбрамбених механизма и нормалних сигналних путева који контролишу ћелијски циклус. Разумевање баланса између пролиферације туморских ћелија (одрживости) и апоптозе, програмираног механизма ћелијске смрти, кључно је за развој ефикасних терапија против тумора. Да би се боље разумео овај однос, коришћени су биолошки и нумерички алати у *in silico* моделовању раста, резистенције и улоге CSC у прогресији тумора.

Биолошки приступ укључује експерименталне методе као што су култура ћелија, проточна цитометрија, релативна експресија гена и праћење виталности ћелија у реалном времену како би се проучавало понашање ћелија рака у различитим условима. Ови експерименти могу помоћи у идентификацији кључних сигналних путева и молекуларних механизма укључених у одрживост рака и апоптозу. С друге стране, приступи нумеричког моделирања користе математичке и рачунарске моделе да симулирају понашање ћелија рака и предвиде њихов одговор на различите стимулусе. Ови модели могу узети у обзир различите факторе, као што су ћелијско микроокружење, обрасци експресије гена и сигналне мреже, како би се пружио увид у понашање канцера на нивоу система. Комбиновање оба приступа може пружити свеобухватно разумевање одрживости рака и апоптозе и помоћи у развоју персонализованих терапија рака.

Наш математички модел може помоћи у интеграцији сложених и хетерогених података из различитих извора укључујући геномику, протеомику и транскриптомику. Ова интеграција може пружити свеобухватније разумевање основних механизма одрживости рака и апоптозе. С друге стране, математички модел може помоћи у идентификацији кључних сигналних путева и молекуларних циљева, који су укључени у регулацију одрживости рака и апоптозе. Ове информације могу помоћи у развоју нових терапија рака и циљаних лекова. Поред тога, математички модел се може користити за предвиђање одговора ћелија рака на различите третмане и идентификовање потенцијалних комбинација лекова које би могле да побољшају њихову ефикасност. Коначно, математички модели се могу користити за симулацију понашања ћелија рака у различитим микроокружењима и предвиђање њиховог понашања *in vivo*. На основу резултата биомедицинских истраживања о утицају осам хемиотерапеутика на системе ћелијских модела долазимо до 7 значајна закључка:

1. Снажан ефекат на повећање касне апоптозе и некрозе код модела рака;
2. Значајна селективност према канцеру у односу на здраве ћелије;
3. Јака корелација између одређених параметара одрживости и апоптозе;
4. Идентификовани профили маркера, укључујући CD24, CD44, ALDH1 и ABCG2, повезани су са повећаном експресијом CSC након третмана са 5-FU;
5. Истраживање наглашава потенцијал вештачке интелигенције, посебно генетских алгоритама, у предвиђању експресије CSC маркера током времена;
6. Истраживање утицаја PSNP-а има за циљ да добије детаљнији увид у сложену динамику канцера као и потенцијалне ефекте загађења животне средине на канцере. Наночестице полистирена стимулисале су развој мање диференцираних

ћелијских субпопулација унутар тумора, чиме су повећавале ниво биолошке агресивности тумора;

7. Валидација машинског учења, као поуздан и користан приступ, препоручује се за анализу великих биомедицинских база података. Оваква истраживања побољшавају наше разумевање матичних ћелија рака, чиме се може дати допринос како у разумевању биологије канцера тако и у проналажењу нових терапијских приступа и начина како комбиновати различите лекове ради побољшања терапијског учинка а смањења нежељених ефеката на здраве ћелије.

