
UNIVERZITET U BEOGRADU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Maja S. Milošević

**IZOLACIJA, KULTIVACIJA I
KARAKTERIZACIJA ĆELIJA
POREKLOM IZ TUMORA I TUMORSKE
MARGINE PACIJENATA SA
BAZOCELULARNIM KARCINOMOM U
IN-VITRO USLOVIMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Maja S. Milošević

**ISOLATION, CULTIVATION AND
CHARACTERIZATION OF CELLS
ORIGINATING FROM TUMOR AND
TUMOR MARGIN OF PATIENTS WITH
BASAL CELL CARCINOMA *IN VITRO***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Mentori:

dr Milan Petrović, docent

Klinika za maksilofacijalnu hirurgiju, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Milašin, redovni profesor

Institutski predmeti, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Vesna Danilović, redovni profesor

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Svetlana Jovanović, vanredni profesor

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Zoran Jezdić, docent

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Snežana Sanković-Babić, docent

Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Ivana Novaković, redovni profesor

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Ovom prilikom želim da se zahvalim

Svojim mentorima Prof. dr Jeleni Milašin i Doc. dr Milanu Petroviću na nesebičnoj pomoći, dragocenim savetima i usmeravanju tokom celokupnog rada, koji su mi pomogli da ostvarim ovu studiju.

Takođe, kolegama iz laboratorije- Bošku, Lazi, Dijani, Nadji, Jeleni S. i Jeleni Č. na pomoći tokom izrade disertacije i na lepim zajedničkim trenucima.

Posebno se zahvaljujem mojim roditeljima, sestri i Mišku na nesebičnoj ljubavi, razumevanju i podršci!

Svima koji su mi pomogli u ostvarenju ove studije i koji su verovali u mene!



Mojoj porodici

SAŽETAK

Homeostaza kože direktno zavisi od mehanizma kontinuiranog obnavljanja ćelijske populacije kože i njene sposobnosti regeneracije. U epidermisu je prisutna posebna populacija ćelija zadužena za proces samoobnavljanja kože, tzv. epidermalne matične ćelije koje imaju sposobnost proliferacije, migracije, diferencijacije i programirane ćelijske smrti. Ukoliko dođe do narušavanja ravnoteže između ovih procesa, može doći do maligne transformacije zdrave matične ćelije u kancersku matičnu ćeliju. Poznato je da za hemorezistenciju, metastaziranje i recidiviranje tumora odgovornost nosi posebna populaciju tumorskih ćelija koje se nazivaju kancerske matične ćelije. Istraživanja pokazuju da bazocelularni karcinom kože vodi poreklo od matičnih ćelija ispupčenja folikula dlake, infundibuluma dlake i interfolikularnog epidermisa. Bazocelularni karcinom (BCK) je najčešći maligni tumor kože, pa i ako retko metastazira karakteriše ga invazivni rast pri čemu infiltriše okolne strukture i dovodi do ozbiljnih funkcionalnih i estetskih defekata. U literaturi se kao jedan od ključnih faktora odgovornih za recidiviranje navodi neadekvatna širina margine resekcije tumora. Istraživanja su pokazala da je za primarne BCK na koži lica veličine do 20 mm preporučena širina margine 3 mm.

Cilj ovog istraživanja bio je identifikacija i karakterizacija subpopulacije ćelija sa osobinama matičnosti izolovanih iz BCK-a i bliske margine od 3 mm, ispitivanjem proliferativnog, klonogenog i migratornog potencijala, analizom ekspresije embrionalnih, mezenhimskih i tumorskih markera, analizom biohemijske strukture ćelija, ispitivanjem sposobnosti diferencijacije u više ćelijskih linija kao i stepena otpornosti ćelija na dejstvo citostatika.

U istraživanju je učestvovalo 13 pacijenata sa primarnim bazocelularnim karcinomom na koži lica veličine do 20 mm. Nakon detaljno uzete anamneze i potpisanog informisanog pristanka pristupalo se hirurškoj eksciziji tumorske promene, koja se smatra zlatnim standardom u terapiji BCK-a. Iz svih ekscidiranih uzorka za izolaciju ćelija uzet je deo tumorskog tkiva, tkiva bliske margine (udaljene 3 mm od makroskopske granice tumora) i deo zdrave kože obuhvaćen oblikom resekcije (udaljen od makroskopske granice tumora više od 5 mm), dok je preostali deo tkiva poslat na histopatološku analizu.

Za karakterizaciju ćelija u kulturi korišćeni su testovi proliferacije, migracije, formiranja kolonija, sfera i ramanska spektroskopija. Marker kancerskih matičnih ćelija (KMĆ) analizirani su „Real-Time PCR” metodom i protočnom citometrijom. Za

potvrđivanje osobina matičnosti tumorske ćelije su usmerene u četiri linijska pravca: ka osteodiferencijaciji, hondrodiferencijaciji, adipodiferencijaciji i neurodiferencijaciji i posmatrana je razlika u nivou ekspresije CD44 i CD73 markera između indukovanih i neindukovanih ćelija. Analizirana je i hemorezistentnost na dejstvo citostatika MTT testom i „Neutral Red” testom.

Rezultati naše studije pokazuju da ćelije izolovane uz tumorskog tkiva bazocelularnog karcinoma pokazuju karakteristike matičnosti. Sposobnost formiranja kolonija i sfera pokazale su ćelije tumora i margine za razliku od kontrolnih ćelija. Tokom pasaža broj sfera u oba uzorka se povećavao dok se dijametar smanjivao. Uočena je pozitivna korelacija između broja sfera i ekspresije kancerskog markera CD44. Takođe, tumorske ćelije su pokazale porast migratornog potencijala tokom pasaža. Analiza „Real-time PCR” metodom je pokazala da je ekspresija embrionalnih (Oct4, Sox2 i Nanog), mezenhimskih (CD44 i CD73) i tumorskih markera (Bmi-1 i GPR49) veća u tumorskim ćelijama u odnosu na ćelije margine i kontrole ali i da postoji razlika u ekspresiji ovih markera između margine i kontrole. Protočnom citometrijom pokazano je da je nivo markera matičnosti viši u petoj pasaži u odnosu na prvu i da je viši u tumorskim ćelijama u odnosu na ćelije margine, dok se markeri hematopoetskih ćelija nisu eksprimirali. Raman spektroskopskom metodom utvrđena je razlika u strukturi ćelija na molekularnom nivou između tumorskih i zdravih ćelija. Ćelije izolovane iz tumorskog tkiva pokazale su sposobnost diferencijacije u dve ćelijske linije – osteogenu i hondrogenu dok su adipogena i neurodiferencijacija bile negativne. Tumorske ćelije su pokazale veću otpornost na dejstvo citostatika u odnosu na ćelije margine 24 h, 48 h i 7 dana nakon tretmana.

Imajući u vidu dobijene rezultate, može se zaključiti da ćelije bazocelularnog karcinoma poseduju osobine matičnosti što ukazuje na postojanje populacije kancerskih matičnih ćelija u tumorskom tkivu. Takođe, karakterizacija ćelija izolovanih iz bliske margine ukazuje na prisustvo malog broja KMC i u ovoj zoni, neuočenih na histološkom preparatu, koje bi mogle biti odgovorne za recidiviranje. Razumevanje patogeneze bazocelularnog karcinoma i identifikacija ćelija odgovornih za propagaciju i recidiviranje tumora od ključnog je značaja u razvoju novih terapijskih modaliteta.

Ključne reči: bazocelularni karcinom, kancerske matične ćelije, hirurška margina, diferencijacija, genska ekspresija, klonogenost, hemorezistentnost

Naučna oblast: Stomatološke nauke

Uža naučna oblast: Bazične stomatološke nauke

UDK broj:

SUMMARY

The skin homeostasis is directly dependent on the mechanism of continuous renewal and regeneration and the epidermis harbors a special cell population responsible for the process of self-renewal and regeneration of the skin, so called epidermal stem cells that have the ability to proliferate, migrate, differentiate, and undergo programmed cell death. If imbalance between these processes occurs, malignant transformation of healthy stem cell into the cancerous stem cell may happen. It is also known that a specific population of tumor cells called cancer stem cells is responsible for the hemoresistance, metastasis, and recurrence. Studies have shown that skin basal cell carcinoma is caused by stem cells of hair follicle, hair infundibulum and interfollicular epidermis. Basocellular carcinoma (BCC) is the most common malignant tumor of the skin, but it rarely gives metastases. It is characterized by invasive growth, infiltrating surrounding structures and leading to serious functional and aesthetic defects. In the literature, inadequate margins are indicated as one of the key factors responsible for tumor recurrences. Studies have shown that for the primary facial skin BCC of less than 20 mm a margin of 3 mm is recommended.

The aim of this study was to identify and characterize the cell subpopulation with stem characteristics within BCC and its margins (3 mm close) by testing proliferative, clonogenic and migratory potential, by analyzing the expression of embryonic, mesenchymal and tumor markers, by analyzing biochemical structure of cells, by examining the differentiation potential of generated cell lines and by testing the degree of chemo-resistance.

The study included 13 patients with primary BCC of face skin of less than 20 mm. Following a detailed anamnesis and a signed informed consent, the surgical excision which is considered a gold standard in BCC therapy, was done. A portion of the tumor tissue, of close margin (3 mm from the macroscopic tumor limit), and of healthy skin included in the resection (at least 5mm from the macroscopic tumor limit), were obtained from all the patients. The remaining of the tissue was subjected to histopathological analysis.

For cell phenotype characterization, tests of proliferation, colony formation, scratch assay, and sphere formation were used. Cancer stem cell markers were analyzed

by Real-Time PCR and flow cytometry. Raman spectroscopy was used for determining the difference in the biochemical composition of the cell. To confirm the stemness characteristics of tumor cells, they were induced into four different lineages: osteo-, chondro-, adipo- and neuro-lineages, and the expression of CD44 and CD73 markers in induced and non-induced cells was examined. The cytotoxic effect of Cisplatin and 5-fluorouracil was measured with MTT and Neutral Red tests.

The results of our study showed that some cells isolated from BCC show stemness characteristics. Tumor and margin cells showed the ability to form colonies and spheres but not control cells. During passages, the number of spheres in both types of cells increased while the diameter decreased. A positive correlation between the number of spheres and the expression of the CD44 cancer marker was observed. Also, tumor cells showed an increase of migratory potential during passages. Real-time PCR analysis showed that the expression of embryonic (Oct4, Sox2 and Nanog), mesenchymal (CD44 and CD73) and tumor markers (Bmi-1 and GPR49) was greater in tumor cells than in margin and control cells, and also between the margins and the controls. The level of stem cell markers, as shown by flow-cytometry, was higher in the fifth passage than in the first passage. It was also higher in tumor cells than in margin cells, while the markers of hematopoietic cells were not expressed at all. In addition, cells isolated from tumor tissue showed the ability to differentiate into two cell lines - osteogenic and chondrogenic while adipodifferentiation and neurodifferentiation were negative. Tumor cells showed greater chemo-resistance to cytostatics compared to margin cells, after 24 h, 48 h and 7 days of treatment.

Based upon the results obtained in the present study, it can be concluded that BCC harbors cell populations which show stemness characteristics. Also, the characteristics of cells isolated from close margins point to the existence of a small number of cancer stem cells in this zone as well, possibly responsible for recurrence and not detected by classical histological analysis. Understanding the BCC pathogenesis and identifying cells responsible for tumor propagation and recurrence is crucial for the development of new therapeutic modalities.

Key words: basal cell carcinoma, cancer stem cells, neoplastic cells, surgical margin, differentiation

Scientific field: Dental sciences

Narrower scientific field: Basic dental sciences

UDC:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. BAZOCELULARNI KARCINOM	2
1.1.1. Rasprostranjenost bazocelularnog karcinoma.....	2
1.1.2. Faktori rizika za nastanak bazocelularnog karcinoma	6
1.1.3. Klasifikacija bazocelularnog karcinoma	8
1.1.4 Terapija bazocelularnog karcinoma	18
1.3.5. Faktori koji utiču na recidiviranje bazocelularnog karcinoma	19
1.2. CELULARNI I MOLEKULARNI MEHANIZMI PATOGENEZE BCK KOŽE	21
1.2.1. Koža i matične ćelije kože	21
1.2.2. Kancerske matične ćelije.....	23
1.2.2.2. Marker kancerske matičnosti.....	28
1.3. SIGNALIZACIONE KASKADE U PATOGENEZI BCK	31
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	35
3. MATERIJAL I METODE	37
3.1. PACIJENTI I BIOLOŠKI MATERIJAL	38
3.1.2. Etički standard	38
3.2. METODE	38
3.2.1. Dobijanje primarne kulture.....	39
3.2.2. Test proliferacije	40
3.2.3 Test formiranja kolonija	40
3.2.4. Test migracije	41
3.2.5. Test formiranja sfera	41
3.2.6. Izolacija RNK iz ćelijskih kultura	41
3.2.7. Određivanje koncentracije i čistoće RNK.....	42
3.2.8. Analiza genske ekspresije metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (real time PCR, qPCR).....	42
3.2.9. Ispitivanje Sonic Hedgehog signalnog puta	44
3.2.10. Protočna citometrija	45
3.2.11. Raman spektroskopija.....	46
3.2.12. Diferencijacija ćelija	47
3.2.13. MTT i „Neutral red” test	50

3.3. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA.....	51
4. REZULTATI.....	52
4.1. KARAKTERISTIKE PACIJENATA SA DIJAGNOSTIFIKOVANIM BCK-om	53
4.1.1. Distribucija pacijenata prema godinama starosti.....	53
4.1.2. Lokalizacija tumora.....	53
4.1.3. Veličina tumora.....	53
4.1.4. Faktori rizika.....	54
4.4. ANALIZA EKSPERIMENTALNIH REZULTATA	54
4.4.1. Generisanje primarnih kultura	54
4.4.2. Test proliferacije	55
4.4.3. Test formiranja kolonija	55
4.4.4. Test migracije	56
4.4.5. Test formiranja sfera.....	57
4.4.6. Genska ekspresija RT-PCR metodom	58
4.4.7. Protočna citometrija	60
4.4.8. Sonic Hedgehog signalni put	61
4.4.9. Raman spektroskopija.....	61
4.4.10. Transdiferencijacija ćelija.....	63
4.4.11. Test citotoksičnosti.....	66
5. DISKUSIJA	69
6. ZAKLJUČCI.....	82
7. LITERATURA.....	84
8. BIOGRAFIJA AUTORA	1133
9. PRILOZI	115

1. UVOD

1.1. BAZOCELULARNI KARCINOM

Bazocelularni karcinom je najčešća maligna neoplazma kod ljudi, a njegova incidencija je u konstantnom porastu (Lomas i sar, 2012). Prvi put se pominje 1827. godine od strane Arthura Jacoba a 1900. godine Krompecher ga opisuje kao spororastuću, lokalno invazivnu malignu neoplaziju koja destrukcijom lokalnog tkiva može izazvati ozbiljne defekte. Krompecher, kao pionir u histološkoj klasifikaciji kožnih tumora, uvodi termin „karcinom bazalnih ćelija” (nem. *Basalzellenkrebs*) ukazujući na njegovo poreklo od bazalnih ćelija epidermisa. Našto kasnije, Mallory upotrebljava termin „tumor matriksa kose” (eng. hair matrix tumor) ukazujući na njegovo poreklo iz folikula dlake. Upravo, traženje adekvatnog imena u prošlosti upućuje na nejasnoće vezane za poreklo ovog tumora. Danas se prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 1974. godine ova maligna neoplazma naziva „Bazocelularni karcinom” (BCK). Svojim infiltrativnim rastom može zahvatiti hrskavicu i kost i dovesti do amputacije uha, nosa ili oka što sa sobom nosi ozbiljne funkcionalne poremećaje i znatno narušavanje kvaliteta života obolelih (Schubert i sar, 1997).

1.1.1. Rasprostranjenost bazocelularnog karcinoma

Nemelanotični karcinomi kože predstavljaju najčešće zastupljen malignitet kod ljudi, a smrtnost od ovog maligniteta je manja od 0.1% (Lo i sar, 1991). U grupu nemelanotičnih karcinoma kože svrstavaju se skvamocelularni karcinom (SCK) i bazocelularni karcinom kože koji čini 70% svih nemelanotičnih karcinoma kože (Leiter i sar, 2014; Raasch i sar, 2006). Prema podacima Američkog udruženja za kancer od nemelanomskih karcinoma u SAD godišnje oboli 3,3 miliona ljudi pri čemu 8 od 10 pacijenata oboli upravo od BCK-a. Na području Evrope prema podacima Lomas i sar. (2012) u poslednjih nekoliko decenija, incidencija BCK raste 5% godišnje. Ipak, najveća incidencija zapaža se u Australiji gde svaki drugi stanovnik stariji od 70 godina oboli od BCK-a (Staples i sar, 2006).

Broj novoobolelih značajno raste sa starenjem, međutim, u nekim zemljama Evrope (Holandija i Nemačka) zapažen je značajan rast incidencije kod mlađih žena u odnosu na druge starosne populacije i u odnosu na muški pol (Christenson i sar, 2005;

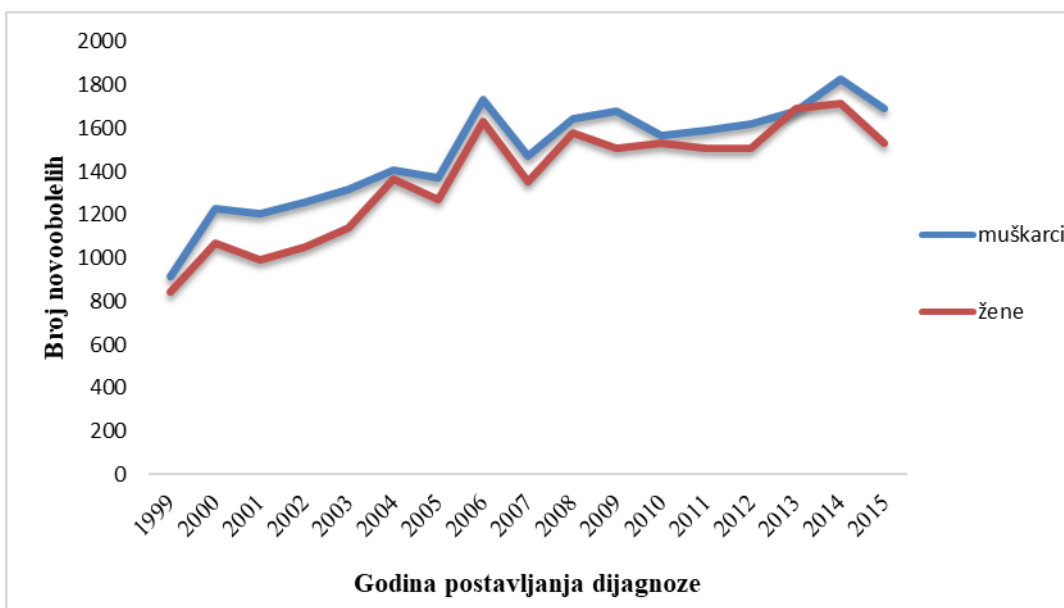
Birchjohansen i sar, 2010; Flohil i sar, 2013). Ovaj fenomen se objašnjava sve češćim izlaganjem veštačkom izvoru UV zračenja (solarijumi) kod pripadnica ženskog pola (Køster i sar, 2009; Robinon i sar, 1997; Skellett i sar, 2012).

Najčešća lokalizacija ovog tumora, čak 85%, je na koži lica, poglavine i vrata zbog izloženosti štetnom delovanju UV zraka, ali moguća je i pojava na delovima tela koji nisu izloženi suncu (McCormack i sar, 1997; Bastiaens i sar, 1998; Scrivener i sar, 2002). Na sluzokoži se primarno ne javlja ali može urastati u nju (Braun Falco i sar, 1991).

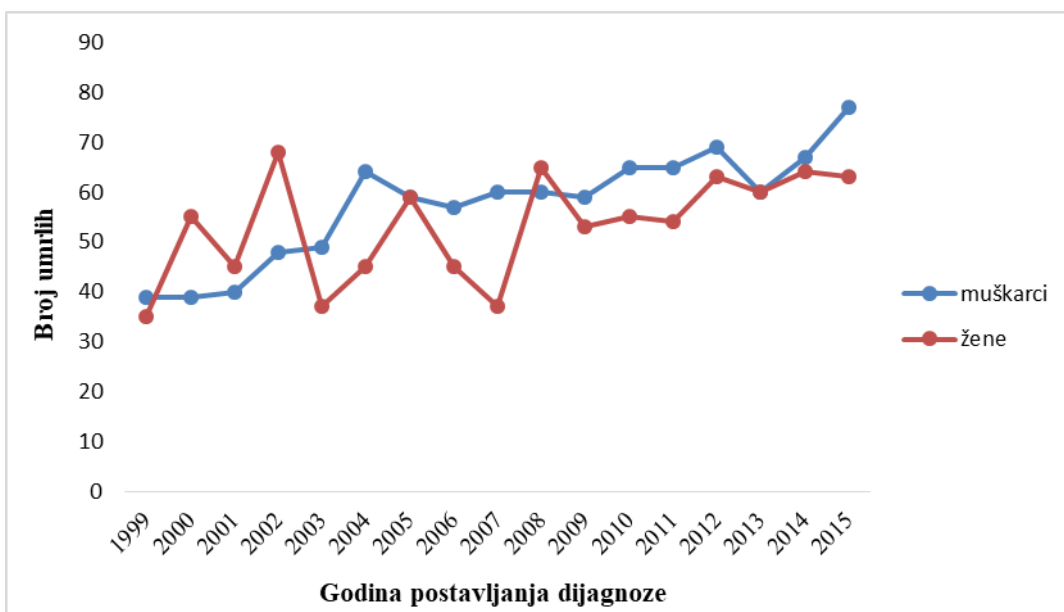
Metastazira veoma retko, u svega 0.0028 do 0.55% slučajeva (Lo i sar, 1991), najčešće u regionalne i udaljene limfne čvorove, a ređe i u druge delove kože, pluća, jetru i kosti (McCusker i sar, 2014). Iako smrtnost od ove vrste karcinoma iznosi manje od 0,1%, prognoza kod već prisutnih udaljenih metastaza je veoma loša i vreme preživljavanja iznosi između 8 meseci i 3,2 godine (Walling i sar, 2004).