VII

ЛИТЕРАТУРА

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Yan Zhao, Meili Shen, Liangqiang Wu, Haiqin Yang, Yixuan Yao, Qingbiao Yang, Jianshi Du, Linlin Liu, Yapeng Li, and Yuansong Bai. Stromal cells in the tumor microenvironment: accomplices of tumor progression? 2023 Sep. 4. doi: 10.1038/s41419-023-06110-6
2. Alice E Denton, Edward W Roberts, Douglas T. Fearon. Stromal Cells in the Tumor Microenvironment. 2018;1060:99-114. doi: 10.1007/978-3-319-78127-3_6.
3. Taking a Full Snapshot of Cancer Biology: Deciphering the Tumor Microenvironment for Effective Cancer Therapy in the Oncology Clinic Kevin Dzobo PMID: 32176591 DOI: 10.1089/omi.2020.0019
4. Supernat A, Markiewicz A, Welnicka-Jaskiewicz M, Seroczynska B, Skokowski J, Sejda A, Szade J, Czapiewski P, Biernat W, Zaczek A. Appl. CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma. Doi: 10.1097/pai.0b013e3182311d82. PMID: 22553809
5. Bingzhe Lv, Yunpeng Wang, Dongjiang Ma, Wei Cheng, Jie Liu, Tao Yong, Hao Chen, Chen Wang. Immunotherapy: Reshape the Tumor Immune Microenvironment. 2022 Jul 6;13:844142. Doi: 10.3389/fimmu.2022.844142.
6. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, Safari E, Farahmand L. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments 2020 Jul;84:106535. Doi: 10.1016/j.intimp.2020.106535. Epub 2020 Apr 29. PMID:32361569
7. Lu Zhang, Wenmin Chen, Suling Liu, Ceshi Chen. Targeting Breast Cancer Stem Cells PMID: 36632469 PMCID: PMC9830502 DOI: 10.7150/ijbs.76187
8. Palomeras S, Ruiz-Martínez S, Puig T. Targeting Breast Cancer Stem Cells to Overcome Treatment Resistance Molecules. 2018 Aug. 30;23(9):2193. doi: 10.3390/molecules23092193.
9. Niloufar Tavakoli Dastjerd, Ali Valibeik, Sobhan Rahimi Monfared, Golnaz Goodarzi, Mostafa Moradi Sarabi Faezeh Hajabdollahi, Mahmood Maniati, Jamal Amri Sadra Samavarchi Tehrani. Gene therapy: A promising approach for breast cancer treatment PMID: 3490472. DOI: 10.1002/cbf.3676
10. Munro MJ, Wickremesekera SK, Peng L, Tan. Cancer stem cells in colorectal cancer doi: 10.1136/jclinpath-2017-204739. Epub 2017 Sep 23. PMID:28942428 Review.
11. Bozorgi, A., Khazaei, M., & Khazaei, M. R. (2015). New findings on breast cancer stem cells: a review. *Journal of breast cancer*, 18(4), 303-312.
12. de Assis, J. V., Coutinho, L. A., Oyeyemi, I. T., & Oyeyemi, O. T. (2022). Diagnostic and therapeutic biomarkers in colorectal cancer: a review. *American Journal of Cancer Research*, 12(2), 661.
13. Plabon Kumar Das 1, Farhadul Islam 2, Alfred K. Lam 3. The Roles of Cancer Stem Cells and Therapy Resistance in Colorectal Carcinoma. doi: 10.3390/cells9061392