Izuzimajući smrtnost, bolesti kože, među kojima i karcinomi, se nalaze na četvrtom mestu prema stepenu onesposobljenosti do kojih dovode. Svetska zdravstvena organizacija (SZO) kvantifikuje opterećenost bolešću pomoću DALY jedinice (engl. *Disability-Adjusted Life Year*) koja se smatra izgubljenom godinom „zdravog” života. Prema procenama SZO u 2000. godini zbog bazocelularnog karcinoma je na svetskom nivou izgubljeno 58 000 DALY-a (Lucas i sar, 2008). Takođe istraživanja pokazuju da je standardizovana stopa DALY-a u svetu za primarni BCK u period od 1989. do 2008. godine duplirana, odnosno da je stopa porasla sa 2 na 4/100 000 stanovnika godišnje (Hollestein i sar, 2014).

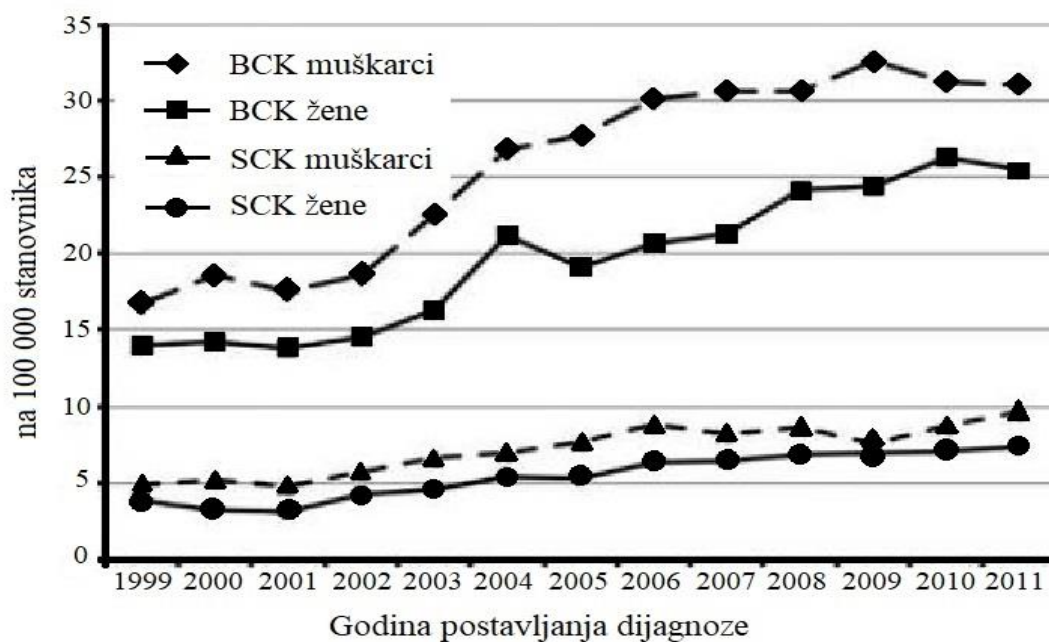
Na osnovu podataka iz Registra za rak u Centralnoj Srbiji u periodu od 1999. do 2015. godine uočava se povećanje incidencije i broja umrlih od kožnih tumora (sa izuzetkom malignog melanoma) (Grafikon 1.1 i 1.2). Ovde nije precizirana tačna vrsta kožnih tumora ali istraživanje koje ispituje učestalost kožnih tumora na teritoriji grada Beograda pokazuje da je zastupljenost BCK veća kod oba pola u odnosu na skvamocelularni karcinom (Grafikon 1.3) (Videnović i sar, 2015). Oba istraživanja pokazuju da je učestalost kožnih tumora zastupljenija kod muškog pola u odnosu na ženski pol kao i da incidencija raste sa starošću (Grafikon 1.4).



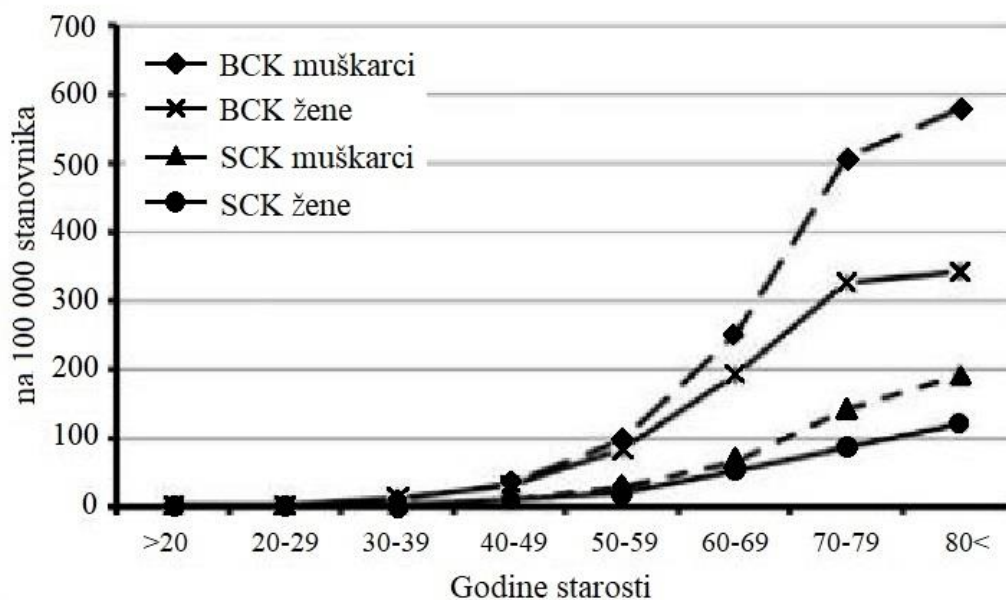
Grafikon 1.1. Broj novoobolelih od karcinoma kože na 100 000 stanovnika u Centralnoj Srbiji prema polu



Grafikon 1.2. Broj umrlih od karcinoma kože na 100 000 stanovnika u Centralnoj Srbiji prema polu



Grafikon 1.3. Godišnja standardizovana stopa incidencije oboljevanja od bazocelularnog (BCK) i skvamocelularnog karcinoma (SCK) kože na 100 000 stanovnika na teritoriji grada Beograda prema polu



Grafikon 1.4. Godišnja standardizovana stopa incidencije oboljevanja od bazocelularnog i skvamocelularnog karcinoma kože na 100 000 stanovnika na teritoriji grada Beograda u odnosu na starost pacijenata.

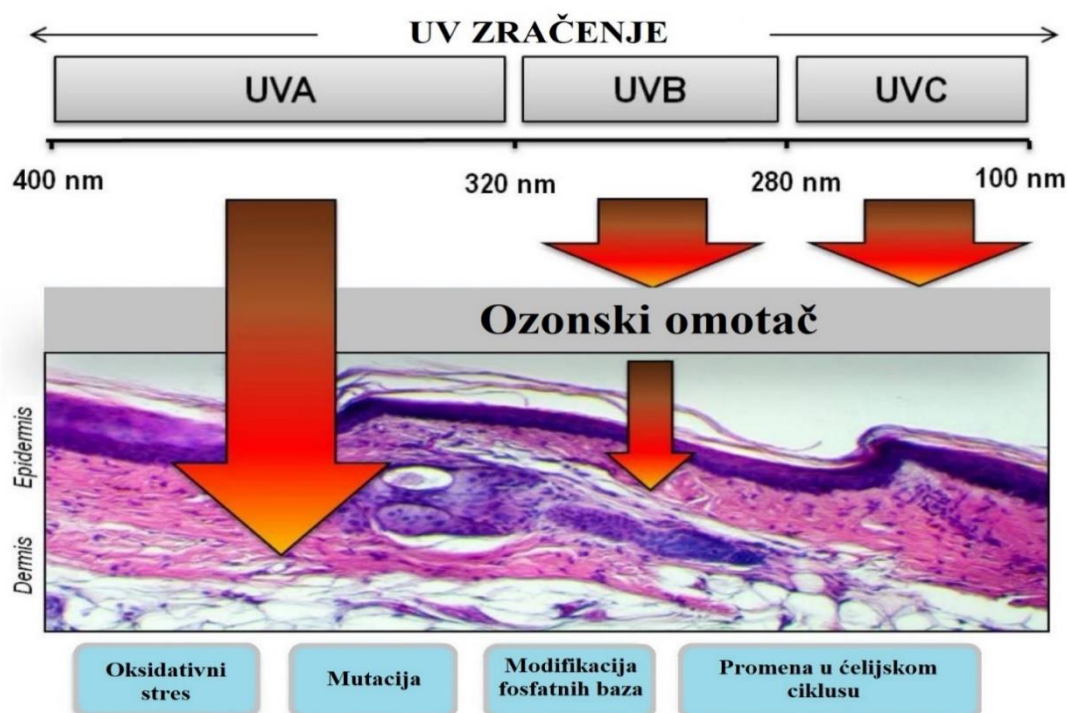
Povećana incidencija BCK-a i negativan uticaj na kvalitet života pacijenata ukazuje na potrebu za boljim razumevanjem patofiziološkog mehanizma nastanka BCK-a i unapređenjem modaliteta lečenja ovog tumora.

1.1.2. Faktori rizika za nastanak bazocelularnog karcinoma

Bazocelularni karcinom predstavlja kompleksno oboljenje koje nastaje sinergičnim delovanjem dispozicionih faktora (genotipa i fenotipa) i ekspozicionih faktora poreklom iz životne sredine. Mogućnost reparacije genetskog materijala se umanjuje sa starenjem, zbog čega vremenom dolazi do akumulacije oštećenja u molekulu DNK, te se starenje smatra faktorom rizika za nastanak BCK-a (Flohil i sar, 2013; Asgari i sar, 2012; Wei i sar, 1993; Moriwaki i sar, 1996). Ljudi sa najvećim rizikom za oboljevanje od BCK su osobe sa pozitivnom ličnom ili porodičnom anamnezom, sa prethodno dijagnostikovanim drugim nemeltoničnim kancerima kože, sa preosetljivošću na UV zračenje kao i oni koji su stalno izloženi UV zračenju. Češće se sreće kod osoba svetle boje očiju, kose i kože i kod osoba koje teže potamnjaju tokom sunčanja.

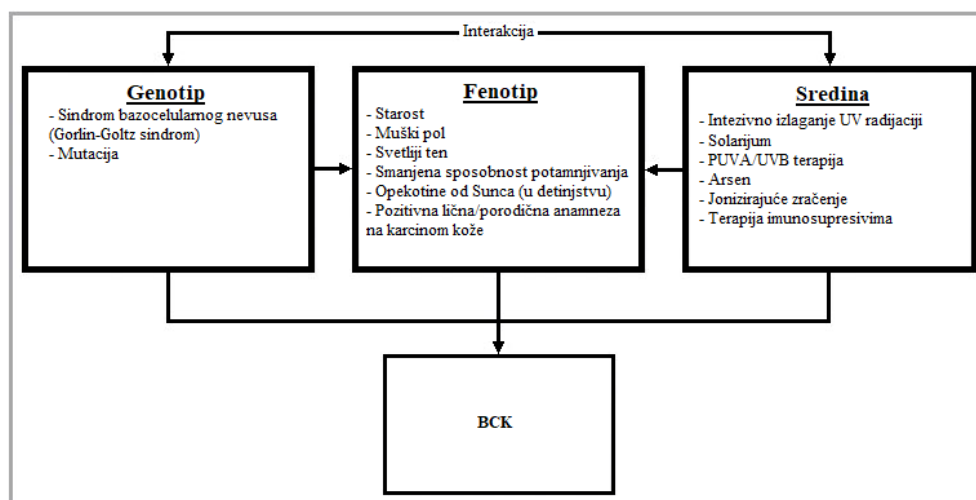
Najznačajniji ekspozicioni faktor rizika predstavlja UV zračenje, posebno u situacijama intenzivnog izlaganja ili nastanka opekotina tokom detinjstava i adolescencije (Krickler i sar, 1995). Studije su pokazale da je učestalost oboljevanja od BCK-a za 29% veća kod osoba koje su bile izložene veštačkom izvoru UV radijacije, posebno u mlađem životnom dobu (Wehner i sar, 2012).

Novija istraživanja pokazuju da su upravo UVB zraci odgovorni za brojne ćelijske, biohemijske i molekularne promene u epitelnim ćelijama. Oštećenja DNK molekula vode posledično do poremećaja ćelijske signalizacije, poremećaja regulacije ćelijskog ciklusa, poremećaja apoptoze i smanjenja antioksidativne zaštite (Slika 1.2) (Nishisgori, 2015).



Slika 1.2. Efekat UV zračenja na ćelije kože (preuzeto i modifikovano: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3709783/>)

Međutim, prisustvo BCK-a na delovima tela koji nisu izloženi UV zračenju ukazuje na uticaj drugih faktora u etiologiji BCK-a (Gallagher i sar, 1996) među kojima su najistaknutiji: jonizujuće zračenje (Lichter i sar, 2000), fotosenzitivni lekovi (Robinson i sar, 2013), alkohol (Jensen i sar, 2012), gojaznost (Park i sar, 2017) i drugi (Slika 1.3).



Slika 1.3. Multifaktorijalnost u genezi bazocelularnog karcinoma

Steding-Jessen i sar. na osnovu istraživanja sprovedenog u Danskoj 2010. godine ukazuju na uticaj socijalno ekonomskih determinanti kao faktora rizika za oboljevanja od BCK-a. Naime, viši stepen obrazovanja i viši lični dohodak predstavljaju faktor rizika za oboljevanje od bazocelularnog karcinoma za razliku od nemelanomskih karcinoma gde to nije slučaj.

1.1.3. Klasifikacija bazocelularnog karcinoma

1.1.3.1. Klinička i patohistološka klasifikacija bazocelularnog karcinoma

Histološka klasifikacija BCK-a ima važnu ulogu u postavljanju dijagnoze, određivanju adekvatne terapije i procene prognoze bolesti. Uprkos nastojanju brojnih autora da se na osnovu kliničkih i patohistoloških karakteristika izvrši klasifikacija BCK-a (Tabela 1.1) ne postoji opšteprihvaćena, jedinstvena klasifikacija ovog tumora. U literaturi se najčešće sreću: nodularni, superficijalni, infiltrativni, morfeaformni i pigmentni tip koji i čine 80-90% svih dijagnostikovanih bazocelularnih karcinoma (Vantuchova i Curik, 2006).

Prema Internacionalnoj klasifikacija bolesti u onkologiji Svetske zdravstvene organizacije (*International Classification of Diseases for Oncology, WHO*) iz 2006. godine kao zasebni podtipovi izdvajaju se nodularni, superficijalni, infiltrativni, mikronodularni, fibroepitelijalni i nešto ređi keratotični i BCK nastali diferencijacijom adneksa kože (Tabela 1.1).

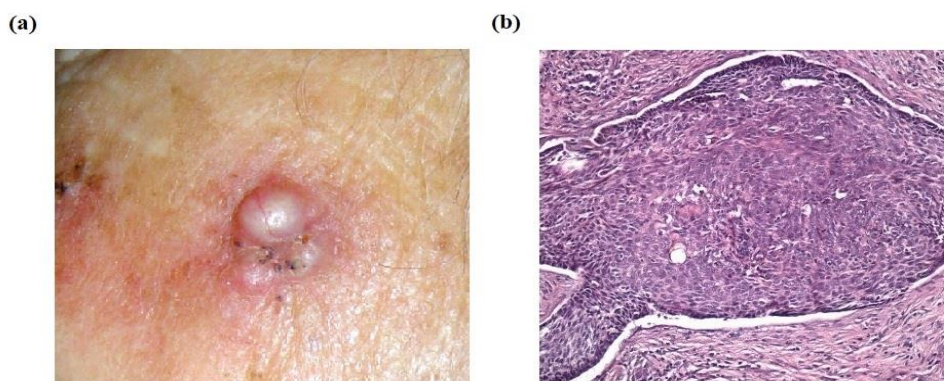
Trakatelli i sar. (2014) po preporuci Evropskog dermatološkog foruma (engl. *European Dermatology Forum*) izdvajaju nodularni, superficijalni i morfeaformni tip u okviru kojih se mogu sresti modifikacije u vidu ulceracija i pigmentacija. Nešto ređe, prisutni su i fibroepitelijalni, metatipični i miksni podtip (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Klasifikacija bazocelularnog karcinoma

Sloan 1977	Sexton 1990	Ripley 1998	Weedon 2002	Rosai 2004	WHO 2006	Patterson 2006	EDF 2014
nodularni	nodularni	nodularni, uključujući mikronodularni	nodularni	nodularni	nodularni	nodularni	nodularni
superficialni	superficialni	superficialni	superficialni	superficialni	superficialni	superficialni	superficialni
infiltrativni	infiltrativni	infiltrativni, uključujući sklerodermni	infiltrativni	infiltrativni	infiltrativni	infiltrativni	infiltrativni
nodularni sa infiltrativnom marginom	mikronodularni		mikronodularni	mikronodularni	mikronodularni		
			fibroepitelijalni	fibroepitelijalni	fibroepitelijalni	fibroepitelijalni	fibroepitelijalni
			bazoskvamozni	bazoskvamozni (metatipični)	bazoskvamozni	bazoskvamozni	
			keratotični	keratotični	keratotični	keratotični	
			pigmentni	pigmentni		pigmentni	
			infundibulocistični	infundibulocistični	sa diferencijacijom adnksa kože		
			adenoidni	adenoidni		adenoidni	
			cistični	cistični			
	sklerodermni		sklerodermni	sklerodermni		sklerodermni	sklerodermni (morfeiformni)
			metatipični	čista ćelija		metatipični	metatipični
	miksni	miksni	miksni			bazosebacealni	miksni

- **Nodularni bazocelularni karcinom (*Epihtelioma basocellulare solidum*)**

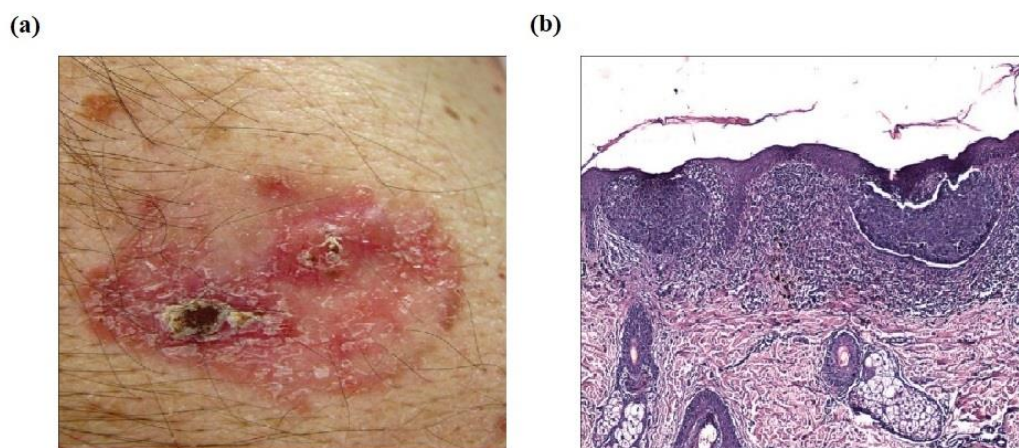
Čini 60-80% svih slučajeva BCK-a i najčešće je lokalizovan na koži lica. Promena nastaje kao transludentni mali tumefakt, ružičaste ili boje okolne kože. Lezija se postepeno uvećava a na površini i po periferiji promene mogu se javiti teleangiektazije. U centru se obično javlja ulceracija pokrivena hemoragičnom krustom, okružena perlantom transludentnom ivicom, takođe sa teleangiektazijama (Lalević-Vasić i sar, 2003). U nekim slučajevima ovaj tip BCK-a može preći u cistični ili ulcerativni tip. Lezije većih dimenzija sa centralnom nekrozom su definisane kao ulcus rodens. Endofitični čvorići klinički izgledaju kao ravne „enduring” ploče. Ukoliko često krvare mogu ličiti na hemangiom ili melanom, posebno ako su prisutne pigmentacije. Diferencijalno dijagnostički može ličiti na povređeni dermalni nevus ili amelanotični melanom. Histološki se uočavaju gnezda bazaloidnih ćelija.



Slika 1.4. Nodularni bazocelularni karcinom. Klinički izgled (a), histopatološki preparat (b).
Preuzeto i modificovano sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3573444/>

- **Superficialni (*Carcinoma basocellulare superficiale*)**

Najčešće se lokalizuje na trupu ali se može sresti i na koži lica. Čini 10-30% svih BCK-a kože. Promena je u vidu jasno ograničenog plaka ovalnog oblika. Na površini plaka postoji sitna krusto-skvama, a na periferiji se nalazi uzdignuta vrpčasta ivica prečnika 1-2 mm, perlastog izgleda. Karakteriše ga spori rast uglavnom ka periferiji što prognozu čini znatno povoljnijom u odnosu na druge podtipove. Pojava ovog tipa BCK se dovodi u vezu sa izloženošću arsenu. Histološki se uočavaju gnezda bazaloidnih ćelija lokalizovanih subepidermalno sa jasnom vezom sa bazalnim slojem epidermisa i bez infiltracije tumorskih ćelija u retikularni dermis (Dourmishev i sar, 2013).