14. Mendelsohn, J., Howley, P. M., Israel, M. A., Gray, J. W., & Thompson, C. B. (2014). *The molecular basis of cancer*. Elsevier Health Sciences.
15. Hershkovitz, D. (2015). Clonal evolution models of tumor heterogeneity. American Society of Clinical Oncology.
16. Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R., & Morrison, S. J. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, 138(5), 822-829.
17. Emami Nejad, A., Najafgholian, S., Rostami, A., Sistani, A., Shojaeifar, S., Esparvarinha, M., & Manian, M. (2021). The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell International*, 21, 1-26.
18. Mendelsohn, J., Howley, P. M., Israel, M. A., Gray, J. W., & Thompson, C. B. (2014). *The molecular basis of cancer*. Elsevier Health Sciences.
19. Wenhao Liao # 1, Yuchen Li # 2, Jing Wang # 3, Maoyuan Zhao 1, Nianzhi Chen 1, Qiao Zheng 1, Lina Wan 1, Yu Mou 1, Jianyuan Tang 1 4, Zhilei Wang 1 Natural Products-Based Nanoformulations: A New Approach Targeting CSCs to Cancer. DOI: [10.2147/IJN.S380697](https://doi.org/10.2147/IJN.S380697)
20. Vineet Gupta 1, Qian-Jin Zhang, Yong-Yu Liu. Evaluation of Anticancer Agents Using Flow Cytometry Analysis of Cancer Stem Cells. Doi: [10.1007/978-1-61779-012-6_11](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-012-6_11)
21. S. K. Koester 1, J. U. Maenpaa, V. J. Wiebe, W. J. Baker, G. T. Wurz, R. C. Seymour, R. E. Koehler, M. W. De Gregorio. Flow cytometry: potential utility in monitoring drug effects in breast cancer. DOI: [10.1007/BF00666206](https://doi.org/10.1007/BF00666206)
22. Yoichi Watanabe, Erik L. Dahlman, Kevin Z. Leder, Susanta K. Hui. A mathematical model of tumor growth and its response to single irradiation. Doi: [10.1186/s12976-016-0032-7](https://doi.org/10.1186/s12976-016-0032-7)
23. Shabana Tabassum 1, a & Norhayati Binti Rosli1, b. Faculty of Industrial Sciences & Technology Universiti Malaysia Pahang, 26300 Gambang, Kuantan, Pahang, Malaysia. Mathematical Modeling of Cancer Growth Process. Doi:10.1088/1742-6596/1366/1/012018
24. Dick Vethaak, A., Legler, J., 2021. Microplastics and human health: knowledge gaps should be addressed to ascertain the health risks of microplastics. *Science* (80-.) 371, 672–674. <https://doi.org/10.1126/science.abe5041>
25. Zhang, Q., Xu, E.G., Li, J., Chen, Q., Ma, L., Zeng, E.Y., Shi, H., 2020. A review of microplastics in table salt, drinking water, and air: direct human exposure. *Environ. Sci. Technol.* 54, 3740–3751. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b04535>.
26. Prata, J.C., da Costa, J.P., Lopes, I., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T., 2020. Environmental exposure to microplastics: an overview on possible human health effects. *Sci. Total Environ.* 702, 134455. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134455>
27. Xu, J.L., Lin, X., Hugelier, S., Herrero-Langreo, A., Gowen, A. A., 2021. Spectral imaging for characterization and detection of plastic substances in branded teabags. *J. Hazard. Mater.* 418, 126328. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126328>.
28. Hernandez, L. M., Xu, E. G., Larsson, H. C. E., Tahara, R., Maisuria, V. B., Tufenkji, N., 2019. Plastic teabags release billions of microparticles and nanoparticles into tea. *Environ. Sci. Technol.* 53, 12300–12310. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02540>.

29. Li, Z., Zhu, S., Liu, Q., Wei, J., Jin, Y., Wang, X., Zhang, L., 2020c. Polystyrene microplastics cause cardiac fibrosis by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway and promoting cardiomyocyte apoptosis in rats. *Environ. Pollut.* 265, 115025. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115025>.
30. van Midwoud PM, Janse A, Merema MT, Groothuis GMM, Verpoorte E. Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models. *Anal Chem.* 2012;84(9)
31. Jun-Li Xu, Xiaohui Lin, Jing Jing Wang, Aoife A. Gowen. A review of potential human health impacts of micro- and nanoplastics exposure. *Science of The Total Environment* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158111>
32. Stock, V., Böhmert, L., Lisicki, E., Block, R., Cara-Carmona, J., Pack, L.K., Selb, R., Lichtenstein, D., Voss, L., Henderson, C.J., Zabinsky, E., Sieg, H., Braeuning, A., Lampen, A., 2019. Uptake and effects of orally ingested polystyrene microplastic particles in vitro and in vivo. *Arch. Toxicol.* 93, 1817–1833. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02478-7>
33. Banerjee, A., Billey, L.O., Shelver, W.L., 2021. Uptake and toxicity of polystyrene micro/ nanoplastics in gastric cells: effects of particle size and surface functionalization. *PLoS One* 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260803>
34. Xu, M., Halimu, G., Zhang, Q., Song, Y., Fu, X., Li, Yongqiang, Li, Yansheng, Zhang, H., 2019. Internalization and toxicity: a preliminary study of effects of nanoplastic particles on human lung epithelial cell. *Sci. Total Environ.* 694, 133794. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133794>
35. Busch, M., Bredeck, G., Kämpfer, A. A. M., Schins, R. P. F., 2021a. Investigations of acute effects of polystyrene and polyvinyl chloride micro- and nanoplastics in an advanced in vitro triple culture model of the healthy and inflamed intestine. *Environ. Res.* 193. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110536>.
36. Jeon, S., Clavadetscher, J., Lee, D.K., Chankeshwara, S.V., Bradley, M., Cho, W.S., 2018. Surface charge-dependent cellular uptake of polystyrene nanoparticles. *Nanomaterials* 8, 1–11. <https://doi.org/10.3390/NANO8121028>
37. Florance, I., Ramasubbu, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2021. Polystyrene nanoplastics dysregulate lipid metabolism in murine macrophages in vitro. *Toxicology* 458, 152850. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152850>.
38. Rudolph, J., Völkl, M., Jérôme, V., Scheibel, T., Freitag, R., 2021. Noxic effects of polystyrene microparticles on murine macrophages and epithelial cells. *Sci. Rep.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95073-9>.
39. Wu, S., Wu, M., Tian, D., Qiu, L., Li, T., 2020. Effects of polystyrene microbeads on cytotoxicity and transcriptomic profiles in human Caco-2 cells. *Environ. Toxicol.* 35, 495–506. <https://doi.org/10.1002/tox.22885>
40. Ding, Y., Zhang, R., Li, B., Du, Y., Li, J., Tong, X., Wu, Y., Ji, X., Zhang, Y., 2021. Tissue distribution of polystyrene nanoplastics in mice and their entry, transport, and cytotoxicity to GES-1 cells. *Environ. Pollut.* 280, 116974. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116974>
41. Schwarzfischer, M., Niechcial, A., Lee, S.S., Sinnet, B., Wawrzyniak, M., Laimbacher, A., Atrott, K., Manzini, R., Morsy, Y., Häfliger, J., Lang, S., Rogler, G., Kaegi, R., Scharl, M., Spalinger, M.R., 2021. Ingested nano- and micro-sized