Slika 1.5. Superficialni bazocelularni karcinom. Klinički izgled (a), histopatološki preparat (b).
Preuzeto i modificovano sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3573444/>

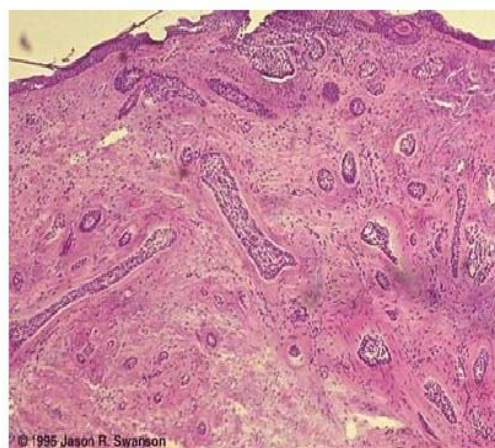
- **Sklerodermni ili morfeaformni tip (*Carcinoma basocellulare morphoeiforme (sclerodermiforme)*)**

Ova forma BCK se javlja retko, uglavnom na koži lica, češće kod žena (Altamura i sar, 2010). Klinički se uočava u vidu sklerotičnog plaka voštanožućkaste boje sa teleangiektazijama na površini promena nejasno definisanih ivica bez izdignutih rubova sa središnjim delom u vidu ulceracija sa krustama (Lalević-Vasić i sar, 2003; Dourmishev i sar, 2013). Ova vrsta bazocelularnog karcinoma pokazuje radiorezistentnost. Na histološkom preparatu uočavaju se gnezda i klasteri tumorskih ćelija okruženi gustom fibroznom stromom.

(a)



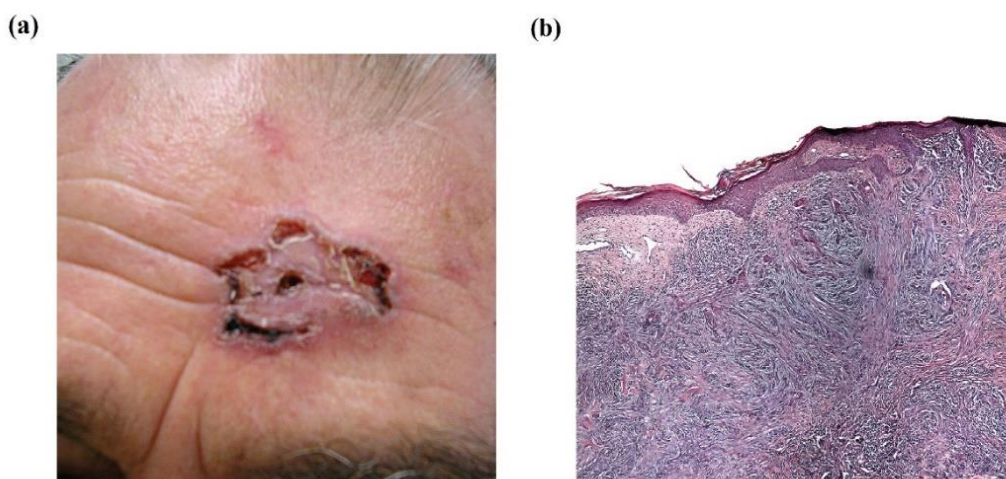
(b)



Slika 1.6. Morfeaformni bazocelularni karcinom. Klinički izgled (a), histopatološki preparat (b). Preuzeto i modifikovano sa: <http://www.dermaamin.com/site/atlas-of-dermatology/2-b/150-basal-cell-carcinoma-morpheiform-.html> i <http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/medicine/dermatology/melton/bccmor2.htm>

- **Infiltrativni BCK** (*Carcinoma basocellularae ulcerosum (exulcerans) s. ulcus rodens*)

Klinički izgleda kao beličasta, kompaktna, nejasno definisana promena. Dno ima izgled kratera pokriven krvavim sekretom, hipergranulacijama i krustama i na dodir lako krvari. Najčešće je lokalizovan na gornjem delu trupa ili na koži lica. Karakteriše se brzim i infiltrativnim rastom koji zahvata okolno tkivo do hrskavice i kosti. Tipično za ulcus rodens je da ne postoji palpatorni i spontani bol izuzev u slučaju perineuralne infiltracije kada se mogu javiti parestezija ili hiperestezija. Zbog prirode ovog tipa BCK-a, pri hirurškoj eksciziji potrebna je veća širina margine. Histološki ovaj podtip ima izgled tankih gnezda i snopova bazalnih ćelija infiltrisanih u kolagena vlakna.



Slika 1.7. Infiltrativni BCK. Makroskopski izgled (a), histopatološki preparat (b)

Preuzeto i modifikovano sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3573444/>

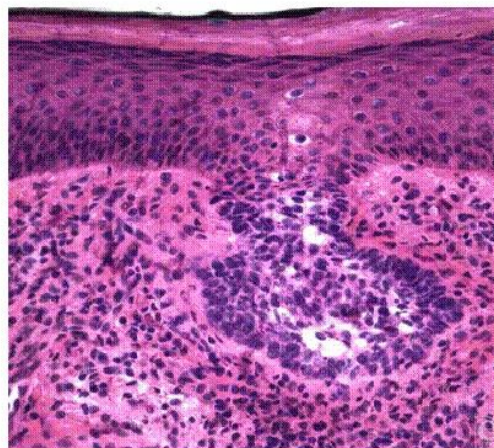
- **Pigmentni (*Carcinoma basocellularae pigmentosum*)**

Pigmentacije se mogu sresti u više kliničkih tipova bazalioma uključujući nodularni, mikronodularni, multifokalni ili superficijalni BCK, a boja može varirati od tamno braon do crne (Dourmishev i sar, 2013). Obično se sreće kod ljudi tamnih očiju i pigmentisane kose. Klinički može podsećati na maligni melanom ali histološki se ove dve vrste tumora jasno razlikuju (Lalević-Vasić i sar, 2003). Retko može dovesti i do nastanka ulceracija. Histološki se uočavaju gnezda bazaloidnih ćelija, obilje melanina ili melanofaga a prisutan je i inflamatorni infiltrat (Dourmishev i sar, 2013). Melanociti su lokalizovani neposredno uz tumorska gnezda dok su melanofagi prisutni u stromi (Dourmishev i sar, 2013).

(a)



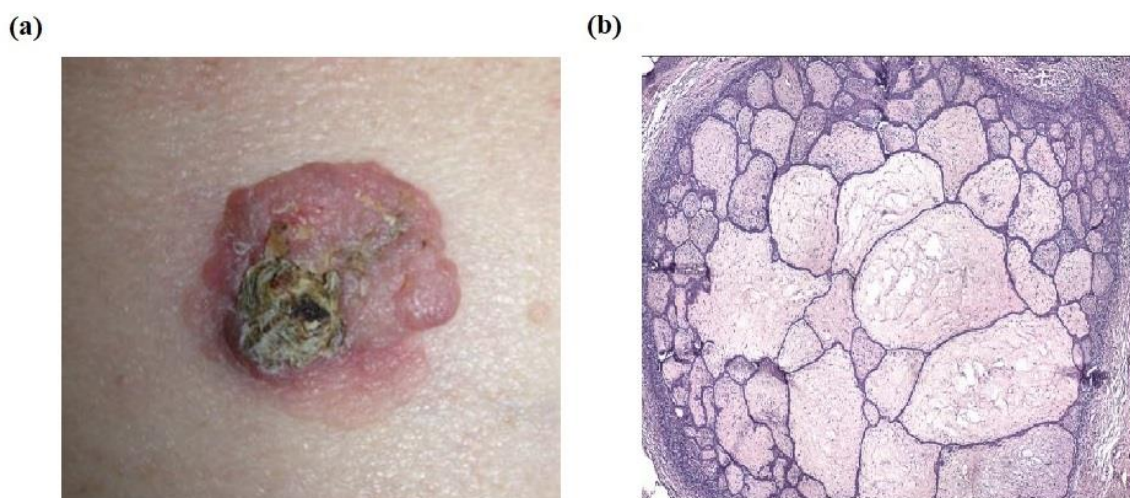
(b)



Slika 1.8. Pigmentni bazocelularni karcinom. Makroskopski izgled (a), histopatološki preparat (b). Preuzeto i modifikovano sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3573444/> i <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3919288/>

- **Fibroepitelijalni bazocelularni karcinom (*Fibroepitelioma of Pinkus, Fibroepithelioma basocellulae*)**

Ovi tumori vode poreklo od ružičastih i eritematoznih nodusa te klinički mogu podsećati na fibrom ili seboreičnu keratozu. Najčešće se sreću solitarno, ređe u većem broju i to najčešće na koži leđa i češće kod osoba ženskog pola. Smatra se da je radioterapija predisponirajući faktor za nastanak ovog tipa BCK-a. Histološki se uočava obilje vezivnog tkiva.



Slika 1.9. Fibroepitelijalni bazocelularni karcinom. Makroskopski izgled (a), histopatološki preparat (b). Preuzeto i modifikovano sa: <http://www.conganat.org/7congreso/PDF/398.pdf> i <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3573444/>

- **Sindrom bazocelularnog nevusa (*Naevobasalioma, Syndroma Gorlin-Goltz*)**

Gorlin-Goltz sindrom ili sindrom bazocelularnog nevusa je redak nasledni oblik BCK-a. Prvi su ga opisali Howel i Caro 1959. god. a zatim i Gorlin i Goltz po kojima dobija i ime. Bolest se nasleđuje autozomno dominantno preko gena lokalizovanog na hromozomu 9q31 (Gailani i sar, 1992). Javlja se na licu ili trupu u vidu tumorskih čvorića, boje normalne kože, glatke površine. Ispoljava se u ranoj životnoj dobi i karakteriše se pojavom brojnih karcinoma, ponekad i više stotina (Gorlin, 1995). Oni su najčešće nodularnog, superficijalnog i infundibulocističnog tipa (Crowson, 2006). Kožne promene mogu biti udružene sa drugim anomalijama na kostima, nervnom sistemu ili očima. Uobičajena je pojava odontogenih keratocista, a vrlo često je prisutna i palmoplantarna diskeratoza (Manfred i sar, 2004).

1.1.3.2. Klasifikacija BCK-a prema stepenu rizika od recidiva

Prema Dandurand i sar. (2006) na osnovu prognostičkih faktora definisane su tri grupe rizika za recidiviranje BCK-a. U grupu malog rizika svrstan je superficijalni BCK dok su u grupu srednjeg rizika svrstani nodularni i rekurentni superficijalni BCK. U visokorizične BCK svrstavaju se morfeaformni ili slabo definisani BCK, nodularni većih dimenzija, sve rekurentne forme kao i BCK sa histološki agresivnijim karakteristikama (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Klasifikacija BCK-a na osnovu rizika od recidiva

Nizak rizik	Srednji rizik	Visoki rizik
Primarni superficijalni BCK	Rekurentni superficijalni BCK	Klinička forma: Morfeaformni ili slabo definisan
Nodularni primarni BCK kada je: <1 cm u području srednjeg rizika <2 cm u području niskog rizika	Nodularni primarni BCK kada je: <1 cm u području visokog rizika >1 cm u području srednjeg rizika >2 cm u području niskog rizika	Nodularni primarni BCK kada je: >1 cm u području visokog rizika
Fibroepitelijalni BCK		Agresivne histološke forme BCK - a Rekurentne forme (osim superficijalnog BCK - a)

1.1.3.3. TNM klasifikacija bazocelularnog karcinoma

Najčešće korišćena klasifikacija BCK-a je prema tzv. TNM-sistemu, predložena od strane Američkog udruženje za klasifikaciju tumora - AJCC (*eng. American Joint Committee on Cancer Classification*) i od 01.01.2018. godine dopunjena od strane Unije za internacionalnu kontrolu tumora - UICC (*eng. Union for International Cancer Control*).

TNM klasifikacija kožnih tumora glave i vrata vrši se na osnovu nekoliko kriterijuma (UICC TNM 8):

Tabela 1.3. Veličina tumora (T)

TX	Tumor se ne može oceniti
T0	Nema znakova tumora
Tis	Karcinom in situ
T1	Tumor veličine 20 mm ili manji u najvećem dijametru
T2	Tumori veći od 20 mm, ali manji od 40 mm
T3	Tumor veličine preko 40 mm u najširem dijametru, ili prisustvo manjih erozija kosti, perineuralne invazije ili duboke invazije
T4a	(T1 i T2 mogu se klasifikovati kao T3 ukoliko su prisutni visoko rizični kliničko patološki parametri: duboka invazija, perineuralna invazija ili mala erozija kosti.
T4b	Velika invazija tumora u korteks kosti i kosnu srž

Tabela 1.4. Stepen širenja tumora prema regionalnim limfnim čvorovima (N)

NX	Regionalni limfni čvorovi se ne mogu oceniti
N0	Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1	Prisutne su metastaze u lokalnim ili manjem broju regionalnih limfnih čvorova, najšireg dijametra 3 cm
N2a	Prisustvo metastaza u jednom limfnom čvoru sa iste strane dijametru većeg od 3 cm, ali manjeg od 6 cm, bez širenja izvan granica limfnog čvora.
N2b	Prisustvo metastaza u više limfnih čvorova sa iste strane, dijametra od 6 cm, bez širenje izvan granica limfnog čvora*
N2c	Prisustvo metastaza u limfnim čvorovima sa suprotne ili sa obe strane, dijametra od 6 cm, bez širenje izvan granica limfnog čvora
N3a	Prisustvo metastaza u limfnim čvorovima, dijametra većim od 6 cm, bez širenje izvan granica limfnog čvora.
N3b	Prisustvo metastaza u limfnim čvorovima sa širenjem izvan granica limfnog čvora

* Širenje tumora izvan granica limfnog čvora može biti definisano na osnovu kliničkih ili histopatoloških parametara.

Tabela 1.5. Prisustvo metastaza (M)

M0	Nema udaljenih metastaza
M1	Metastaze u udaljenim organima su prisutne

Na osnovu veličine tumora, stepena širenja prema regionalnim limfnim čvorovima i prisustva metastaza izvršena je podela na stadijume koji predstavljaju važan parametar u izboru terapijskog tretmana.

Tabela 1.6. Stadijum kancera

Stadijum 0	Tis	N0	M0
Stadijum I	T1	N0	M0
Stadijum II	T2	N0	M0
Stadijum III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadijum IVA	T1, T2, T3	N2, N3	M0
	T4	Bilo koji N	M0
Stadijum IVB	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

S obzirom da su kod BCK-a parametri N i M u preko 99% slučajeva jednaki 0, stadijum zavisi isključivo od veličine tumora (T).

1.1.4 Terapija bazocelularnog karcinoma

1.1.4.1. Hirurška terapija

Dosadašnja istraživanja su pokazala da hirurška terapija predstavlja zlatni standard u terapiji bazocelularnog karcinoma (Gustaitytė i Illum, 2013; Dubas i Ingraffea, 2013; Abbas i Borman, 2012). Dva modaliteta hirurške terapije u lečenju BCK-a su hirurška ekscizija i Mohs-ova mikrografska hirurgija. Hirurška ekscizija podrazumeva uklanjanje suspektne promene *in toto* sa odgovarajućom širinom okolnog tkiva nakon čega se uzorak šalje na histopatološki pregled a intervencija završava direktnom suturom, regionalnim flapom ili kožnim graftom. Mohs-ova mikrografska hirurgija predstavlja poseban vid hirurške terapije pri čemu se neposredno nakon uzimanja uzorka promene pregleda pod mikroskopom i u slučaju da se na marginama uočavaju tumorske ćelije, hirurška procedura se nastavlja do potvrđivanja čiste margine. Istraživanja su pokazala da nema statistički značajne razlike u stopi recidiviranja između ove dve metode (Smeets i sar, 2004). Druga prospektivna istraživanja su pokazala prednost Mohs-ove mikrografske hirurgije samo u slučaju rekurentnih promena (Mosterd i sar, 2008). Usled hirurških zahvata na promenama sa delikatnom lokalizacijom u regiji lica ponekad je potrebna rekonstrukcija defekata višestrukim operacijama. U nehirurške terapijske metode lečenja BCK-a svrstavaju se: kiretaža, fotodinamska terapija i radioterapija (Kuijpers i sar, 2002; Bower i sar, 2001).

1.1.4.2. Medikamentozna terapija

U medikamentoznoj terapiji ovog tumora koriste se brojni lekovi sa različitim mehanizmom delovanja. Sprečavanje lokalnog napredovanja i diseminacije tumorskih ćelija kod uznapredovalih BCK-a, nedavno je uspešno postignuto upotrebom „Hedgehog” inhibitora (Bassetseguin i sar, 2015; Sekulic i sar, 2012). Cisplatin i 5-fluorouracil (5-FU) su lekovi iz grupe citostatika koji takođe inhibitorno deluju na „Hedgehog” signalni put. U terapiji manje agresivnih podtipova BCK-a veličine od 5–20 mm koristi se imikvimod krem – sintetički imuno-modulator koji stimuliše oslobađanje IFN-alpha (interferon alfa), IL-6 (interleukin-6) i TNF-alpha (tumor nekrozis faktor alfa) (Geisse i sar, 2002). Ovaj medikament je posebno efikasan kod solitarnog superficijalnog BCK-a (Ruiz-Villaverde i sar, 2009).

1.1.4.3. Radioterapija bazocelularnog karcinoma

Radioterapija predstavlja efikasan i pouzdan način lečenja BCK-a. Najčešće se primenjuje kod promena većih dimenzija i starijih pacijenata. Kontaktna radioterapija deluje samo na površinska tkiva, stoga manje oštećuje okolno zdravo tkivo, zbog čega joj se daje prednost. Primena je ograničena na manje tumore čija debljina ne prelazi 10 mm. Ukupna doza zračenje je 40 do 50 Gy i daje se u nekoliko serija u tretmanima raspoređenim tokom 2 nedelje, 5 puta nedeljno (Lalević-Vasić i sar, 2003).

Dizajn, razvoj i evaluacija standardnih metoda lečenja poput hirurške terapije, radioterapije, hemoterapije i ciljane terapije zasniva se na odgovoru celokupne tumorske mase na tretman. Ovaj pristup se i dalje primenjuje uprkos dobro poznatoj činjenici da tumori pokazuju izuzetnu genotipsku i fenotipsku heterogenost koja utiče na njihovu hemo i radio-osetljivost. Zaustavljanje rasta, smanjenje i eradikacija tumorske mase je moguće samo pod uslovom da terapija dopre do najrezistentnije subpopulacije ćelija unutar heterogene tumorske mase. Istraživanja pokazuju da rezistentnost na terapiju leži upravo u kancerskim matičnim ćelijama (Frank i sar, 2005; Wulf i sar, 2001). Ukoliko terapija nije usmerena ciljano prema KMC, ponovna inicijacija bi mogla dovesti do recidiva (Kamstrup i sar, 2007).

1.3.5. Faktori koji utiču na recidiviranje bazocelularnog karcinoma

Brojni su faktori koji mogu uticati na stopu recidiva nakon terapije BCK-a. Istraživanja pokazuju da je stepen recidiva primarnih lezija niži od recidiva rekurentnih lezija. Nakon petogodišnjeg praćenja, prema istraživanju Wennberg i sar. (1999) procenat recidiva primarnih BCK-a je iznosio 6,5% a recidivirajućih 10%.

1.3.5.1. Veličina lezije i širina hirurške ekscizije

Veličina lezije direktno utiče na verovatnoću pojave recidiva (Silverman i sar, 1992; Helsing i sar, 2004). Za tumore veličina 2 cm, preporučena margina kojom se postiže 95% uspešnosti izlečenja iznosi 4 mm (Wolf i Zitelli, 1987). Kasnija istraživanja su pokazala isti stepen uspešnosti sa širinom margine od 3 mm za lezije manje od 2 cm

(Gullet i sar, 2010). U literaturi se najčešće sreće margina od 4 mm, a učestalost histološki negativnih margina nakon hirurške ekscizije iznosi oko $86 \pm 12\%$ (Gullet i sar, 2010).

Adekvatna širina margine pri hirurškoj eksciziji BCK-a bi trebalo da onemogući ostajanje ćelija tumora izvan zone resekcije, kako bi se mogućnost recidiva svela na minimum a zdravo tkivo maksimalno očuvalo. Što je promena veća to je polje hirurške ekscizije šire. U brojnim kliničkim studijama je pokazano da kod primene uske margine postoji najveća verovatnoća za recidiv (Armstrong i sar, 2015; Gulleth i sar, 2010). Istraživanja pokazuju da sa opadanjem širine margine u tretmanu BCK-a raste procenat recidiva. Meta analiza ukazuje da se za promene veličine do 20 mm, širinom margine od 3 mm, postiže stepen uspešnosti bez recidiva u 95% slučajeva (Gulleth i sar, 2010). Prema Thomas-u i sar. (2003) širina hirurške ekscizije primarnih nemelanomskih karcinoma treba da iznosi 4 mm, dok prema Pichardo-Velazquez i sar. (2004) širina ekscizije od 5 mm predstavlja najsigurniju meru prevencije recidiva što u slučaju BCK-a lokalizovanog na koži nosa, kapaka, čela itd. dovodi do ozbiljnih estetskih problema (Thomas i sar, 2003).

Gulleth i sar. (2010) u svom istraživanju pokazuju značajnu vezu između stepena recidiva i veličine hirurške margine. Ona za veličinu margine od 4 mm iznosi 4,2%, za marginu od 3 mm 6,5% a za marginu od 2 mm iznosi 10%. Histološki čista margina se u 85% podjednako postiže sa širinom margine od 5, 4 i 3 mm širine, dok je za marginu širine 2 mm taj procenat nešto niži (82%).

Širina ekscizije i prisustvo ćelija tumora na linijama resekcije je u direktnoj korelaciji sa histološkim tipom bazocelularnog karcinoma, tako da adekvatnost hirurške ekscizije direktno zavisi od vrste bazocelularnog karcinoma. Invazivni histološki podtipovi (sklerozirajući, ulcerativni, infiltrativni i mikronodularni) češće recidiviraju od ostalih. Među njima infiltrativni podtip BCK-a ima najveći rizik od ponovnog recidiviranja (četiri od pet pacijenata) (Armstrong i sar, 2017).

1.3.5.2. Pozitivna margina na histopatološkom pregledu

U slučaju da je na histopatološkom pregledu ustanovljeno prisustvo tumorskih ćelija u margini, verovatnoća recidiviranja iznosi 27%. BCK sa lokalizacijom na koži

poglavine ima najveći rizik od recidiva, zatim slede nos, obrazi a potom ostale lokalizacije na telu (Gulleth i sar, 2010).