- polystyrene particles surpass the intestinal barrier and accumulate in the body. *NanoImpact* 25, 100374. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2021.100374>
42. Mu, Y., Sun, J., Li, Z., Zhang, W., Liu, Z., Li, C., Peng, C., Cui, G., Shao, H., Du, Z., 2022. Activation of pyroptosis and ferroptosis is involved in the hepatotoxicity induced by polystyrene microplastics in mice. *Chemosphere* 291. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132944>
43. Meng, X., Zhang, J., Wang, W., Gonzalez-Gil, G., Vrouwenvellder, J.S., Li, Z. 2022. Effects of nano- and microplastics on kidney: physicochemical properties, bioaccumulation, oxidative stress and immunoreaction. *Chemosphere* 288. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132631>
44. Sun, R., Xu, K., Yu, L., Pu, Yunqiu, Xiong, F., He, Y., Huang, Q., Tang, M., Chen, M., Yin, L., Zhang, J., Pu, Yuepu. 2021. Preliminary study on impacts of polystyrene microplastics on the hematological system and gene expression in bone marrow cells of mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 218, 112296. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112296>
45. Xu, J.L., Lin, X., Hugelier, S., Herrero-Langreo, A., Gowen, A.A. 2021. Spectral imaging for characterization and detection of plastic substances in branded teabags. *J. Hazard. Mater.* 418, 126328. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126328>
46. Chen G, Shan H, Xiong S, Zhao Y, van Gestel CAM, Qiu H, Wang Y. Polystyrene nanoparticle exposure accelerates ovarian cancer development in mice by altering the tumor microenvironment. *Sci Total Environ.* 2024; 906:167592. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167592>.
47. Barguilla I., Domenech J., Ballesteros S., Rubio L., Marcos R., Hernández A. Long-term exposure to nanoplastics alters molecular and functional traits related to the carcinogenic process. *J Hazard Mater.* 2022 15;438:129470. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.129470.
48. Domenech, J., de Britto, M., Velázquez, A., Pastor, S., Hernández, A., Marcos, R., Cortés. C. Long-Term Effects of Polystyrene Nanoplastics in Human Intestinal Caco-2 Cells. *Biomolecules* 2021.
49. Bonanomi, M., Salmistraro, N., Porro, D., Pinsino, A., Colangelo, A. M., Gaglio, D. Polystyrene micro and nano-particles induce metabolic rewiring in normal human colon cells: A risk factor for human health. *Chemosphere* 2022, 303 Pt 1, 134947.
50. He, Y., Li, J., Chen, J., Miao, X., Li, G., He, Q., Xu, H., Li, H., Wei, Y. Cytotoxic effects of polystyrene nanoplastics with different surface functionalization on human HepG2 cells. *Sci. Total Environ.* 2020, 723, 138180.
51. Kim, H., Zaheer, J., Choi, E. J., Kim, J. S. Enhanced ASGR2 by microplastic exposure leads to resistance to therapy in gastric cancer. *Theranostics* 2022, 12, 3217–3236.
52. Yang, Q., Dai, H., Wang, B., Xu, J., Zhang, Y., Chen, Y., Ma, Q., Xu, F., Cheng, H., Sun, D. et al. Nanoplastics Shape Adaptive Anticancer Immunity in the Colon in Mice. *Nano Lett.* 2023, 23, 3516–3523.
53. Liang, B., Zhong, Y., Huang, Y., Lin, X., Liu, J., Lin, L., Hu, M., Jiang, J., Dai, M., Wang, B. et al. Underestimated health risks: Polystyrene micro- and nanoplastics jointly induce intestinal barrier dysfunction by ROS-mediated epithelial cell apoptosis. *Part. Fibre Toxicol.* 2021, 18, 20.
54. Javier Enciso-Benavides 1, Luis Alfaro 2, Carlos Castañeda-Altamirano 3, Nancy Rojas 4, José González-Cabeza 5, Nathaly Enciso 6, Fernando Riesco 4, Miluska

- Castillo 3, Javier Enciso. Biological characteristics of a sub-population of cancer stem cells from two triple-negative breast tumour cell lines DOI: [10.1016/j.heliyon.2021.e07273](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07273)
55. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. DOI: [10.1038/s41598-017-14364-2](https://doi.org/10.1038/s41598-017-14364-2)
56. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 3983–3988.
57. Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007, 1, 555–567.
58. Li, W., Ma, H., Zhang, J., Zhu, L., Wang, C., Yang, Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci. Rep.* 2017, 7, 13856.
59. So-Yeon Park 1 2, Jang-Hyun Choi 1, Jeong-Seok Nam 3 4. Targeting Cancer Stem Cells in Triple-Negative Breast Cancer. <https://doi.org/10.3390/cancers11070965>
60. Epithelial Cell Adhesion Molecule. doi: 10.2353/ajpath.2007.070152
61. Huang, T., Song, X., Xu, D., Tiek, D., Goenka, A., Wu, B., Sastry, N., Hu, B., Cheng, S.-Y. Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance. *Theranostics* 2020.
62. Atashzar, M.R., Baharlou, R., Karami, J., Abdollahi, H., Rezaei, R., Pourramezan, F., Moghaddam, S. H. Z. Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. *J. Cell. Physiol.* 2020, 235, 790–803.
63. Gupta, R., Srivastava, D., Sahu, M., Tiwari, S., Ambasta, R.K., Kumar, P. Artificial intelligence to deep learning: Machine intelligence approach for drug discovery. *Mol. Divers.* 2021, 25, 1315–1360.
64. Rafique, R., Islam, S.R., Kazi, J.U. Machine learning in the prediction of cancer therapy. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2021, 19, 4003–4017.
65. Ling, J., Malviya, R., Singh, A. K. Prediction of Cancer Treatment Using Advancements in Machine Learning. *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discov.* 2023, 18, 364–378.
66. O'Neill, M.R. Riccardo Poli, William B. Langdon, Nicholas F. McPhee. A Field Guide to Genetic Programming; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009.
67. Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., Baradaran, B. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Adv. Pharm. Bull.* 2017.
68. Sokolovskaya, A., Korneeva, E., Zaichenko, D., Virus, E., Kolesov, D., Moskovtsev, A., Kubatiev, A. Changes in the Surface Expression of Intercellular Adhesion Molecule 3, the Induction of Apoptosis, and the Inhibition of Cell-Cycle Progression of Human Multidrug-Resistant Jurkat/A4 Cells Exposed to a Random Positioning Machine. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 855.
69. Demetriades, M., Zivanovic, M., Hadjicharalambous, M., Ioannou, E., Ljubic, B., Vucicevic, K., Ivosevic, Z., Dagovic, A., Milivojevic, N., Kokkinos, O. et al. Interrogating and Quantifying In Vitro Cancer Drug Pharmacodynamics via Agent-Based and Bayesian Monte Carlo Modelling. *Pharmaceutics* 2022, 14, 749.
70. Srinivas, U.S., Dyczkowski, J., Reißbarth, T., Gaedcke, J., Mansour, W. Y., Borgmann, K., Döbelstein, M. 5. Fluorouracil sensitizes colorectal tumor cells towards double stranded DNA breaks by interfering with homologous recombination repair. *Oncotarget* 2015, 6.