Prema podacima iz literature, najveći stepen recidiva detektuje se tokom ranijeg perioda praćenja. Oko 50% svih recidiva se ustanovi nakon 2 godine praćenja, 66% nakon 3 godine i svega 18% nakon 5 godina praćenja (Rowe i sar, 1989). Stopa recidiva manja od 5% nakon hirurške terapije BCK-a se smatra prihvatljivom (Wolf i Zitelli, 1987; Kimyai-Asadi i sar, 2005; Lalloo i Sood, 2000).

1.2. CELULARNI I MOLEKULARNI MEHANIZMI PATOGENEZE BCK KOŽE

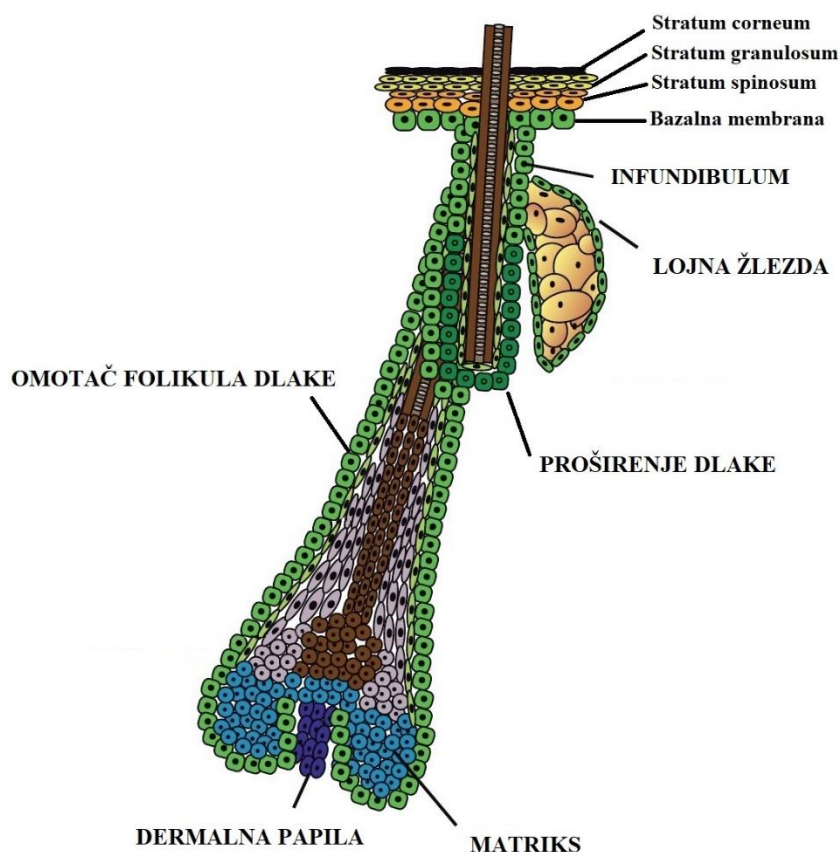
1.2.1. Koža i matične ćelije kože

Kožu sisara čine **epidermis**, slojeviti **skvamozni epitel** i osnovno vezivno tkivo bogato matriksom – **dermis**. Zajedno, oni predstavljaju prepreku za ulazak toksina i patogena iz spoljašnje sredine, kao i barijeru za gubitak vode. U koži su smešteni folikuli dlake okruženi interfolikularnim epidermisom, kao i lojne žlezde (Slika 1.10).

Epidermis se sastoji od bazalnog sloja, koji se nastavlja u dermis i nekoliko suprabazalnih slojeva različite histološke građe koji se nazivaju spinozni, granulacioni i kornealni. Pojedine ćelije epidermisa imaju osobinu proliferacije, migracije, diferencijacije i programirane ćelijske smrti (Blanpain i sar, 2009). Narušavanje ravnoteže između ova četiri procesa, može dovesti do razvoja kancera.

Matične (stem) ćelije se definišu kao populacija ćelija sa sposobnošću samoobnavljanja i stvaranja novih ćelija koje procesom diferencijacije postaju specijalizovane, zrele ćelije određenih tkiva (Reya i sar, 2001). Integritet kože se održava kroz kontinuirano obnavljanje i reparaciju epidermisa posredovani signalnim kaskadama unutar populacije matičnih ćelija i populacije ćelija progenitora što rezultira terminalnom diferencijacijom ovih samoobnavljajućih populacija. Matične ćelije su prisutne i u ispupčenju folikula dlake i interfolikularnom epidermisu ali je njihova uloga u homeostazi u ovim sredinama različita.

Grupa ćelija folikula dlake smeštena u tzv. ispupčenju dlake predstavlja rezervoar multipotentnih ćelija odgovornih za rast dlake ali i za proces reparacije i regeneracije epidermisa (Levy i sar, 2007; Blanpain i sar, 2004). Za razliku od ispupčenja dlake, interfolikularni epidermis, infundibulum dlake, istmus i lojne žlezde sadrže više diferentovane ćelije tzv. adultne matične ćelije (Jensen i sar, 2008; Clayton i sar, 2007; Ghazizadeh i sar, 2001). Balans u proliferaciji i diferencijaciji između populacije progenitorskih i matičnih ćelija osnova je za održavanje homeostaze i obnavljanje kože sa normalnim ćelijskim kruženjem koje se dešava na svake 2–4 nedelje. Pretpostavlja se da poremećaj mehanizama samoobnavljanja kože može dovesti do različitih bolesti kože, uključujući i karcinom (Clayton i sar, 2007).

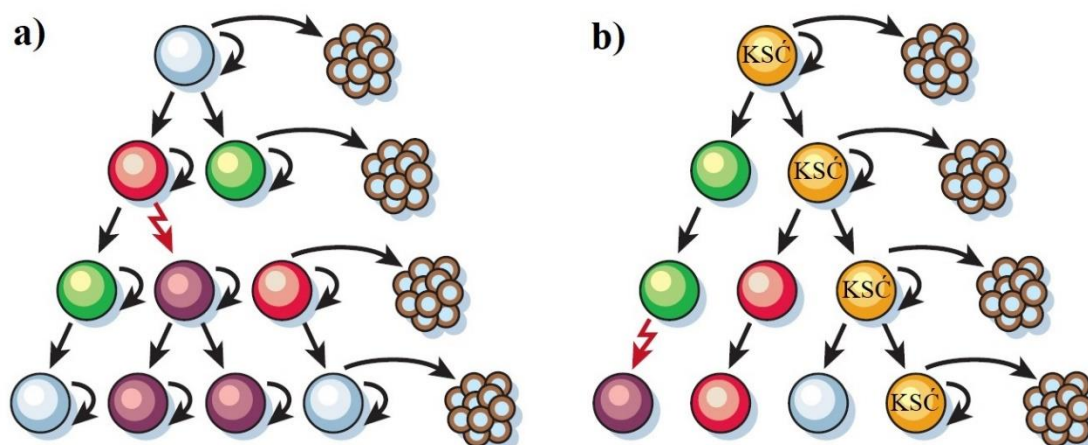


Slika 1.10. Građa kože sa matičnim ćelijama kože (preuzeto i modifikovano: <https://www.nature.com/articles/ncb2031>)

Sledeći sličnu paradigmu, došlo se do hipoteze da razvoj nemelanomskih karcinoma kože potiče od jedne vrste samoobnavljajućih kancer-inicirajućih ćelija (KIĆ) koja je prethodno bila matična ili progenitorska ćelija (Watt, 2001; Blanpain i sar, 2004; Taylor i sar, 2000; Tumber i sar, 2004). Razlog zašto se smatra da su ćelije u osnovi bazocelularnog karcinoma kancer inicirajuće ćelije (KIĆ) ili progenitorske ćelije a ne diferentovane ćelije je njihova sposobnost samoobnavljanja, pri čemu je dovoljna mala genetska alteracija za transformaciju u kancersku matičnu ćeliju (Lobo i sar, 2007). Prema Youssef i sar. (2010) BCK vodi poreklo od progenitorskih ćelija epidermisa i gornjeg infundibuluma (dela epidermisa koji povezuje folikul dlake sa interfolikularnim epidermisom), prema Wongu i Reiteru (2011) od ćelija interfolikularnog epidermisa dok prema Petersonu i sar. (2015) potiče od matičnih ćelija folikula dlake i mehanosenzornih receptora kože.

1.2.2. Kancerske matične ćelije

Tumor predstavlja heterogenu populaciju ćelija koja poseduje sposobnost proliferacije i diferencijacije u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Sirard i sar, 1996; Bruce i Van Der Gaag, 1963; Moore i sar, 1973). Kao objašnjenje ponuđene su različite teorije. Stohastička teorija predlaže da sve ćelije raka imaju jednak potencijal za iniciranje nastanka tumora, pri čemu je verovatnoća ovog događaja u jednoj ćeliji vrlo niska (Slika 1.11.a) (Nowell, 1976). Nasuprot tome, teorija matičnih ćelija predviđa da samo mala frakcija ćelija tumora – kancerske matične ćelije imaju potencijal samoobnavljanja a time i formiranje tumora (Slika 1.11.b) (Reya i sar, 2001). Koncept kancerskih matičnih ćelija pruža drugačiji okvir za razumevanje procesa kancerogeneze a ujedno ima i značajan uticaj u razvoju tumorske terapije.

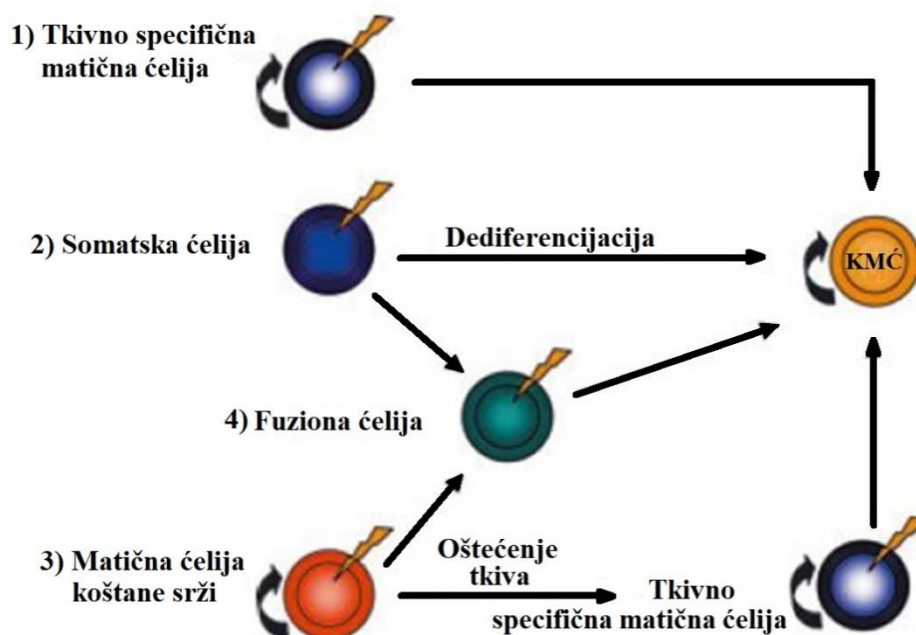


Slika 1.11. Heterogenost ćelija u solidnim tumorima. Prema prvom prikazu (a) tumorsku masu čine ćelije sa različitim fenotipom, pri čemu svaka od ćelija ima sposobnost neograničene proliferacije. Prema drugom prikazu (b) tumorsku masu može činiti heterogena populacija ćelija koja se sastoji iz ćelija sa ograničenim proliferativnim potencijalom i posebne subpopulacije ćelija sa velikim proliferativnim potencijalom i sposobnošću stvaranja novih tumorskih ćelija (*preuzeto i modificovano: <https://www.nature.com/articles/35102167>*)

Koncept o kancerskim matičnim ćelijama star je gotovo dva veka. Tek kasnije ova hipoteza je dokazana izolacijom matičnih ćelija leukemije (Lapidot i sar, 1994), čime nije potvrđena samo heterogenost tumora već i hijerarhija u ćelijskoj organizaciji tumora. Zatim su usledila istraživanja usmerena ka identifikaciji kancerskih matičnih ćelija u solidnim tumorima i definisanju njihovih markera u tumoru mozga (Singh i sar, 2003; Hemmati i sar, 2003), karcinomu dojke (Al-Hajj i sar, 2003), prostate (Colins i sar, 2005), karcinomu pluća (Eramo i sar, 2008) i skvamocelularnom karcinomu glave i vrata (Prince i sar, 2007; Han i sar, 2014; Yanamoto i sar 2011). Mali broj KMC je identifikovan i u kožnim tumorima: melanomu (Tobias i sar, 2008), skvamocelularnom karcinomu kože (Liu i sar, 2014), kožnom limfomu (Kamstrup i sar, 2007) i bazocelularnom karcinomu (Hutchin i sar, 2005).

Poreklo kancerskih matičnih ćelija još uvek nije u potpunosti razjašnjeno. Smatra se da mogu nastati iz tkivno specifičnih matičnih ćelija kod kojih je usled učestalih deoba i akumulacije mutacija na nivou DNK došlo do maligne transformacije (Slika 1.12.1). Takođe, postoji mogućnost transformacije diferencirane somatske ćelije u kancersku matičnu ćeliju usled dugotrajnog izlaganja kancerogenima koji dovode do

dediferencijacije, nekontrolisanog umnožavanja ćelija i sticanja osobina matičnosti (Slika 1.12.2) (Cozzio i sar, 2003; Jaiswal i sar, 2003).



Slika 1.12. Transformacija zdrave matične ćelije u kancersku matičnu ćeliju (preuzeto i modifikovano sa: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-0625.2007.00547.x>)

1.2.2.1. Karakteristike kancerskih matičnih ćelija

Kancerske matične ćelije pokazuju slične karakteristike kao i zdrave matične ćelije (MĆ). Zdrave matične ćelije se odlikuju asimetričnom deobom pri čemu se od jedne MĆ dobija jedna matična ćelija i jedna progenitorska ćelija koja se kasnije diferencira u zrelu adultnu ćeliju koja izgrađuje tkivo (Lajtha, 1979). Pored sposobnosti samoobnavljanja i višelinjske diferencijacije MĆ imaju sposobnost i neograničene proliferacije. Životni vek MĆ je veoma dug, zbog čega postoji velika verovatnoća akumulacije mutacija odgovornih za kancerogenezu (Reya i sar, 2001). Smatra se da KMĆ mogu poticati i od tkivno specifičnih zdravih matičnih ćelija ili iz drugih tipova ćelija koje su stekle osobine matičnosti (Kamstrupi sar, 2007).

Prema Petersonu (2015) za agresivno ponašanje nekih karcinoma je odgovorna upravo posebna populacija tumorskih ćelija – KMĆ.

Visok proliferativni kapacitet i sposobnost samoobnavljanja predstavljaju jednu od fundamentalnih karakteristika KMĆ. Sposobnost migracije je takođe jedna od karakteristika matičnih ćelija. Ćelijska migracija se definiše kao kretanje pojedinačnih ili grupe ćelija sa jednog mesta na drugo (Friedl i sar, 2000, Friedl i sar, 2003). Sreće se u brojnim fiziološkim i patološkim procesima kao što su zarastanje rane, inflamacija, diferencijacija ali i kancerogeneza (Horwitz i sar, 2003 i Eccles i sar, 2005). Test zarastanja rane ili „Scratch assay” je najpre korišćen kao model zarastanja rane sa epitelnim i mezenhimalnim ćelijama u *in vitro* uslovima (Friedl i sar, 2004), a svoju primenu je kasnije našao i u izučavanju ponašanja brojnih tumora.

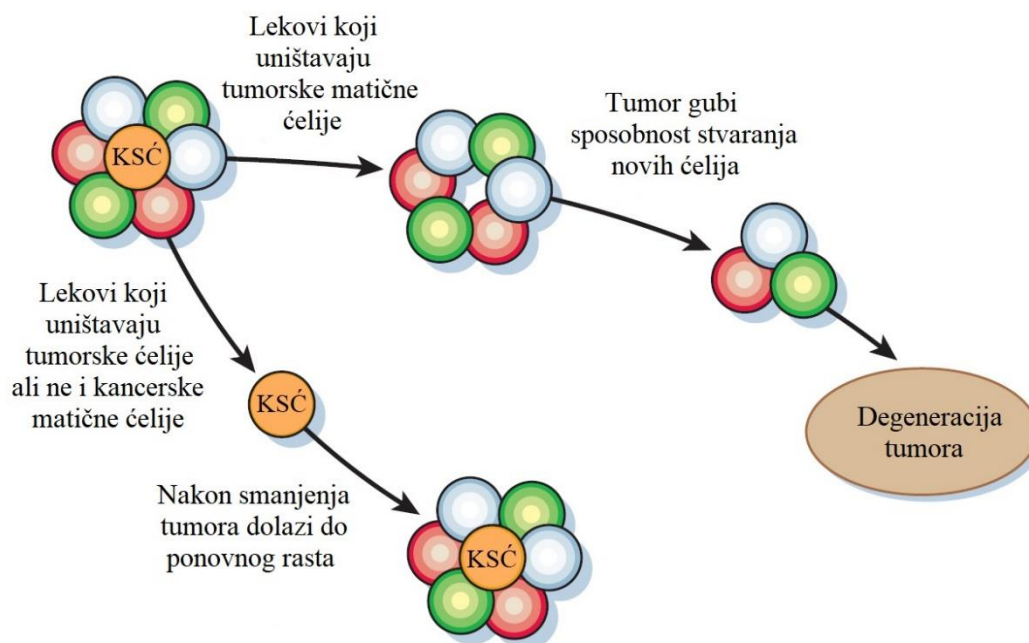
Solidni tumori rastu u trodimenzionalnom prostoru pa se i stvaranje trodimenzionalnih kultura u *in vitro* uslovima smatra reprezentativnijim od dvodimenzionalnih (Durand i sar, 1998, Weiswald i sar, 2015). Kada nije moguće naći specifični marker kancerskih stem ćelija nekog određenog tumora, kao što je slučaj sa većinom KMĆ, kao funkcionalni test za njihovo detektovanje koristi se test formiranja sfera. U cilju utvrđivanja specifičnih KMĆ-a primenjeno je na mnogim tumorima, uključujući karcinom dojke (Ponti i sar, 2005), debelog creva (Ricci-Vitiani i sar, 2007), prostate (Collins i sar, 2005), pluća (Eramo i sar, 2008), pankreasa (Li i sar, 2007) i jajnika (Zhang i sar, 2008).

Zdrave kao i kancerske matične ćelije poseduju jedinstvene karakteristike, a to su mogućnost samoobnavljanja i mogućnost diferencijacije u više linija adultnih ćelija (Alison i Islam, 2009; Zhang i sar, 2008). S obzirom da KMĆ vode poreklo od matičnih ćelija, stepen diferencijacije i malignosti zavisiće od stepena diferencijacije ćelija na kom je došlo do zastoja u sazrevanju i onkogene mutacije. Ukoliko se zaustavljanje procesa sazrevanja dogodi u ranoj fazi diferencijacije kada može nastati više ćelijskih linija, ćelije tumora će biti slabo diferencijovane i visoko maligne. Ukoliko do zastoja dođe u kasnijoj fazi diferencijacije, tumorske ćelije će biti više diferencijovane sa manjim malignim potencijalom (Sell, 2004).

Poznato je da se matične ćelije karakterišu dugim životnim vekom, otpornošću na apoptozu, na različite lekove i da poseduju sposobnost reparacije DNK. Već je pomenuto da postoji mogućnost da kancerske matične ćelije vode poreklo od zdravih matičnih ćelija iz čega proizilazi pretpostavka da iste ove osobine mogu imati i KMĆ. Tumorske ćelije pokazuju rezistenciju na lekove putem više različitih mehanizama kojima se remeti

apsorpcija, distribucija i eliminacija leka iz tkiva. Brojna istraživanja u solidnim tumorima (Dou i sar, 2007; Bragado i sar, 2013) ukazuju da su za hemiorezistenciju upravo odgovorne KMĆ.

Tumori koji se ponovo javljaju nakon primarnog pozitivnog odgovora na hemioterapiju uglavnom pokazuju multiplu rezistentnost na lekove. Prema Dean i sar. (2005) postoji tri moguća objašnjenja za hemiorezistentnost tumora (Slika 1.13). Prema konvencionalnoj teoriji, otpornost na terapiju nastaje usled genskih promena u svega jednoj ili nekoliko tumorskih ćelija koje razvijaju rezistenciju na lek, što selektivno omogućava njihovo preživljavanje i preuzimanje dominacije u odnosu na druge ćelije tumorske mase. Druga mogućnost je da tumorske matične ćelije prirodno poseduju otpornost na hemioterapiju zbog stanja „pritajenosti”, sposobnosti reparacije DNK i postojanja specijalnih transportera za lekove. Na taj način preživele ćelije učestvuju u obnavljanju tumora. Prema trećoj teoriji, tumorske matične ćelije ili njihovi bliski potomci stiču otpornost na hemioterapeutike i tu osobinu prenose na svoje potomstvo. Na osnovu ove teorije isti mehanizam koji u zdravim matičnim ćelijama usled izlaganja radijaciji i kancerogenima dovodi do akumulacije mutacija, u kancerskim matičnim ćelijama nagomilavanjem mutacija dovodi do rezistentnosti na lekove.