71. McQuade, M. R., Stojanovska, V., Bornstein, C.J., Nurgali, K. Colorectal Cancer Chemotherapy: The Evolution of Treatment and New Approaches. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24*, 1537–1557.
72. Rivory, L. P., Bowles, M. R., Robert, J., Pond, S.M. Conversion of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), by Human Liver Carboxylesterase. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*, 1103–1111.
73. Chaney, S. G., Campbell, S. L., Bassett, E., Wu, Y. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2005.
74. Stanton, R. A., Gernert, K. M., Nettles, J. H., Aneja, R. Drugs that target dynamic microtubules: A new molecular perspective. *Med. Res. Rev.* 2011, *31*, 443–481.
75. Mirkes, P. E. Cyclophosphamide teratogenesis: A review. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 1985, *5*, 75–88.
76. Cho, Y. H., Ro, E. J., Yoon, J. S., Mizutani, T., Kang, D. W., Park, J. C., Kim, T. I., Clevers, H., Choi, K. Y. 5-FU promotes stemness of colorectal cancer via p53-mediated WNT/ β -catenin pathway activation. *Nat. Commun.* 2020, *11*, 5321.
77. Meek, D. W. The p53 response to DNA damage. *DNA Repair.* 2004, *3*, 1049–1056.
78. Mhaidat, N. M., Bouklihacene, M., Thorne, R. F. 5-Fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells is caspase-9-dependent and mediated by activation of protein kinase C- δ . *Oncol. Lett.* 2014, *8*, 699–704.
79. Zanardelli, M., Micheli, L., Nicolai, R., Failli, P., Ghelardini, C., Mannelli, L. D. C. Different Apoptotic Pathways Activated by Oxaliplatin in Primary Astrocytes vs. Colo-Rectal Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, *16*, 5386–5399.
80. Takeba, Y., Kumai, T., Matsumoto, N., Nakaya, S., Tsuzuki, Y., Yanagida, Y., Kobayashi, S. Irinotecan Activates p53 With Its Active Metabolite, Resulting in Human Hepatocellular Carcinoma Apoptosis. *J. Pharmacol. Sci.* 2007, *104*, 232–242.
81. Childs, A.C., Phaneuf, S. L., Dirks, A. J., Phillips, T., Leeuwenburgh, C. Doxorubicin Treatment inVivo Causes Cytochrome Release and Cardiomyocyte Apoptosis, As Well As Increased Mitochondrial Efficiency, Superoxide Dismutase Activity, and Bcl2: Bax Ratio. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4592–4598.
82. Morales-Cano, D., Calviño, E., Rubio, V., Herráez, A., Sancho, P., Tejedor, M. C., Díez, J. C. Apoptosis induced by paclitaxel via Bcl-2, Bax and caspases 3 and 9 activation in NB4 human leukaemia cells is not modulated by ERK inhibition. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2013, *65*, 1101–1108.
83. Ogura, T., Tanaka, Y., Tamaki, H., Harada, M. Docetaxel induces Bcl-2- and pro-apoptotic caspase-independent death of human prostate cancer DU145 cells. *Int. J. Oncol.* 2016, *48*, 2330–2338.
84. Sharifi, S., Barar, J., Hejazi, M. S., Samadi, N. Doxorubicin Changes Bax /Bcl-xL Ratio, Caspase-8 and 9 in Breast Cancer Cells. *Adv. Pharm. Bull.* **2015**, *5*, 351–359.
85. Xanthos, D., Walker, T. R. International policies to reduce plastic marine pollution from single-use plastics (plastic bags and microbeads): A review. *Mar. Pollut. Bull.* 2017, *18*, 17–26.
86. Andrady, A., Neal, M. Applications and societal benefits of plastics. *Philos. Trans. R. Soc. Biol. Sci.* 2009, *364*, 1977–1984.
87. Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K. L. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 2015, *347*, 768–771.
88. Nikolic, S., Gazdic-Jankovic, M., Rosic, R., Miletic-Kovacevic, M., Jovicic, N., Nestorovic, N., Stojkovic, P., Filipovic, N., Milosevic-Djordjevic, O., Selakovic, D. et al. Orally administered fluorescent nanosized polystyrene particles affect cell viability,