Slika 1.13. Rezistentnost tumorskih stem ćelija (preuzeto i modifikovano sa:

<https://www.nature.com/articles/35102167>)

1.2.2.2. Markeri kancerske matičnosti

Oct4, Sox2, Nanog

Oct4 protein, takođe poznat i kao Oct-3, Oct-3/4, Otf3 ili NF-A3, kodiran je od strane Pou5f1 gena, lociran na hromozomu 6 i pripada POU (Pit, Oct, Unc) familiji DNK vezujućih proteina. Ovi proteini regulišu funkciju ciljnih gena vezivanjem za sekvencu ATGCAAAT unutar promotorskih ili pojačivačkih regiona (Yeomi sar, 1991). Transkripcioni faktor Oct4 igra važnu ulogu u ranoj embriogenezi i ispoljavanju osobine pluripotentnosti (Nichols i sar, 1998) a takođe je prisutan i u diferentovanim ćelijama benignih i malignih tumora (Tai i sar, 2005). Nedavna istraživanja dovode u direktnu vezu Oct4 marker i recidiviranje BCK-a (Naini i sar, 2017). Sox2 je član Sox genske familije transkripcionih faktora i pored glavne uloge u kontrolisanju neuronskih progenitorskih ćelija igra ulogu i u patogenezi nekih malignih tumora (Schoenhals i sar, 2009). Nedavna istraživanja su pokazala da u razvoju različitih vrsta tumora Sox2 ispoljava različite uloge (Zhao i sar, 2015; Mou i sar, 2015) a u nekima može imati i prognostički značaj (Ruan i sar, 2013). Podaci iz literature pokazuju da Sox2 u osteosarkomu (Basu-Roy i sar, 2012), kolorektalnom karcinomu (Li i sar, 2015), karcinomu prostate (Kregel i sar, 2013), dojke (Ling i sar, 2012) i jajnika (Wang i sar, 2014) promoviše razvoj tumora dok sa druge strane u karcinomu pluća (Wilbertz i sar, 2011) i karcinomu želuca (Li i sar, 2016) pokazuje inhibitorno dejstvo u kancerogenezi. U regulaciji embrionalnih matičnih ćelija pored Oct4 i Sox2 učestvuje i Nanog. Istraživanja Silva i sar. (2009) pokazuju da Nanog ne predstavlja okidač reprogramiranja somatskih ćelija ali da je neophodan za održavanje stanja pluripotentnosti nakon reprogramiranja u *in vitro* uslovima. Njegovo prisustvo registrovano je u nekim solidnim tumorima (Ezeh i sar, 2005; Huang i sar, 2009; Ling i sar, 2012) gde se dovodi u vezu sa proliferacijom, klonogenim potencijalom, invazivnošću i rezistencijom na terapiju (Jeter i sar, 2015).

CD44

Transmembranski protein CD44 poznat i kao P-glikoprotein, kodiran je od strane gena na hromozomskom lokusu 11p13 (Iczkowski, 2010). Sastoji se od ekstracelularnog domena koji je zadužen za komunikaciju sa spoljašnjom mikrosredinom, transmembranskog domena koji pruža mogućnost interakcije sa kofaktorima i usmeravanja intracelularnog domena koji u jedru ima funkciju transkripcijskog medijatora (Okamoto i sar, 2001; Williams i sar, 2013). CD44 predstavlja signalnu platformu za interakciju brojnih komponenti ekstracelularnog matriksa, što indirektno utiče na nivo ekspresije različitih gena unutar ćelije odgovornih za ćelijsku adheziju, migraciju, proliferaciju, specijalizaciju i diferencijaciju kao i preživljavanje ćelije (Naor i sar, 2008). Kontrolise brojne biološke funkcije u zdravim adultnim tkivima kao što su epidermis, respiratorni epitel i nervno tkivo (Senbanjo i Chellaiah, 2017) a takođe predstavlja važnu komponentu mikrosredine matičnih ćelija tzv. „niša“. U literaturi je ovaj marker zabeležen u karcinomu dojke (Basakran, 2015), kolorektalnom karcinomu (Yamane i sar, 1999), karcinomu pankreasa (Rall i Rustgi, 1995), karcinomu prostate (Gupta i sar, 2012) i skvamocelularnom karcinomu glave i vrata (Prince i sar, 2007).

CD73

Marker CD73 poznat i kao ekto-5'-nukleotidaza je glikozil-fosfatidilinozitol enzim na površini ćelije koji je prisutan u većini tkiva (Colgan i sar, 2006). Prvobitno je definisan kao antigen za diferencijaciju limfocita a pokazano je i da predstavlja adhezivni molekul značajan za vezivanje limfocita za endotel. Nedavne studije su pokazale ulogu CD73 u brojnim fiziološkim i patološkim procesima kao što su transport tečnosti i jona, ishemija, hipoksija, zarastanje rana i dr. (Colgan i sar, 2006). Međutim, uloga CD73 u kancerogenezi nije sasvim razjašnjena. Prethodne studije su pokazale da CD73 učestvuje u međućelijskoj interakciji i u interakciji sa matriksom i dovele su CD73 u vezu sa rezistencijom na lekove i promociju tumora (Spsychala, 2000).

CD90

Glikoprotein CD90, lokalizovan u spoljašnjem delu ćelijske membrane (Low i Kincade, 1985) je detektovan u mnogim tkivima i ćelijama ljudskog organizma. Ovaj protein igra važnu ulogu u ćelijsko-ćelijskoj interakciji, ćelijskoj adheziji i prepoznavanju ćelija tokom razvoja (Saalbach i sar, 2000). Jedan je od markera matičnosti a posebno se koristi za identifikaciju mezenhimalnih matičnih ćelija (Yoshimura i sar, 2006). Prisustvo ovog proteina detektovano je i u folikulu dlake, mestu porekla BCK-a (Mercati i sar, 2009). CD90 je definisan kao marker KMĆ karcinoma želuca (Jiang i sar, 2012), pluća (Yan i sar, 2013), jednjaka (Tang i sar, 2013) i jetre (Yang i sar, 2008) gde se dovodi u vezu sa inicijacijom kancerogeneze, ćelijskom proliferacijom, većom agresivnošću tumora. Uloga ovog markera u bazocelularnom karcinomu do sada nije ispitana.

Bmi-1

Bmi-1 je član grupe „Polycomb” gena (PcG) i uključen je u proces održavanja odraslih matičnih ćelija. Igra važnu ulogu i u proliferaciji i samoobnavljanju (Vander i sar, 1994). Bmi-1 utišava ekspresiju gena indukujući modifikaciju hromatina, ometajući transkripcione faktore i vezivanje RNK polimeraze (Glinsky i sar, 2005). Prvi put je identifikovan kao onkogen u limfomu miša (Yang i sar, 2010). Brojna istraživanja ukazuju na prisustvo ovog gena u hematopoeznim i solidnim tumorima (Dukers i sar, 2004). Kod epitelnih karcinoma pokazano je da ima i prognostički značaj (Vonlanthen i sar, 2001; Breuer i sar, 2004; Kim i sar, 2004). Prema Kim-u i sar. (2016) Bmi-1 može poslužiti kao marker za razlikovanje BCK-a od SCK-a. Najnovija istraživanja su ukazala na njegovu važnu ulogu u razvoju i napredovanju BCK-a, kao i na mogućnost delovanja na Bmi-1 u terapijske svrhe (Zhu i sar, 2017).

GPR49

Protein iz porodice G proteina GPR49, od ranije je poznat kao marker adultnih matičnih ćelija (Hsu i sar, 1998) a sada se zna da je ovaj član Wnt signalnog puta odgovoran za proliferaciju, migraciju i malignu transformaciju ćelija (Tanese i sar, 2008). Pretpostavlja se da u slučaju razvoja hepatocelularnog karcinoma i sarkoma ovaj protein ima značajnu ulogu i da isto tako može poslužiti u ciljanoj terapiji ovih tumora

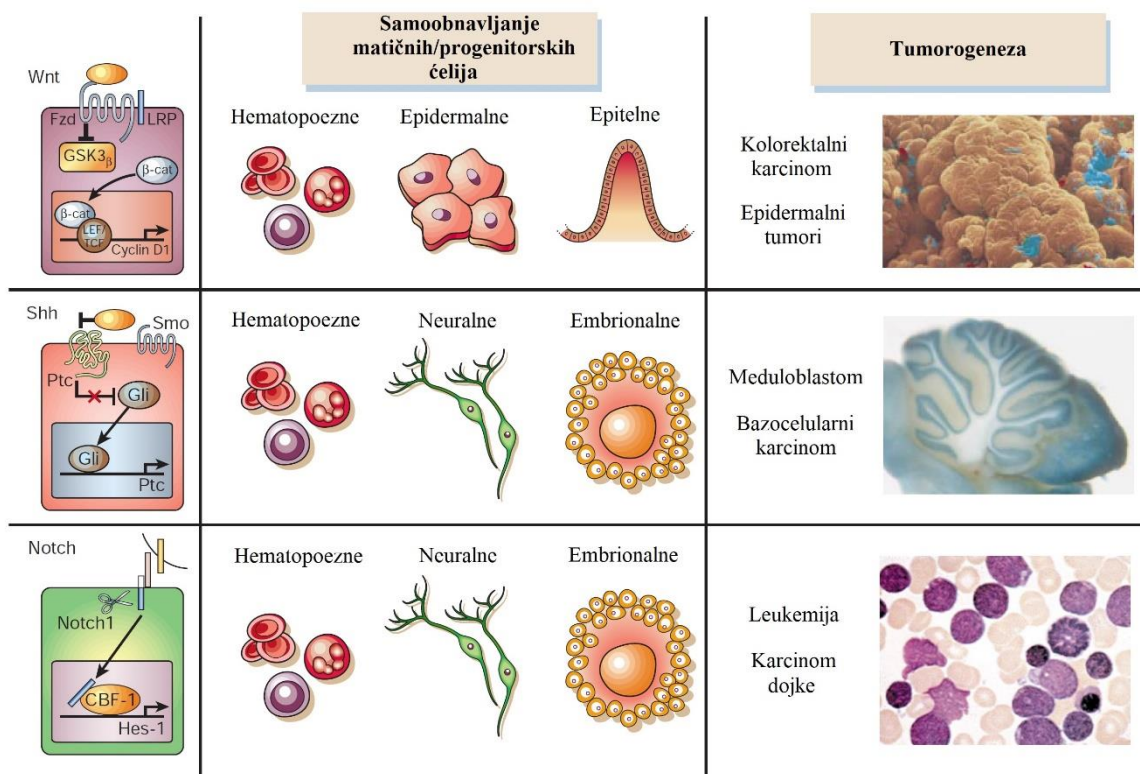
(Yamamoto i sar, 2003; Rot i sar, 2011). Pokazano je da ima ulogu i u patogenezi BCK-a (Tanese i sar, 2008).

1.3. SIGNALIZACIONE KASKADE U PATOGENEZI BCK

Ćelijska matičnost se održava kroz signalne puteve kao što su Notch, Hedgehog i Wnt signalni putevi, koji obezbeđuju samoobnavljanje normalnih matičnih ćelija, ali čiji poremećaj regulacije može dovesti do kancerogeneze (Reya 2001; Leong i sar, 2006; Taipale i Beachy, 2001).

Notch signalni put je esencijalni regulatorni put tokom embriogeneze, ali pored toga ima važnu ulogu i u održavanju homeostaze nervnog (Yoon i Gaiano, 2005), kardiovaskularnog (Niessen i Karsan, 2007) i respiratornog sistema (Xu i sar, 2012). Takođe, poznato je da u zdravim hematopoeznim MĆ ovaj put reguliše sposobnost samoobnavljanja i multipotentnosti (Varnum-Finney i sar, 2000). Novija istraživanja su pokazala da Notch signalni put ima ulogu i u regulaciji samoobnavljanja ćelija BCK-a i da se upravo njegovom aktivacijom podstiče apoptoza tumorskih ćelija što može biti od značaja u terapiji BCK-a (Shi i sar, 2017).

U ranoj fazi embriogeneze epidermisa, u procesu indukcije i morfogeneze folikula dlake, u usmeravanju i diferencijaciji matičnih ćelija folikula dlake Wnt signalni put igra presudnu ulogu (Veltri i sar, 2018). Ovaj signalni put, samostalno ili u interakciji sa drugim signalnim putevima, može delovati na epidermalne matične ćelije i aktivirati proces kancerogeneze i razvoj epitelnih karcinoma (Reya i Clevers, 2005).



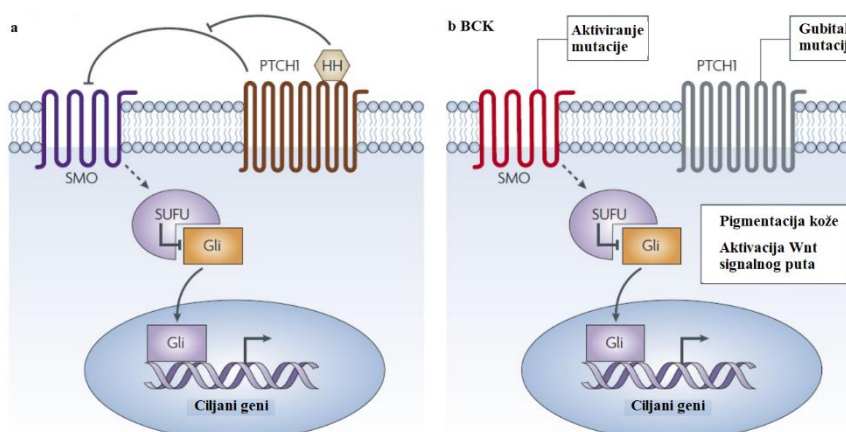
Slika 1.14. Signalni putevi koji regulišu mehanizme samoobnavljanja tokom razvoja matičnih ćelija i tokom maligne transformacije (preuzeto i modificovano: <https://www.nature.com/articles/35102167>)

Hedgehog (Hh) poznat je kao jedan od osnovnih signalnih puteva u embrionalnom razviću (Ming i sar, 1998) a takođe igra važnu ulogu i u etiopatogenezi tumora jajnika (Levanat i sar, 2004), prostate (Karhadkar i sar, 2004), pankreasa (Tian i sar, 2009) i nekih kožnih tumora (Zurawel i sar, 2000) uključujući i BCK (Hahn i sar, 1996; Johnson i sar, 1996; Athar i sar, 2006). Kod sisara su poznata tri Hh proteina - Sonic Hh (Shh), Indijski Hh (Ihh) i Pustinjski Hh (Dhh).

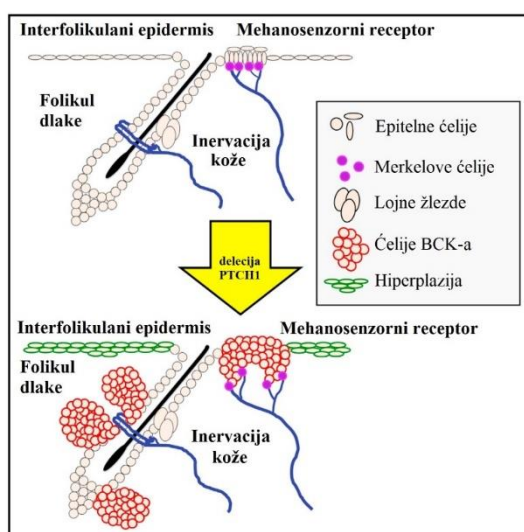
Najpoznatiji, Sonic Hedgehog (Shh) signalni put je odgovoran za brojne funkcije u procesu embriogeneze kao što su formiranje neuralne cevi, razvoj desno-leve simetrije, morfogenezu različitih organa uključujući aksijalni skelet, udove, pluća, kožu, kosu i zube (Sanchez i sar, 2005). Takođe, Shh put igra glavnu ulogu u održavanju populacije matičnih ćelija kože, regulaciji razvoja folikula dlake i lojnih žlezda. Istraživanja pokazuju da upravo Shh put, čija uloga opstaje tokom života u adultnim tkivima, ima

važnu ulogu u nastanku nekih neoplazmi (Oldakr i sar, 2001) uključujući i BCK (Botchkarev i Fessing, 2005; Peterson i sar, 2015).

Receptor za Shh je produkt tumor supresornog gena PTCH koji je smešten na hromozomu 9q22, (Hahn i sar, 1996; Johnson i sar, 1996). Najčešća genetska alteracija u sporadičnim slučajevima BCK-a je upravo gubitak heterozigotnosti na ovom hromozomu (Gailani i sar, 1992; Quinn i sar, 1994).



Slika 1.15. Sonic Hedgehog signalni put (preuzeto i modifikovano sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4457317/>)



Slika 1.16. Geneza BCK kao posledica delecije PTCH (preuzeto i modifikovano: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4387376/>)

Inaktivacijom PTCH1 dolazi do nagomilavanje Shh signala, što za posledicu ima otpočinjanje procesa kancerogeneze (Gailani i Bale, 1997; Epstein, 2008). Protein PTCH se ponaša kao negativni regulator Shh i u slučaju njegovog odsustva, PTCH suzbija aktivaciju Smo, čime blokira ekspresiju nizvodnih ciljnih gena u koje se svrstavaju GLI1, GLI2, GLI3 i članovi TGF- β (*Transforming growth factor beta*) porodice (Kalderon, 2005). Aktivacijom nižih nivoa Hh signalne kaskade dolazi do razvoja BCK-a sa benignim karakteristikama za razliku od aktivacije viših delova signalnog puta koji vode agresivnijim formama BCK-a (Grachtchouk i sar, 2003).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni ciljevi istraživanja:

- 1) Izolacija i kultivacija ćelija iz tkiva tumora i margine bazocelularnog karcinoma kože lica, vrata i poglavine.
- 2) Fenotipska karakterizacija subpopulacija tumorskih ćelija kao i identifikacija potencijalnih kancerskih matičnih ćelija, preko utvrđivanja prisustva specifičnih markera matičnosti, u kulturama tumorskih i ćelija margine.
- 3) Određivanje klonogenog, proliferativnog i migratornog potencijala u generisanim ćelijskim kulturama.
- 4) Određivanje razlike u biohemijskom sastavu između tumorskih i zdravih ćelija.
- 5) Određivanje stepena rezistentnosti/senzitivnosti ćelija u kulturi prema citostaticima.
- 6) Ispitivanje sposobnosti transdiferencijacije tumorskih ćelija.

Hipoteza istraživanja

U tumorskom tkivu BCK-a i tkivu bliske margine od 3 mm prisutne su kancerske matične ćelije odgovorne za širenje i recidiviranje BCK-a.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. PACIJENTI I BIOLOŠKI MATERIJAL

Na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu operisano je 13 pacijenata sa bazocelularnim karcinomom. Kriterijum za uključivanje u studiju je bio: lokalizacija na koži lica, vrata i poglavine, primarna lezija, veličina promene do 20 mm. Kriterijumi za isključenje iz studije su bili: ukoliko se ne radi o primarnoj promeni već o recidivu, ukoliko veličina promene prelazi 20 mm i ukoliko su prisutne multiple promena.

3.1.2. Etički standard

Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Stomatološkog fakulteta (broj odobrenja 36/30, 01.11.2016. godine). Svi eksperimenti su izvođeni u skladu sa Edinburškom revizijom Helsinške deklaracije. Svi pacijenti su detaljno obavješteni o protokolu istraživanja i dobijena je pisana saglasnost za učestvovanje u studiji (Prilog br. 2). Pacijenti su upoznati sa činjenicom da na lični zahtev mogu prekinuti učešće u studiji u bilo kom trenutku, što neće uticati na njihov dalji tretman.

3.2. METODE

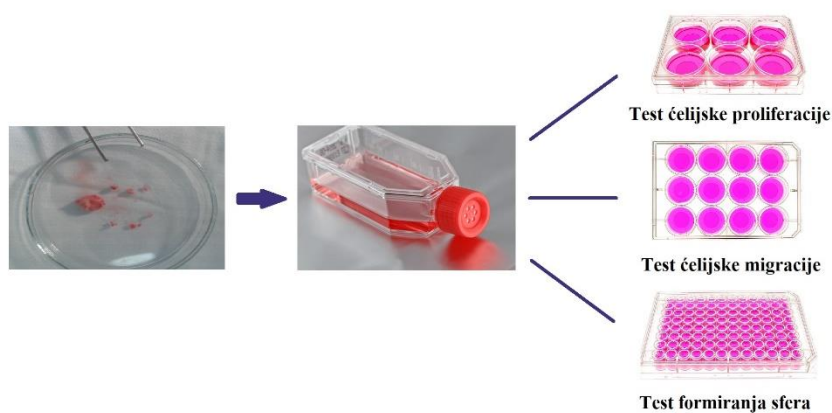
Pri uklanjanju tumora (makroskopski do u zdravo tkivo) ekscidiran je i deo graničnog tkiva, širine 3 i 5 mm. Defekt je zatvoren direktnim šavom. Deo tkiva izdvojen je za citološku i molekularno genetičku analizu dok je ostatak tkiva prosleđen na histopatološku analizu. Kao kontrolno tkivo korišćen je deo zdrave kože obuhvaćen oblikom resekcije, udaljen od makroskopske granice tumora više od 5 mm. U sterilnom transportnom medijumu uzorak tkiva transportovan je do Laboratorije za ćelijske kulture, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, gde je vršena dalja izolacija ćelija.



Slika 3.1. Hirurška ekscizija tumora. Označavanje granica tumora i margine od 3 mm mastiljavom olovkom (a). Izgled uzorka nakon hirurške ekscizije (b). Izdvajanje dela uzorka predviđenog za izolaciju ćelija (c).

3.2.1. Dobijanje primarne kulture

Uzorak tkiva ispiran je više puta PBS-om kako bi se uklonili ostaci krvi. Hirurškim skalpelom bez enzimske digestije vršeno je mehaničko usitnjavanje tkiva „eksplant metodom” (Bradbeer i sar, 1988). U plastičnim bocama za kulturu tkiva (površine 25 cm²) i osnovnom medijumu za kultivaciju ćelija (Dulbecco’s modified Eagle medium (DMEM) sa 20% fetal bovin seruma (FBS) i 100 U/mL penicillin-streptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)), usitnjeno tkivo je inkubirano na temperaturi od 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti vazduha (New Brunswick, Galaxy 170 S, Eppendorf AG, Germany).



Slika 3.2. Šematski prikaz protokola za izolaciju i karakterizaciju kancerskih matičnih ćelija bazocelularnog karcinoma

U cilju postizanja uslova koji bi omogućili dobijanje dovoljnog broja ćelija, ćelije su kultivisane do subkonfluentnog stepena (70% konfluentnosti), nakon čega su tretirane tripsinom (TrypLE™ Express Enzyme, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) u trajanju od 10 min kako bi se odlepile i potom su ponovo zasejavane u plastične boce za kulturu ćelija (površine 75 cm²). Kako ne bi došlo do kontaminacije fibroblastima kultura je tretirana 0,125% tripsinom i 0,02% rastvorom etilendiaminotetraacetatne kiseline (EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). U eksperimentima su korišćene ćelije prve i pete pasaže (P1 i P5).

3.2.2. Test proliferacije

U cilju određivanja proliferativnog kapaciteta, ćelije prve i pete pasaže su u triplikatu zasejavane u plastične ploče za kulturu ćelija sa 6 otvora u koncentraciji od 4×10^4 ćelija po otvoru i inkubirane u standardnim uslovima. Nakon trećeg, petog i sedmog dana od zasejavanja ćelija, tretirane su tripsin-EDTA-om u trajanju od 10 min kako bi se odvojile od podloge, nakon čega je vršeno brojanje ćelija pomoću Countess™ Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

3.2.3 Test formiranja kolonija

U cilju određivanja klonogenog potencijala, na plastičnu podlogu Petri šolje (32 mm) zasejano je po 200 ćelija i gajeno u standardnim uslovima uz prisustvo 1.5 ml kompletnog medijuma. Nakon 7, 10 i 14 dana kolonije su fiksirane 4% formaldehidom u trajanju od 5 minuta, isprane PBS-om i zatim tretirane 0,05% crystal violet bojom u trajanju od 30 minuta. Nakon ispiranja sa 1 ml DPBS-a kolonije su posmatrane i fotografisane na invertnom mikroskopu (BIB-100/T, BOECO, Germany). Kriterijum za definisanje kolonije bio je da grupacija ima preko 50 ćelija a za određivanje ukupnog broja kolonija korišćen je Image J program. Dobijeni rezultati korišćeni su za statističku analizu.

3.2.4. Test migracije

Migratorni potencijal ćelija određivan je testom zarastanja rana. Ćelije se zasejavaju u plastične ploče sa 24 otvora u koncentraciji od 2×10^4 po otvoru i gajene u standardnim uslovima u kompletnom medijumu. Po postizanju konfluentnosti od 80% uklanjan je sloj ćelija, sterilnom gumom širine 1 mm. Nakon toga ćelije su dva puta ispirane sa po 2 ml DPBS-a i gajene u prisustvu 2 ml kompletnog medijuma pri standardnim uslovima. Neposredno po uklanjanju sloja ćelija (nulto vreme) i nakon 24, 48 i 72 h, prostor između ćelija je fotografisan. Pomoću programa ScopeImage 9.0, mereno je smanjivanje razdaljine između razdvojenih ćelija a dobijeni rezultati služe za statističku analizu i određivanje brzine ćelijske migracije. (Eder i sar, 2015)

3.2.5. Test formiranja sfera

Sposobnost grupacije ćelija da formiraju sferičan oblik na neadherentnoj podlozi predstavlja jednu od osobina matičnosti (Weiswald i sar, 2015). U cilju onemogućavanja lepljenja ćelija za plastičnu podlogu, površina plastične ploče sa 12 bunara presvučena je slojem 1% agaroze ili je tretirana PHEMA-om (poli-hidroxietyl-metacrilat) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Zasejane ćelije tumora, margine i kontrole u koncentraciji od 1×10^4 po otvoru gajene su u DMEM/F12 medijumu sa dodatkom: B27, N2, EGF i bFGF 7 dana u standardnim uslovima. Pojava sfera i broj sfera detektuje se na invertnom mikroskopu (BIB-100/T, BOECO, Germany), dok se prečnik sfera meri pomoću programa ScopeImage 9.0. (Krishnamurthy i sar. 2012)

3.2.6. Izolacija RNK iz ćelijskih kultura

Po postizanju optimalne konfluentnosti ćelija medijum je odstranjen a ćelije su ispirane DPBS-om i tretirane sa 3 ml tripsin-EDTA-om u trajanju od 10 min u standardnim uslovima. Po isteku vremena odlepljene ćelije su više puta resuspendovane sa 5 ml medijuma i sadržaj je prebačen u plastičnu bocu zapremine 15 ml i centrifugiran 6 min na 1700 RPM. Po odstranjenju supernatanta talogu je dodavan Trizol (Invitrogen) reagens kako bi došlo do liziranja ćelija. Nakon 5 minuta ćelijski lizat je prenošen u tubicu zapremine 1,5 ml (Eppendorf, Nemačka), potom je dodavano 200 μ l hloroforma. Sadržaj

u tubicama je promućkan i centrifugiran u trajanju od 15 min na 4°C na 12000 x g. Izdvojena vodena faza sa ukupnom RNK prenetu je u novu tubicu u koju je dodavano 500 µl izopropanola, nakon čega je čitav sadržaj centrifugiran u trajanju od 10 min, na 4°C na 12000 x g. Po odstranjenju supernatanta u preostali talog dodavan je 75% etanol, sadržaj je blago vorteksovan a zatim centrifugiran 5 min, na 4°C na 7500 x g. Nakon toga, etanol je pažljivo odstranjen a tubica ostavljena otvorena u laminarnoj komori nekoliko minuta kako bi se preostali talog dobro osušio. Zatim je resuspendovan u 40 µl vode tretirane sa dietilpirokarbonatom bez prisutnih nukleaza. Ovako dobijena RNK čuvana je na -80°C.

3.2.7. Određivanje koncentracije i čistoće RNK

Koncentracija RNK izolovane iz ćelija određivana je spektrofotometrijskom metodom na BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis spektrofotometru (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA). Metoda je zasnovana na merenju apsorbanse uzorka nakon izlaganja monohromatskoj svetlosti talasnih dužina 230, 260 i 280 nm. RNK molekul apsorbuje svetlost talasne dužine 230 nm, dok međuodnosi sve tri vrednosti talasnih dužina daju informaciju o čistoći izolovane RNK. Vrednost koncentracije RNK ispitivanog uzorka je utvrđena primenom odgovarajućeg softvera.

3.2.8. Analiza genske ekspresije metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (real time PCR, qPCR)

Ukupna RNK izolovana iz ćelija pomoću TRIzol-a (Invitrogen Thermo Fisher Scientific) korišćena je za sintetisanje komplementarne cDNK procesom reverzne transkripcije, a za potrebe inkubacije korišćen je PCR aparat (Peqlab PeqSTAR 2X; Erlangen, Nemačka). Reakciona smeša u ukupnoj zapremini od 20 µL za PCR predstavljena je u Tabeli 3.1. a za qPCR u Tabeli 3.2. Korišćenjem prajmera koji su specifični za određeni region odgovarajućeg gena, amplifikacija gena je vršena qPCR metodom na Line Gene-K Fluorescence Real-time PCR Detection System (Šangaj, Kina) aparatu uz korišćenje Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Ekspresija ciljnih gena i kontrolnog „housekeeping” gena GAPDH prikazanih

u Tabeli 3.3. analizirana je pod istim uslovima. Proces umnožavanja gena obuhvata sledeće faze:

1. Faza inicijacije koja traje 2 min, na 95°C, tokom koje se aktivira polimeraza iz Master Mix-a
2. 40 ciklusa sa tri podfaze:
 - denaturacija koja traje 30 s, na 95°C
 - vezivanje prajmera koje traje 30 s, na 60°C
 - elongacija koja traje 60 s, 72°C
3. Faza finalne elongacije koja traje 10 min, na 72°C

Tabela 3.1. Reakciona smeša za PCR reakciju

Reaction Bufer	4 µl
dNTP Mix	2 µl
Oligo (dT)	1 µl
Reverzna transkriptaza (RevertAid)	1 µl
Blokator RNaza (RiboLock)	1 µl
RNA (1000 ng) + dd H ₂ O	11 µl

Tabela 3.2. Reakciona smeša za qPCR reakciju

SYBR Green	10 µl
prajmer R	1 µl
prajmer F	1 µl
ddH ₂ O	6 µl
cDNK uzorak	2 µl

U ispitivanju genske ekspresije embrionalnih (Oct4, Sox2, Nanog), mezenhimalnih (CD44, CD73, CD90) i tumorskih markera matičnosti (Bmi-1, GPR49) korišćene su ćelije pete pasaže tumora, margine i kontrole. Ekspresija ciljnih gena i housekeeping gena GAPDH, koji je korišćen kao endogeni standard, analizirana je pod istim uslovima. Sekvence prajmera koji su korišćeni u eksperimentu dati su u Tabeli 3.3.

3.2.9. Analiza genske ekspresije

Ekspresija embrionalnih i tumorskih markera matičnosti kao i ekspresija gena Sonic Hedgehog signalnog puta ispitivana je RT-PCR metodom pri čemu su u ovu svrhu korišćene ćelije obe pasaže tumora, margine i kontrolne ćelije. Kao endogeni standard korišćen je housekeeping gen GAPDH a ekspresija ciljnih gena je analizirana pod istim uslovima. Sekvence prajmera koji su korišćeni u eksperimentima dati su u Tabeli 3.3.

Tabela 3.3. Sekvence prajmera korišćenih u qPCR reakciji

Prajmer		Sekveca prajmera (5'→3')
Oct4	Forward	GTGGAGAGCAACTCCGATG
	Reverse	TGCTCCAGCTTCTCCTTCTC
Sox2	Forward	GACTTCACATGTCCCAGCACTA
	Reverse	CTCTTTTGCACCCCTCCCATT
Nanog	Forward	ATTCAGGACAGCCCTGATTCTTC
	Reverse	TTTTTGCGACACTCTTCTCTGC
CD44	Forward	AAACGAGGACCTTCATCCCAGTGA
	Reverse	ATTCCTGAGACTTGCTGGCCTCT
CD73	Forward	GAGTGGGTGGTCAGAAAATA
	Reverse	TGCACACTGTTTTTAAGGTG
CD90	Forward	TAACAGTCTTGCAGGTCTCC
	Reverse	AAGGCGGATAAGTAGAGGAC
Bmi-1	Forward	AATCCCCACCTGATGTGTGT
	Reverse	GCTGGTCTCCAGGTAACGAA
GPR49	Forward	GAGGATCTGGTGAGCCTGAGAA
	Reverse	CATAAGTGATGCTGGAGCTGGTAA

PTCH1	Forward	GGGTGGCACAGTCAAGAACAG
	Reverse	TACCCCTTGAAGTGCTCGTACA
GLI1	Forward	GAAGACCTCTCCAGCTTGGA
	Reverse	GGCTGACAGTATAGGCAGAG
GLI2	Forward	TGGCCGCTTCAGATGACAGATGTTG
	Reverse	CGTTAGCCGAATGTCAGCCGTGAAG
GAPDH	Forward	TCATGACCACAGTCCATGCCATCA
	Reverse	CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT

3.2.10. Protočna citometrija

U cilju utvrđivanja osobina matičnosti, testom direktne fluorescencije, na ćelijama karcinoma, margine i kontrole prve i pete pasaže ispitivana je pozitivna i negativna ekspresija specifičnih površinskih mezenhimalnih i hematopoetskih markera (Wilson i sar, 2013). Po postizanju konfluentnosti, iz plastične boce zapremine 75 cm³ u kojoj su gajene ćelije, odliven je medijum i ćelije su isprane sa 5 ml DPBS-a. Ćelije su zatim tretirane sa 3 ml tripsina (TrypLE™ Express Enzyme, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (prethodno zagrejan na 37°C) u trajanju od 10 min. Po isteku vremena, u bocu je dodato 10 ml medijuma, kojim je nekoliko puta vršeno pažljivo resuspendovanje kako bi se ćelije odlepile i ukupan sadržaj boce prebacio u tubu. Nakon centrifugiranja na 1 700 RPM u trajanju od 6 min supernatant je odliven a preostali sadržaj resuspendovan u 1 ml 10% FBS-a u DPBS-u. U ependorf tubu zapremine 1,5 ml prebačeno je po 1x10⁶ ćelija za kalibraciju i za svaku kombinaciju antitela. Postupak inkubacije ćelija sa specifičnih monoklonskim antitelima vršen je prema uputstvu proizvođača- sa 20 µl antitela CD34, CD45, i CD73 i 40 µl CD44 i CD90 antitela, 45 min u mraku na 4°C. Sadržaj je centrifugiran na 2 700 RPM u trajanju od 5 min pri temperature od 4°C. Supernatant je odliven a sadržaj resuspendovan sa 2 ml DPBS-a prethodno ohlađen na 4°C. Postupak je ponovljen tri puta da bi se nakon odlivanja supernatanta ćelije fiksirale sa 1 ml 2% paraformaldehida u trajanju od 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon ponovnog centrifugiranja, ispiranja hladnim DPBS-om i njegovog odstranjenja, ćelije sa

antitelima su resuspendovane u 200 μ l ohlađenog DPBS-a i čuvane na 4°C. Sledećeg dana, vršena je imunofenotipizacija dokazivanjem pozitivne ekspresije markera CD44, CD73 i CD90 i negativne ekspresije markera CD34 i CD45. Ova analiza rađena je na floucitometru (Partec, Munster, Nemačka) pomoću softvera CyFlow Space (Sysmex Partec, Nemačka) na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu.

CD34 (Molekul prisutan u populaciji primitivnih hematopoetskih ćelija, Fluorescein izotiocijanat (FITC) konjugovan, Exbio, Czech Republic)

CD45 (Uobičajen leukocitni antigen/antigen ćelija hematopoetskog porekla, Fikoeritrin (PE) konjugovan, Exbio, Czech Republic)

CD44 (Tumor-specifični agens uključen u ćelijsku proliferaciju, migraciju, diferencijaciju Alofikocijanin (APC) konjugovan, Exbio, Czech Republic)

CD73 (Površinski marker mezenhimalnih matičnih ćelija, Fikoeritrin (PE) konjugovan, Exbio, Czech Republic)

CD90 (Površinski marker mezenhimalnih matičnih ćelija, Fluorescein (FITC) konjugovan, Life Technologies, CA, USA)

3.2.11. Raman spektroskopija

Ćelije jednog uzorka tumora, margine i zdravog tkiva pete pasaže gajene su u standardnom medijumu do postizanja konfluentnosti. Nakon toga, ćelije su prebrojane i u koncentraciji od 1×10^6 ćelija/ml centrifugirane na 1700 RPM u trajanju od 6 min. Supernatant je odstranjen a ćelijski talog resuspendovan u 75 μ l destilovane vode i prebačen na mikroskopsku pločicu sa zlatnim premazom bez fiksacije. Analiza svih uzoraka vršena je pomoću Ramanskog spektrofotometra (Horiba Jobin Yvon Xplora S.A.S., Villeneuve-d'Ascq, Francuska) i mikroskopa BX51 (Olympus, Tokio, Japan) na talasnim dužinama između 400 i 2600 cm^{-1} . Kao izvor monohromatskog svetla korišćen je diodni laser talasne dužine 785 nm, jačine 90 mW, veličine fokusa od 2 μ m sa vremenom ekspozicije od 100 s. Ramanski spektar je beležen CCD kamerom (Syncerity, Horiba Scientific, Edison, New Jersey, SAD) koja je bila podešena na 213 K. Svaki od uzoraka je eksponiran laserom u 30 nasumično odabranih tačaka. Analiza spektara

(srednja vrednost za svaki od uzoraka) rađena je softverom LabSpec 6 (Horiba Jobin Yvon S.A.S., Villeneuve-d'Ascq, Francuska).

3.2.12. Diferencijacija ćelija

3.2.12.1. Osteogena diferencijacija

Ćelije pete pasaže zasejane su u triplikatu u plastične ploče sa 24 otvora u koncentraciji od 8×10^4 ćelija i gajene u potpunom medijumu do postizanja 100% konfluentnosti. Ćelije su zatim izložene tretmanu osteogene indukcije u trajanju od 21 dan u standardnim uslovima uz prisustvo medijuma za osteogenu diferencijaciju (Life Technologies, USA). Medijum je menjan na svaka 3 dana. Efikasnost osifikacije diferencovanih kancerskih ćelija analizirana je detektovanjem koštanih nodula na površini indukovanih osteoblasta Alizarin Red bojenjem (Lin, 2002). Takođe, izolovana je RNK koja je korišćena za analizu genske ekspresije gena datih u Tabeli 3.4.

3.2.12.2. Hondrogena diferencijacija

Tumorske ćelije zasejane su u triplikatu u plastične ploče sa 24 otvora u koncentraciji od 8×10^4 ćelija i do postizanja 100% konfluentnosti gajene u potpunom medijumu. Tretmanu osteogene indukcije u trajanju od 21 dan ćelije su izložene delovanjem medijuma za hondrogenu diferencijaciju (Life Technologies, USA). Medijum je menjan na svaka 3 dana. Hondrogena diferencijacija je detektovana bojenjem sa 0.1% rastvorom Safranin O nakon fiksiranja u 4% formaldehidu (Engle, 2008). Takođe, izolovana je RNK koja je korišćena za analizu genske ekspresije COL1 I COL2A2 gena čije su sekvence date u Tabeli 3.4.

3.2.12.3. Adipogena diferencijacija

U plastične ploče sa 24 otvora u koncentraciji od 1×10^5 tumorske ćelije pete pasaže gajene su do postizanja 60-80% konfluentnosti. Tretmanu adipogene indukcije posredstvom adipogenog medijuma za diferencijaciju (Life Technologies, USA) ćelije su bile izložene 21 dan. Utvrđivanje prisustva intracelularnih lipidnih vakuola vršeno je bojenjem Oil Red O bojom (Hausman i sar, 1981) i analizom ekspresije *PPAR- γ* (*peroksizom proliferator-aktivirajući receptor gamma*) gena nakon izolacije RNK.

3.2.12.4. Neurogena diferencijacija

Tumorske ćelije pete pasaže u koncentraciji od 2×10^4 ćelija po bunariću zasejane su u plastične ploče sa 6 bunarića. Tokom 24 h ćelije su inkubirane u kompletnom medijumu pri standardnim uslovima, nakon čega je zamenjen preindukcionim medijumom koji sadrži DMEM i 100 mM betamerkaproetanol. Nakon 4 h inkubacije, po odstranjenju medijuma ćelija su usmerene ka neurodiferencijaciji dodavanjem neurogenog medijuma – DMEM sa dodacima 100 U/mL streptomycin/penicillin-a, 20 ng/ml humanog epidermalnog faktora rasta, (EGF, Thermo Fisher Scientific, USA), 20 ng/ml bazičnog fibroblastnog faktora rasta (bFGF Thermo Fisher Scientific, USA), 20 ng/ml neurogenog faktora rasta (NGF, Thermo Fisher Scientific, USA) sa 2% B27 (Thermo Fisher Scientific, USA). Zamena medijuma vršena je na 3 dana a nakon 7 dana posmatrane su morfološke promene na ćelijama na invertnom mikroskopu (BIB-100/T, BOECO, Germany) i izolovana je RNK. Za potvrdu neurogene diferencijacije analizirana je ekspresija gena Nestin i MAP2 q-PCR metodom.

Kao kontrola za sve vrste tretmana korišćene su tumorske ćelije gajene u kompletnom medijumu (DMEM, 10% FBS i AB/AM), pod istim uslovima bez dodavanja agenasa za diferencijaciju.

Tabela 3.4. Sekvence prajmera osteogene, hondrogene, adipogene i neurogene diferencijacije

Prajmer		Sekvenca prajmera (5'→3')
ALP	Forward	CCACGTCTTCACATTTGGTG
	Reverse	ATGGCAGTGAAGGGCTTCTT
BSP	Forward	AAAGTGAGAACGGGGAACCT
	Reverse	ACCATCATAGCCATCGTAGCC
RUNX2	Forward	ACAAACAACCACAGAACCACAAGT
	Reverse	GTCTCGGTGGCTGGTAGTGA

BMP2	Forward	CACTGTGCGCAGCTTCC
	Reverse	CCTCCGTGGGGATAGAACTT
BMP4	Forward	CTGGATGAGTATGATAAGGTGGTA
	Reverse	GGGTGAGTGGATGGGAAC
BMP6	Forward	CCTTCATGGTGGCTTTC
	Reverse	TCCTGGGACTGGGTAGA
COL1	Forward	AGCAGGTTCACCTTACACTGTT
	Reverse	GATGTCCAAAGGTGCAATATCA
COL2A2	Forward	TTCAGCTATGGAGATGACAATC
	Reverse	AGAGTCCTAGAGTGACTGAG
PPAR-γ	Forward	GCTGTGCAGGAGATCACAGA
	Reverse	GGCTCCATAAAGTCACCAA
Nestin	Forward	AACAGCGACGGAGGTCTCTA
	Reverse	TTCTCTTGTCCCGCAGACTT
MAP2	Forward	AACCCTTTGAGAACACGACA
	Reverse	TCTTTCCGTTCATCTGCCA
GAPDH	Forward	TCATGACCACAGTCCATGCCATCA
	Reverse	CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT

3.2.13. MTT i „Neutral red” test

Kolorimetrijskim *in vitro* testovima za procenu stepena vijabilnosti ćelija - MTT i Neutral Red testom određuje se stepen rezistentnosti/senzitivnosti ćelija na delovanje različitih supstanci uključujući i citostatika. U mitohondrijama metabolički aktivnih ćelija tetrazolijumska so žute boje – MTT (3-(4,5-imetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) u prisustvu enzima sukcinat dehidrogenaze, procesom redukcije prevodi se u kristale formazana koji je ljubičaste boje. Dodavanjem dimetil sulfoksida (DMSO) dolazi do rastvaranja kristala formazana što se može spektrofotometrijski kvantifikovati (Ohno i Abe, 1991).

Neutral Red test je jedan od najčešće korišćenih testova za procenu citotoksičnosti lekova i merenja stepena preživljavanja ćelija. Princip se zasniva na ulasku crvene boje eurhodina, putem aktivnog transporta, u lizosome živih ćelija. U kiseloj sredini iz lizozoma se oslobađa crvena boja što se kvantifikuje spektrofotometrijskom metodom na Elisa čitaču (Borenfreund, 1985).