- hormonal and inflammatory profile, and behavior in treated mice. *Environ. Pollut.* 2022, 305, 119206.
89. Stojkovic, M., Ortuño Guzmán, F. M., Han, D., Stojkovic, P., Dopazo, J., Stankovic, K. M. Polystyrene nanoplastics affect transcriptomic and epigenomic signatures of human fibroblasts and derived induced pluripotent stem cells: Implications for human health. *Environ. Pollut.* 2023, 320, 120849.
90. Sulukan, E., Şenol, O., Baran, A., Kankaynar, M., Yıldırım, S., Kızıltan, T., Bolat, İ., Ceyhun, S. B. Nano-sized polystyrene plastic particles affect many cancer-related biological processes even in the next generations, zebrafish modeling. *Sci. Total Environ.* 2022, 838 Pt 3, 156391.
91. Prud'homme, G. J., Glinka, Y., Toulina, A., Ace, O., Subramaniam, V., Jothy, S. Breast Cancer Stem-Like Cells Are Inhibited by a Non-Toxic Aryl Hydrocarbon Receptor Agonist. *PLoS ONE* 2010, 11, e13831.
92. Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., Bruns, C. J., Heeschen, C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007, 1, 313–323.
93. W. C., Lim, C. L. Breast cancer stem cells-from origins to targeted therapy. *Stem Cell Investig.* 2017.
94. Wanandi, S. I., Syahrani, R. A., Arumsari, S., Wideani, G., Hardiany, N. S. Profiling of Gene Expression Associated with Stemness and Aggressiveness of ALDH1A1-Expressing Human Breast Cancer Cells. *Malays. J. Med. Sci.* 2019, 26, 38–52.
95. Piñeiro Fernández J., Luddy, K. A., Harmon, C., & O'Farrelly, C. Hepatic tumor microenvironments and effects on NK cell phenotype and function. *International journal of molecular sciences*, 2019, 4131.
96. Polyak, K. Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of clinical investigation*, 2017, 117(11), 3155-3163.

БИОГРАФИЈА

Амра Рамовић Хамзагић рођена је у Београду, 15.03.1993. године. Завршила је Основну школу „Братство” у Новом Пазару као вуковац са одличним успехом. Средњу школу је завршила у Сарајеву. Студије генетике је уписала у Сарајеву 2011. године и завршила 2016. са просечном оценом 9,3. Затим је уписала докторске академске студије на факултету за Медицинске науке у Крагујевцу, смер матичне ћелије. Исте године се запослила као асистент на Државном факултету у Новом Пазару, смер биомедицинске науке. 2017. године прихваћена је на државном научном пројекту као најмлађи докторанд у Србији. Почиње пројектно-истраживачки рад на Институту за биолошка истраживања *Синиша Станковић* у Београду у трајању од 3 године. Формирала је и отворила први центар за генетику и молекуларну дијагностику у Новом Пазару, који и даље успешно води. У међувремену објављује научне радове високог ранга. Поносна је мајка две девојчице.

БИБЛИОГРАФИЈА:

1. Ramović Hamzagić A, Gazdić Janković M, Cvetković D, Nikolić D, Nikolić S, Milivojević Dimitrijević N, Kastratović N, Živanović M, Miletić Kovačević M, Ljujić B. Machine Learning Model for Prediction of Development of Cancer Stem Cell Subpopulation in Tumors Subjected to Polystyrene Nanoparticles. *Toxics*. 2024 May 10; 12(5):354.
2. Ramović Hamzagić A, Cvetković D, Gazdić Janković M, Milivojević Dimitrijević N, Nikolić D, Živanović M, Kastratović N, Petrović I, Nikolić S, Jovanović M, Šeklić D. Modeling 5-FU-Induced Chemotherapy Selection of a Drug-Resistant Cancer Stem Cell Subpopulation. *Current Oncology*. 2024 Feb 25; 31(3):1221-34.
3. Virijeвић K, Živanović M, Gazdić Janković M, Ramović Hamzagić A, Milivojević N, Pečić K, Šeklić D, Jovanović M, Kastratović N, Mirić A, Đukić T. Numerical and Biological Modeling Approach in the Analysis of the Cancer Viability and Apoptosis. In 4th Belgrade Bioinformatics Conference 2023 (Vol. 4, pp. 70-70). Belgrade: Institute of molecular genetics and genetic engineering.
4. Hamzagić N, Andjelković M, Pirković MS, Čanović P, Ignjatović V, Ramović A, Petrović D. Influence of secondary hyperparathyroidism in management of anemia in patients on regular hemodialysis. *Vojnosanitetski pregled*. 2020; 77(5).
5. Hamzagic A. R, Miloradovic D, Miloradovic D, Ivosevic Z, Ljujić B. Mesenchymal Stem Cells Versus Covid-19. Can They Win the Battle? *Experimental and Applied Biomedical Research (EABR)*.
6. Podolski-Renić A, Dinić J, Stanković T, Jovanović M, Ramović A, Pustenko A, Žalubovskis R, Pešić M. Sulfocoumarins, specific carbonic anhydrase IX and XII inhibitors, interact with cancer multidrug resistant phenotype through pH regulation and reverse P-glycoprotein mediated resistance. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019. Oct 1; 138:105012.
7. Hukić M, Seljmo D, Ramovic A, Ibrišimović MA, Dogan S, Hukic J, Bojic EF. The effect of lysozyme on reducing biofilms by *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Gardnerella vaginalis*: an in vitro examination. *Microbial Drug Resistance*. 2018 May 1; 24(4):353-8.