Ćelije pete pasaže zasejane su na plastičnu ploču sa 96 otvora u koncentraciji od 1×10^4 ćelija po bunariću i gajene u kompletnom medijumu pri standardnim uslovima. Nakon 24 h medijum je odstranjen i ćelije su tretirane sa 100 μ l rastvora cisplatina (Cis) (Pfizer, New York, USA) u koncentraciji od 80, 50 i 10 μ g/ml i istom količinom 5-fluorouracil (5-FU) (Medac, Germany) u koncentraciji od 10, 5 i 1 μ g/ml tokom 24, 48 h i 7 dana. Po završetku tretmana medijum je odstranjen i u polovinu bunarića dodato je po 100 μ l MTT rastvora u finalnoj koncentraciji od 0,5 mg/ml, dok je u drugoj polovini ploče medijum zamenjen Neutral Red rastvorom. U rastvoru MTT-a ćelije su inkubirane 4 h na 37°C nakon čega su tamni kristali formazana rastvoreni sa 100 μ l dimetilsulfoksida (DMSO). Nakon 15 minuta laganog mešanja apsorbancija je očitana na 570 nm talasne dužine na Elisa čitaču (Microplate reader, RT-2100C, China) (Chieh, 2014). Ćelijama inkubiranim u Neutral Red rastvoru, nakon 2 h inkubacije supernatant je zamenjen sa 150 μ l kiselog alkohola (50% Etanol + 1% HCL) i nakon 15 min na 540 nm talasne dužine vrednosti su očitane na Elisa čitaču (Microplate reader, RT-2100 C, China) (Chieh, 2014).

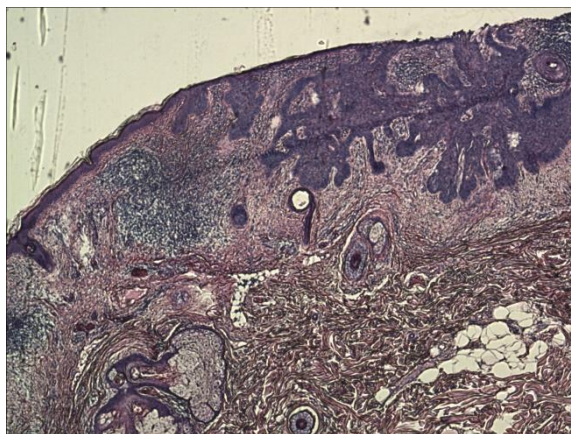
3.3. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Sve statističke analize su vršene pomoću statističkog programa SPSS (SPSS v20.0, IBM, Čikago, IL, SAD). Provera normalnosti raspodele ispitivanih podataka vršena je pomoću Kolmogorov-Smirnov testa. Izračunavanje verovatnoće značajnih razlika između uzoraka vršeno je pomoću T-testa za nezavisne uzorke, Mann-Whitney testa i χ^2 -testa (Chi-square test), gde je to bilo odgovarajuće. Korelacija između veličine i broja sfera i ekspresije CD44 markera utvrđivana je pomoću Spirmanovog testa korelacije. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ili srednja vrednost \pm standardna greška srednje vrednosti (standard error of mean, SEM). Statistički značajnom smatrana je p vrednost manja od 0,05.

4. REZULTATI

4.1. KARAKTERISTIKE PACIJENATA SA DIJAGNOSTIFIKOVANIM BCK-om

Histopatološkom analizom bazocelularni karcinom je potvrđen kod svih pacijenata.



Slika 4.1. Reprezentativni histopatološki preparat

4.1.1. Distribucija pacijenata prema godinama starosti

Ukupno je operisano 13 pacijenata, od čega je troje isključeno iz studije zbog neuspešnog generisanja ćelijskih kultura. Među preostalim 10 pacijenata bilo je 6 muškaraca i 4 žene starosti između 56 i 90 godina (prosečne starosti 73 ± 17 godina).

4.1.2. Lokalizacija tumora

Sve promena bile su lokalizovane na koži lica i to: 4 u predelu slepoočne regije, 2 na vrha nosa, 1 u predelu nosnog krilca i 3 u zaušnoj regiji.

4.1.3. Veličina tumora

Veličina svih uklonjenih tumorskih promena je iznosila $18 \pm 1,2$ mm. Prosečno vreme proteklo od uočavanja prvih promena do hirurške terapije iznosi $3,5 \pm 2$ godine. Kao najčešće tegobe pacijenti su naveli svrab i krvarenje.

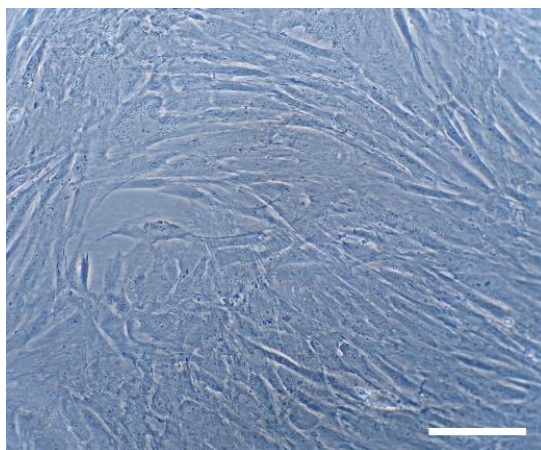
4.1.4. Faktori rizika

Tokom ranog detinjstva najveći broj pacijenata (70%) navodi da je imao opekotine na koži kao posledicu prekomernog izlaganja suncu. Polovina se bavi ili se bavila poslom koji zahteva boravak na suncu više sati dnevno. Kremu sa zaštitnim faktorom od UV zračenja svakodnevno koristi samo dva pacijenta. 7 od 13 pacijenata navodi da je pušač ili bivši pušač sa stažom preko 20 godina a alkohol povremeno konzumira 6 od 13 pacijenata.

4.4. ANALIZA EKSPERIMENTALNIH REZULTATA

4.4.1. Generisanje primarnih kultura

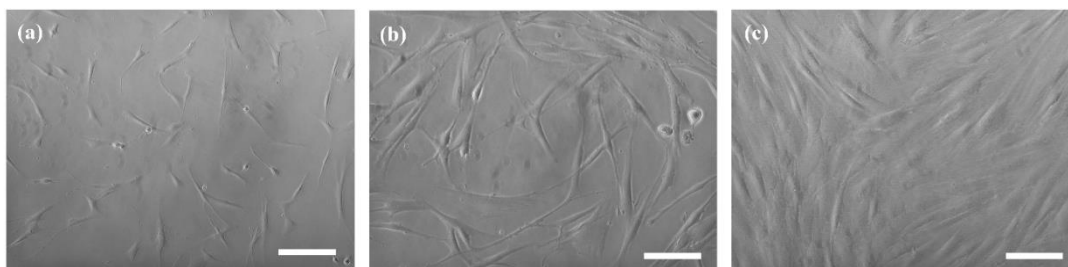
Uspešno je generisano 10 primarnih kultura ćelija tumora, margine i kontrole. U tri slučaja ćelijske kulture se nisu razvile ili se nisu razvile u sva tri uzorka što je bio razlog isključenja iz studije. Ćelijske kulture tumora kultivisane su u 6–10 pasaža nakon čega je proliferativni kapacitet ćelija u većini uzoraka opao. Izuzetak je jedna ćelijska kultura koja je pasažirana više od 20 puta. Takođe, ustanovljene su i kulture ćelija margine i kontrole (zdrave kože).



Slika 4.2. Morfologija izolovanih tumorskih ćelija BCK-a. Reprezentativna slika (razmera 20 μm).

4.4.2. Test proliferacije

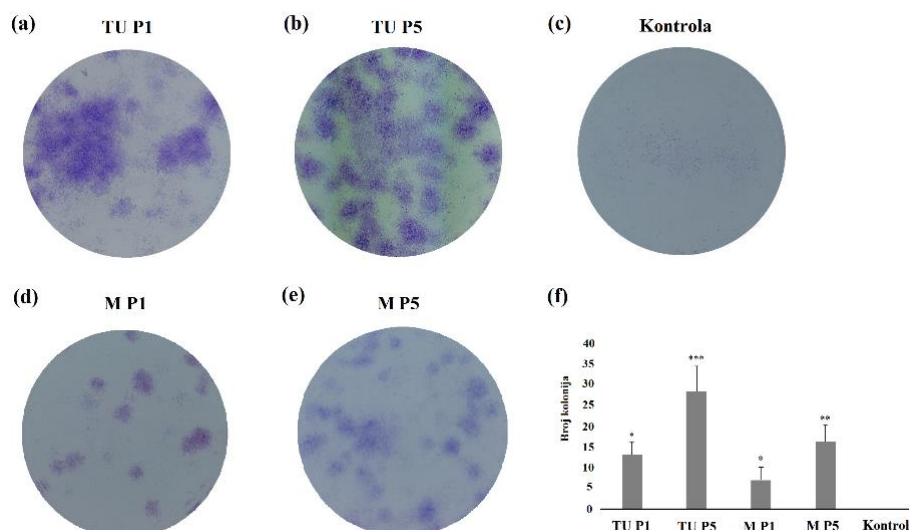
Ukupan broj živih ćelija tumora, margine i kontrole prve i pete pasaže, određen je nakon 3, 5 i 7 dana od zasejavanja. Od trenutka zasejavanja broj ćelija raste tokom vremena u svim uzorcima. Tumorske ćelije su pokazale veći proliferativni kapacitet u odnosu na ćelije margine i kontrole u obe pasaže ($p < 0,05$). Tumorske ćelije pete pasaže pokazale su veći proliferativni kapacitet u poređenju sa ćelijama prve pasaže dok kod kontrolnih ćelija to nije bio slučaj ($p > 0,05$). Proliferativni kapacitet ćelija margine veći je u petoj pasaži u odnosu na prvu, ali bez statistički značajne razlike.



Slika 4.3. Proliferacija tumorskih ćelija. Treći dan od zasejavanja (a), peti dan (b), sedmi dan (c). Prikazane su reprezentativne slike. Vrednost razmera je 20 μm .

4.4.3. Test formiranja kolonija

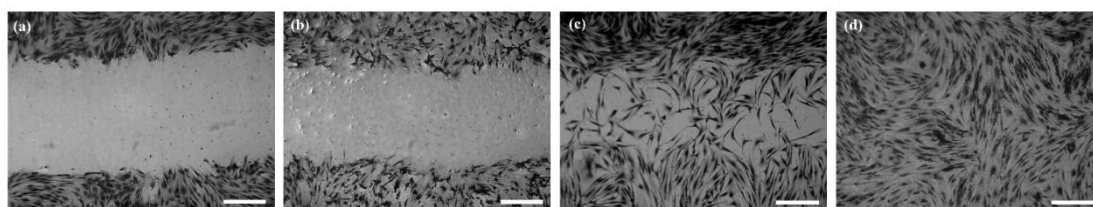
Klonogeni potencijal ćelija tumora, margine i kontrole određen je testom formiranja kolonija pri čemu je kriterijum za definisanje kolonije- prisustvo barem 50 ćelija. Ćelije tumora i margine pokazale su sposobnost formiranja kolonija za razliku od kontrolnih ćelija. Klonogeni potencijal je sa vremenom rastao, pa je u obe ćelijske kulture dobijen veći broj kolonija nakon pete pasaže u odnosu na prvu pasažu ($p < 0,05$). Veći klonogeni potencijal pokazale su tumorske ćelije u odnosu na ćelije margine u obe pasaže ($p < 0,05$) (Slika 4.4).



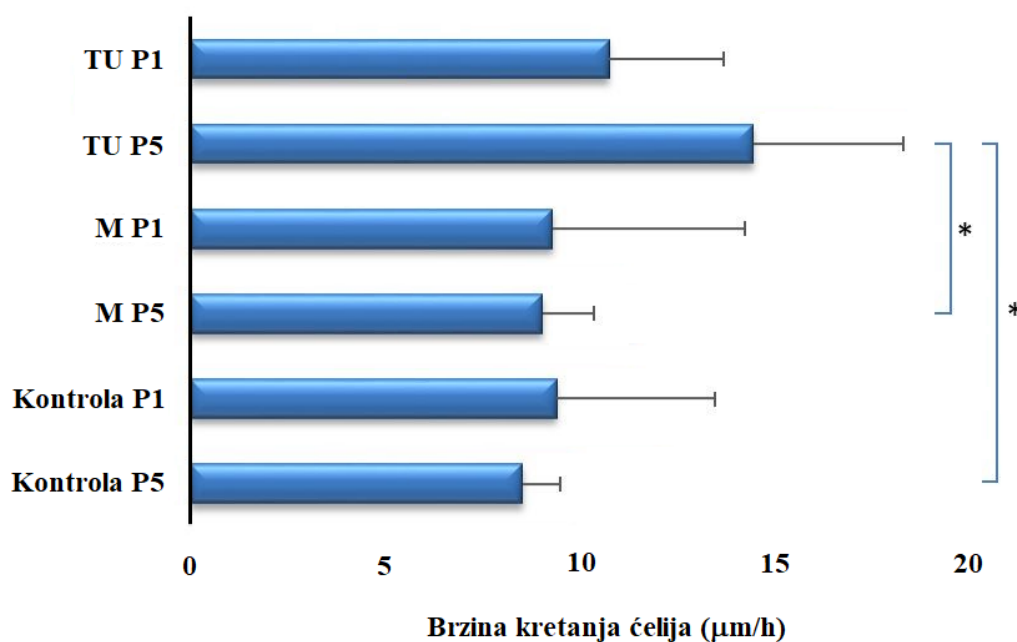
Slika 4.4. Klonogeni potencijal ćelija. Ćelije tumora (a, b) i margine (c, d) formirale su kolonije 14 dana nakon zasejavanja za razliku od kontrole (f). Broj formiranih kolonija raste tokom pasaža u obe ćelijske kulture pri čemu tumorske ćelije pokazuju veći klonogeni potencijal.

4.4.4. Test migracije

Nakon linijskog brisanja sloja ćelija na konfluentnoj površini, udaljenost između ćelija je fotografisana i merena na svaka 24 h (Slika 4.5). Nakon 72 h prostor između ćelija je popunjen u svim uzorcima pri čemu je prosečna brzina kretanja tumorskih ćelija pete pasaže bila značajno veća u odnosu na brzinu ćelija margine i kontrole ($p < 0,05$). U prvoj pasaži nije bilo značajne razlike u brzini kretanja između različitih tipova ćelija (Grafikon 4.1).



Slika 4.5. Migratorni potencijal KMC BCK. Prostor između tumorskih ćelija neposredno nakon linijskog brisanja (a), nakon 24 h (b), nakon 48 h (c) i potpuno spajanje ćelija nakon 72 h (d). Prikazane su reprezentativne slike. Vrednost razmera je 100 μm .



Grafikon 4.1. Prikaz prosečne brzine kretanja ćelija tumora, margine i kontrole. Tumorske ćelije pete pasaže (TU P5) pokazale su veći migratorni potencijal u odnosu na ćelije margine (M P5) i kontrole iste pasaže. Nije bilo statistički značajne razlike u brzini kretanja ćelija između pasaža. Zvezdica * predstavlja p -vrednost manju od 0,05.

4.4.5. Test formiranja sfera

Nakon 7 dana od zasejavanja ćelija na neadherentnu podlogu, ćelije tumora (Slika 4.6.a) i margine (Slika 4.6.b) pokazale su sposobnost formiranja sfera za razliku od ćelija kontrole. Ćelije tumora i margine pete pasaže formiraju veći broj sfera u odnosu na prvu pasažu ali bez statistički značajne razlike. Istovremeno, dijametar sfera tokom pasaža opada kod oba tipa ćelija ($p < 0,05$) (Tabela 4.1). Postoji snažna pozitivna korelacija između ekspresije CD44 i broja sfera ($r = 0,81$, $p = 0,004$) i negativna korelacija CD44 sa dijametrom sfera ($r = -0,87$, $p = 0,01$).

Tabela 4.1. Broj i dijametar sfera tumora i margine

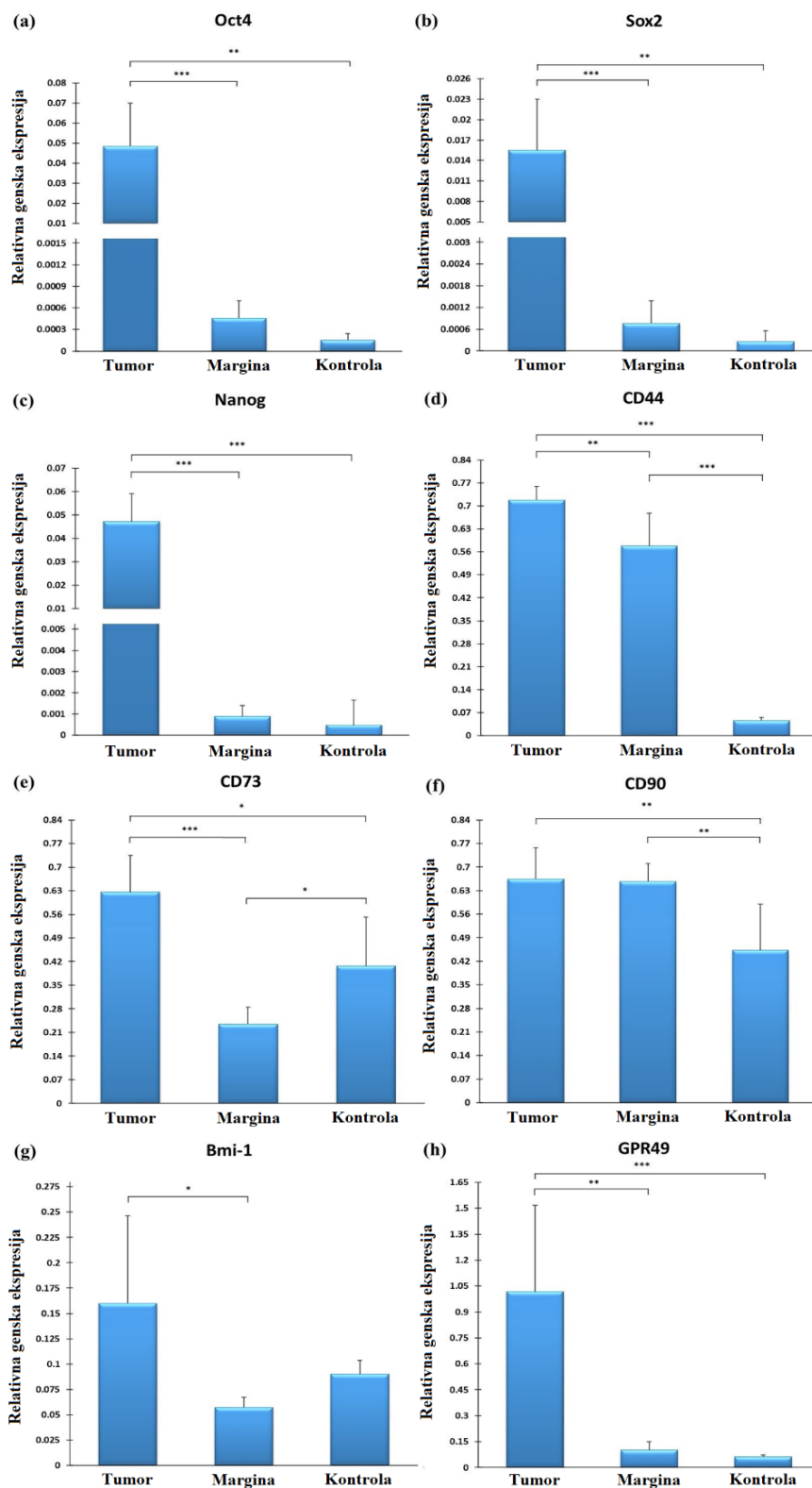
	TU P1	TU P5	M P1	M P5
Broj sfera	3,7 ± 1,9	7,1 ± 2,8	4,3 ± 1,6	6,9 ± 2,6
Dijametar sfera	145 ± 17 μm	126 ± 11 μm	155 ± 13 μm	135 ± 14 μm



Slika 4.6. Izgled formiranih sfera. Čelije tumora (a) i margine (b) formirale su sfere na neadherentnoj podlozi 7 dana nakon zasejavanja. Tumorska sfera, uveličanje 200x (c).