СКРАЋЕНИЦЕ

CSC – канцерске матичне ћелије

TME – туморска микросредина

CAFs – *Cancer-associated fibroblasts*

MSCs – мезенхималне ћелије

CAAs – (*Cancer-associated adipocytes*)

TEC – (*Tumor blood vessels and tumor-associated endothelial cells*),

PC – перицити

IGF1R – Инсулину сличан фактору раста

ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина

РНК – рибонуклеинска киселина

PI3K – Фосфатидилинозитол 3 киназе

BC – Карцином дојке

CRC – Колоректални карцином

RTCA – Realtime cel lanalyzer

5-FU-5 – флуороурацилу

RT-PCR – реверзна транскрипција РНК у комплементарну ДНК

ML – Модел машинског учења

GA – генетски алгоритам

HCT-116 – ћелијска линија канцера колона

MDA-MB-231 – ћелијска линија канцера дојке

MRC-5 – здрава ћелијска линија фибробласта

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

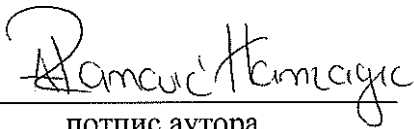
**„Анализа предикције матичности карцинома дојке и колоне у третману
хемиотерапеутицима применом алата математичког моделирања”**

представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог
истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог
права интелектуалне својине других лица.

У Крагујевцу, 16.09.2024. године,


потпис аутора

Образац 1 а

(за докторе наука који су одбранили докторску дисертацију
пре успостављања дигиталног репозиторијума)

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Амра Рамовић Хамзагић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

**„Анализа предикције матичности карцинома дојке и колоне у третману
хемиотерапеутицима применом алата математичког моделирања”**

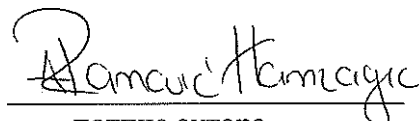
која је одбрањена на _____

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат
сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити
другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној форми у чијем се
прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној
докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 16.09.2024. године,


потпис аутора

Образац 2

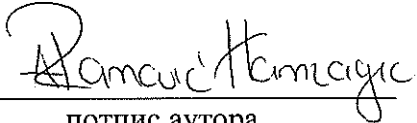
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

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

**„Анализа предикције матичности карцинома дојке и колоне у третману
хемиотерапеутицима применом алата математичког моделирања”**

истоветне.

У Крагујевцу, 16.09.2024. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Амра Рамовић Хамзагић,

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам

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

„Анализа предикције матичности карцинома дојке и колоне у третману хемиотерапеутицима применом алата математичког моделирања”

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

☐

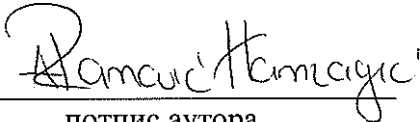
не дозвољавам¹

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 ауторским и сродним правима.

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

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство – делити под истим условима
- 3) Ауторство – без прерада
- 4) Ауторство – некомерцијално
- 5) Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
- 6) Ауторство – некомерцијално – без прерада²

У Крагујевцу, 16.09.2024. 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/>