4.4.6. Ekspresija embrionalnih i tumorskih markera matičnosti (real-time PCR metoda)

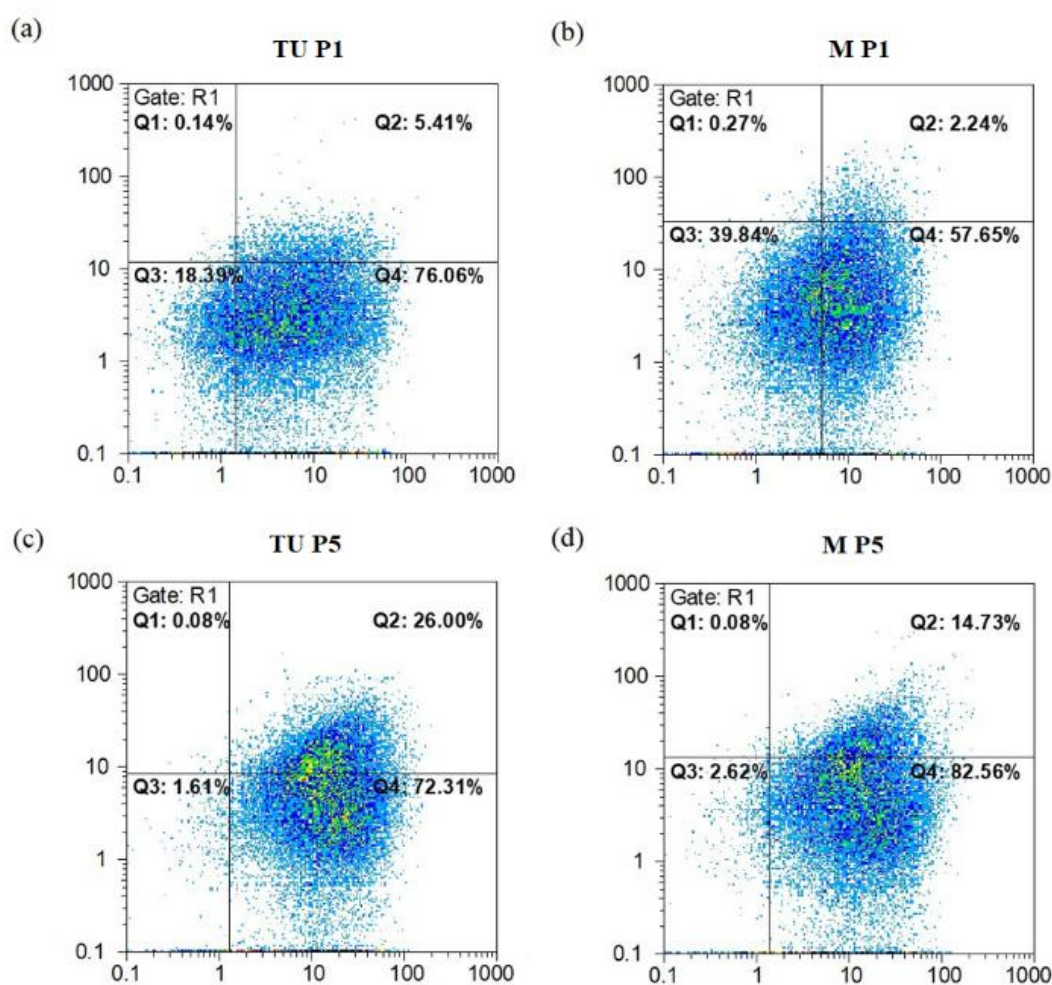
Ekspresija embrionalnih markera – Oct4, Sox2 i Nanog, značajno je veća u tumorskoj ćelijskoj kulturi u odnosu na kulturu margine i kontrole ($p < 0,01$) (Grafikon 4.2.a, b, c). Ekspresija mezenhimalnih markera CD44 i CD73 je takođe veća u tumoru u odnosu na marginu i kontrolu ($p < 0,05$) (Grafikon 4.2.d, e). U ćelijama tumora i margine ekspresija CD90 je približno ista ali u odnosu na kontrolu statistički značajno veća ($p < 0,01$) (Grafikon 4.2.f). Takođe, ekspresija Bmi-1 je veća u tumoru u odnosu na marginu ($p < 0,05$) (Grafikon 4.2.g). Značajno veća ekspresija GPR49 zapažena je u tumoru u odnosu na marginu ($p < 0,01$) i kontrolu ($p < 0,001$) (Grafikon 4.2.h).



Grafikon 4.2. Nivo ekspresije embrionalnih, mezenhimalnih i tumorskih markera. Statistička značajnost razlike u ekspresiji markera u tumorskim ćelijama u odnosu ćelije margine i kontrole predstavljena zvezdicom *, **, *** određuje p -vrednost manju od 0,05, 0,01 i 0,001 respektivno.

4.4.7 Ekspresija mezenhimalnih markera matičnosti (protočna citometrija)

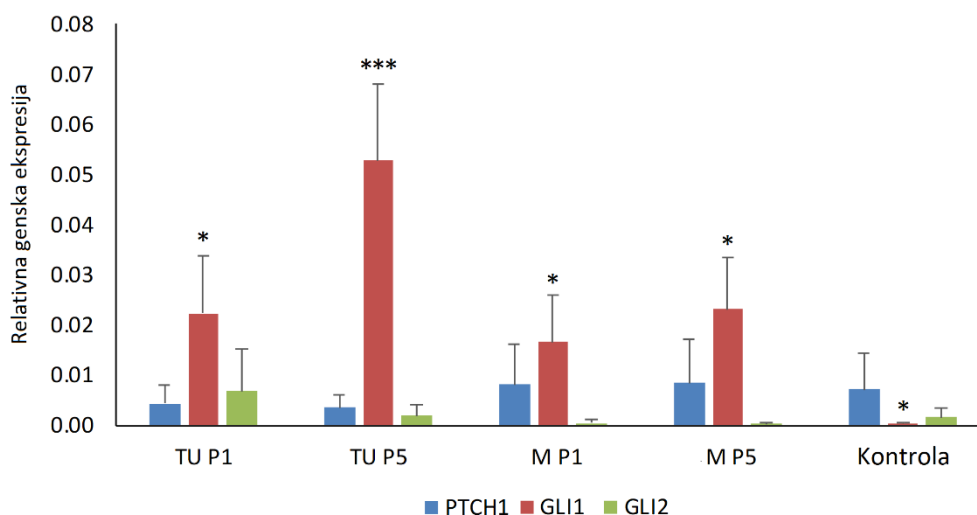
Analiza protočnom citometrijom je pokazala statistički značajno veću ekspresiju CD44 markera u tumorskim ćelijama u poređenju sa ćelijama margine ($p < 0,05$), za razliku od ekspresije markera CD90 gde nije bilo značajne razlike u ekspresiji između pomenutih uzoraka (Slika 4.7).



Slika 4.7. Ekspresija mezenhimalnih markera u ćelijama tumora i margine određena protočnom citometrijom. Predstavljene su reprezentativni histogrami ekspresije molekula CD44 (gore desno) i CD90 (dole desno) u tumorskim ćelijama i ćelijama margine prve pasaže (**a, b**) u odnosu na petu pasažu ćelija tumora i margine (**c, d**). Reprezentativni histogram.

4.4.8. Sonic Hedgehog signalni put

Poremećaj Sonic Hedgehog signalnog puta u ispitivanim uzorcima je prikazan na Grafikonu 4.3. Ekspresija PTCH1 je niža u ćelijama izolovanim iz tumora u odnosu na ćelije margine i kontrole ali bez statističke značajnosti. Nivo GLI1 je značajno povišen u tumorskim ćelijama u odnosu na ćelije margine i kontrole ($p < 0,05$). Takođe postoji statistički značajna razlika u nivou ekspresije GLI1 gena i između ćelija margine i kontrole ($p < 0,05$). U tumoru se zapaža povećanje nivoa ekspresije GLI1 tokom pasaža ($p < 0,05$) dok nivo GLI2 opada bez statističke značajnosti.



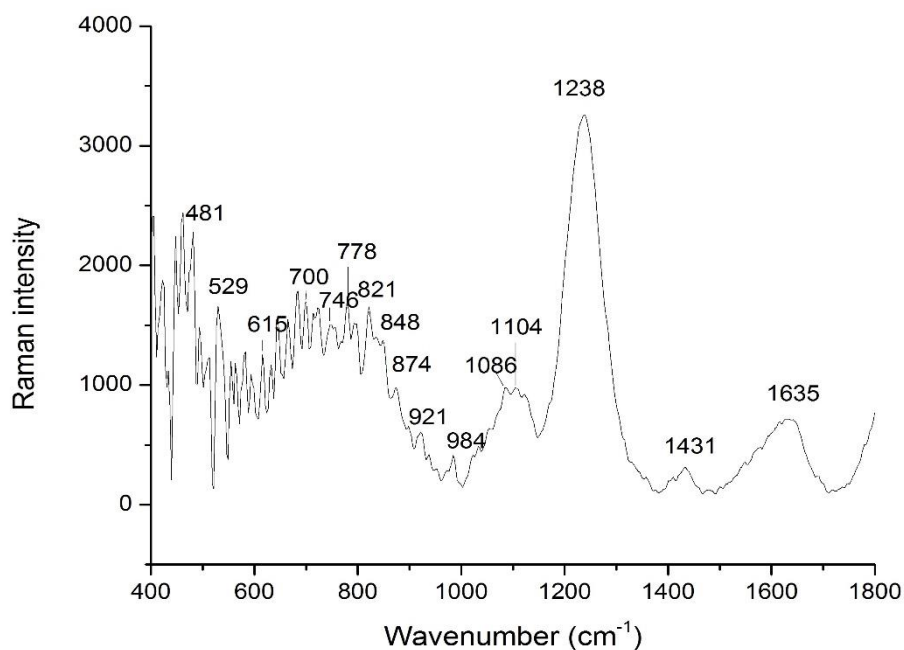
Grafikon 4.3. Ekspresija gena Sonic Hedgehog signalnog puta. Nivo PTCH1 gena je neznatno niže eksprimiran u tumoru (TU) u odnosu na ćelije margine (M) i kontrole. U tumorskim ćelijama, posebno pete pasaže (TU P5) zapaža se značajno viši nivo ekspresije GLI1 gena u odnosu na ćelije margine i kontrole. Tokom pasaža u tumoru nivo ekspresije GLI1 raste dok nivo GLI2 neznatno opada. Statistička značajnost razlike u ekspresiji ciljnih gena signalnog puta predstavljena je zvezdicom *, **, *** i određuje p-vrednost manju od 0,05, 0,01 i 0,001 respektivno.

4.4.9. Raman spektroskopija

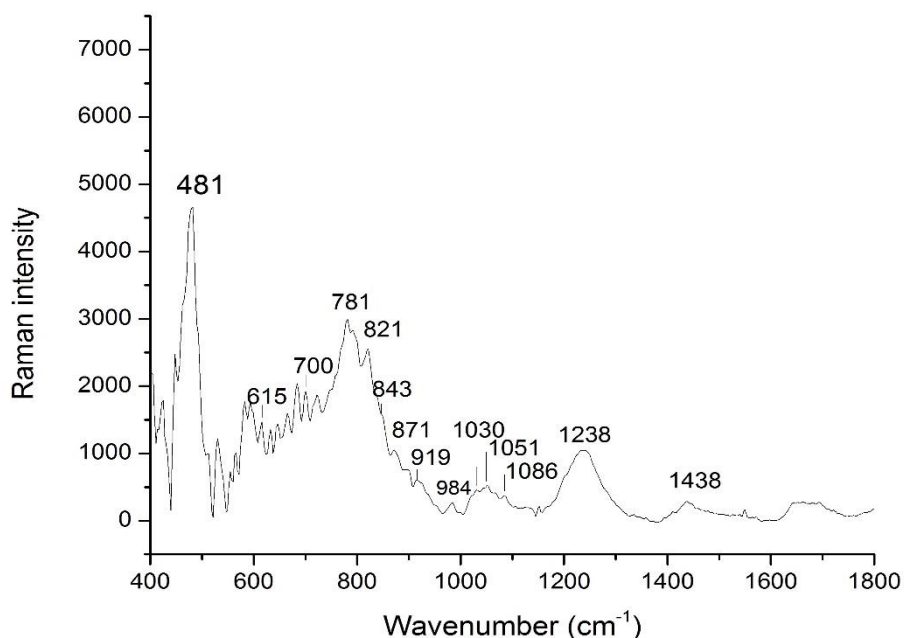
Kao dopunska metoda u karakterizaciji ćelija korišćena je Ramanska spektroskopija kao metoda za razlikovanje biohemijskog sastava tumorskih i zdravih ćelija. Analizom pikova zapaža se da se molekularna struktura tumorskih ćelija umnogome razlikuje od

zdravih ćelija (Slika 4.8). Analizom ramanskog spektra uočava se da u je tumorskim ćelijama prisutan viši nivo kolagena tipa I, aminokiselina prolin, hidroksiprolin i valin ($921-984\text{ cm}^{-1}$) kao i nivo amida III (pik 1238 cm^{-1}). Intenzitet pika 1635 ukazuje na povećanu količinu proteina i lipida kod tumorskih ćelija.

BCC



KONTROLA

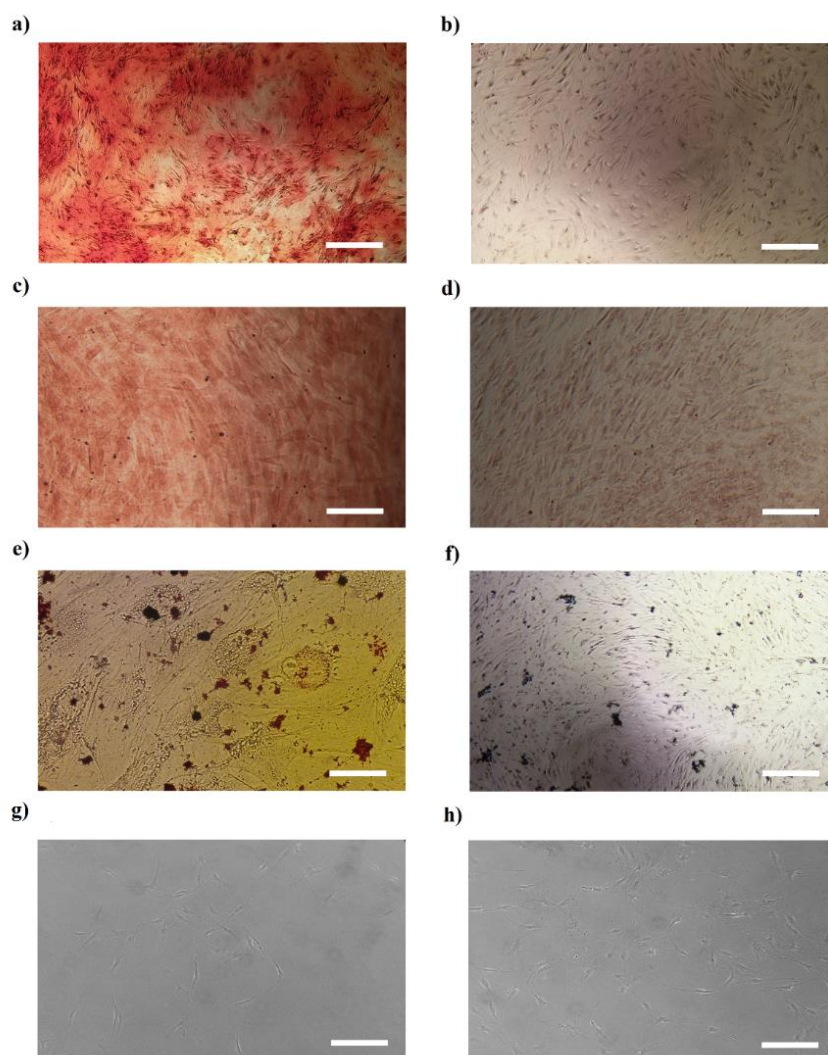


Slika 4.8. Ramanski spektar ćelija bazocelularnog karcinoma i zdrave kože

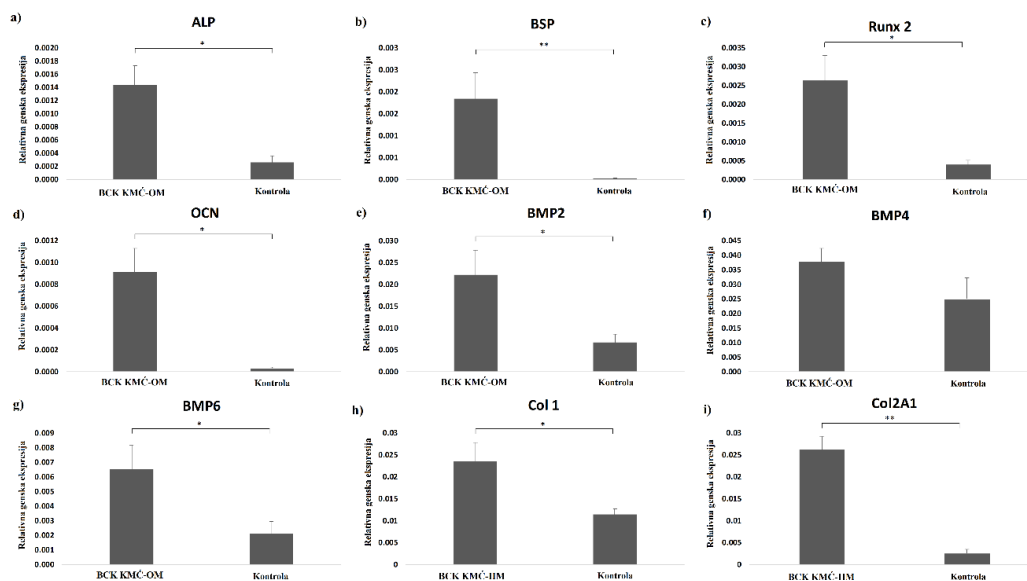
4.4.10. Transdiferencijacija ćelija

Tumorske ćelije pete pasaže indukovane odgovarajućim medijumom za ćelijsku diferencijaciju usmerene su ka osteogenezi, hondrogenezi, adipogenezi i neurogenezi. Formiranje osteocita detektovano je bojenjem ekstracelularnih depoa kalcijuma Alizarin Red bojenjem (Slika 4.9.a). Hondrogena diferencijacija, odnosno formiranje hrskavice detektovano je Safranin O bojenjem (Slika 4.9.c). Unutarćelijski lipidni depoi nisu uočeni 21 dan nakon indukovanja adipogene diferencijacije i bojenja Oil Red O bojom (Slika 4.9.e). Takođe, 7 dana od indukovanja neurodiferencijacije nije došlo do morfoloških promena na tumorskim ćelijama koje bi upućivale da su te ćelije krenule putem neurodiferencijacije (Slika 4.9.g).

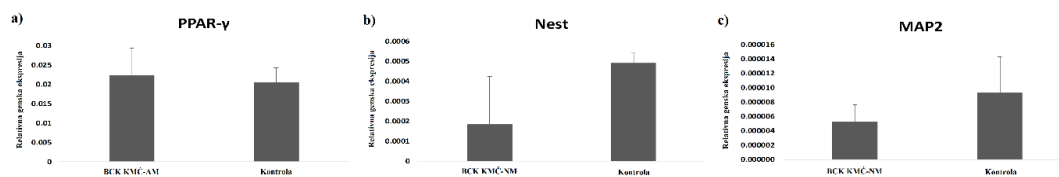
Genska ekspresija specifičnih gena diferencijacije analizirana je real-time PCR metodom. Analizirana je ekspresija gena specifičnih za osteodiferencijaciju: ALP, BSP, Runx2, OCN, BMP2, BMP4 i BMP6, COL1 i COL2A1 za hondrodiferencijaciju, PPAR- γ za adipodiferencijaciju kao i Nestin i MAP2 gena za neurodiferencijaciju. Ekspresija gena vezanih za osteogenezu je statistički značajno viša u indukovanim ćelijama u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$) (Grafikon 4.4.a, b, c, d, e i g). Izuzetak među genima osteodiferencijacije je BMP4 čija je ekspresija takođe izraženija u tumoru u odnosu na kontrolu ali bez statističke značajnosti (Grafikon 4.4.f). Nivo iRNK COL1 i COL2A1 je takođe pokazao veću vrednost u indukovanim ćelijama (Grafikon 4.4. h i i). Ekspresija PPAR- γ gena u kulturi tretiranih ćelija adipogenim medijumom je približno ista kao i u kulturi netretiranih ćelija (Grafikon 4.5.a). Kod ćelija usmerenih ka neurodiferencijaciji nema statistički značajne razlike između tretiranih i netretiranih ćelija u ekspresiji gena Nestin i MAP2 (Grafikon 4.5.b i c). Nakon uspešne osteogene i hondrogene diferencijacije, izvršena je provera da li je diferencijacija praćena opadanjem nivoa kancerske matičnosti. U tu svrhu su odabrane ćelije hondrogene diferencijacije. I zaista, konstatovano je da je ekspresija markera CD44 i CD73 u indukovanim ćelijama opala ($p < 0,05$) (Grafikon 4.6.a). Slična provera je urađena i u slučaju neuspešne diferencijacije, gde je konstatovano da je nivo markera kancerske matičnosti ostao nepromenjen, odnosno nije bilo razlike u ekspresiji markera između indukovanih i neindukovanih ćelija (Grafikon 4.6.a i b).



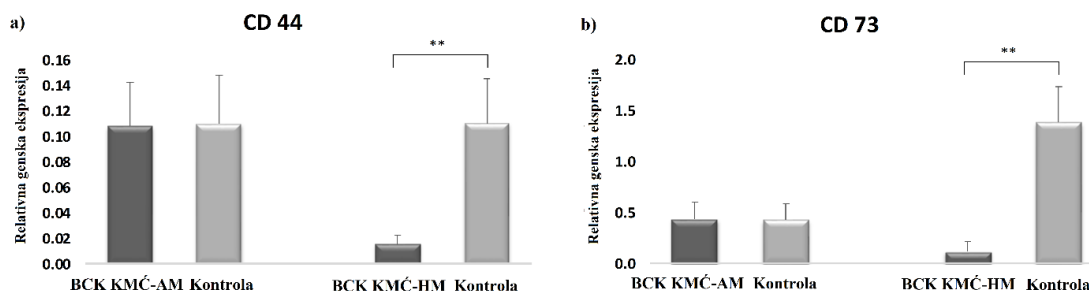
Slika 4.9. Potencijal diferencijacije KMC BCK. Tumorske ćelije 21 dan nakon osteogene indukcije i bojenja sa Alizarin Red bojom (a), hondrogene indukcije i bojenja Safranin-om (c). U kulturi tumorskih ćelija nije došlo do stvaranja lipidnih vezikula 21 dan nakon neurogene indukcije i bojenja sa Oil Red bojom (e). Usmeravanjem tumorskih ćelija ka neurogenezi nije došlo do morfoloških promena nakon 7 dana (g). Netretirane (kontrolne) ćelije za osteodiferencijaciju (b), hondrodiferencijaciju (d), adipodiferencijaciju (e) i neurodiferencijaciju (f). Prikazane su reprezentativne slike. Vrednost razmera je 20 μm .



Grafikon 4.4. Ekspresija markera osteogene i hondrogene diferencijacije. Nivo gena osteodiferencijacije (ALP, BSP, Runx2, OCN, BMP2 i BMP4) je u tumorskim ćelijama (BCK KMC-OM) nakon osteoindukcije statistički značajno više ekspimiran u odnosu na netretirane ćelije (a, b, c, d, e, g). Izuzetak je BMP4 gen gde je vrednost povišena u odnosu na kontrolu ali bez statističke značajnosti (f). Takođe, 21 dan nakon hondrogenog usmeravanja kancerskih matičnih ćelija (BCK KMC-HM) ekspresija COL1 i COL2A1 je veća u odnosu na kontrolne ćelije (h, i). Statistička značajnost razlike u ekspresiji markera u diferentovanim ćelijama u odnosu na kontrolu predstavljena zvezdicom *, **, *** određuje p-vrednost manju od 0,05, 0,01 i 0,001 respektivno.



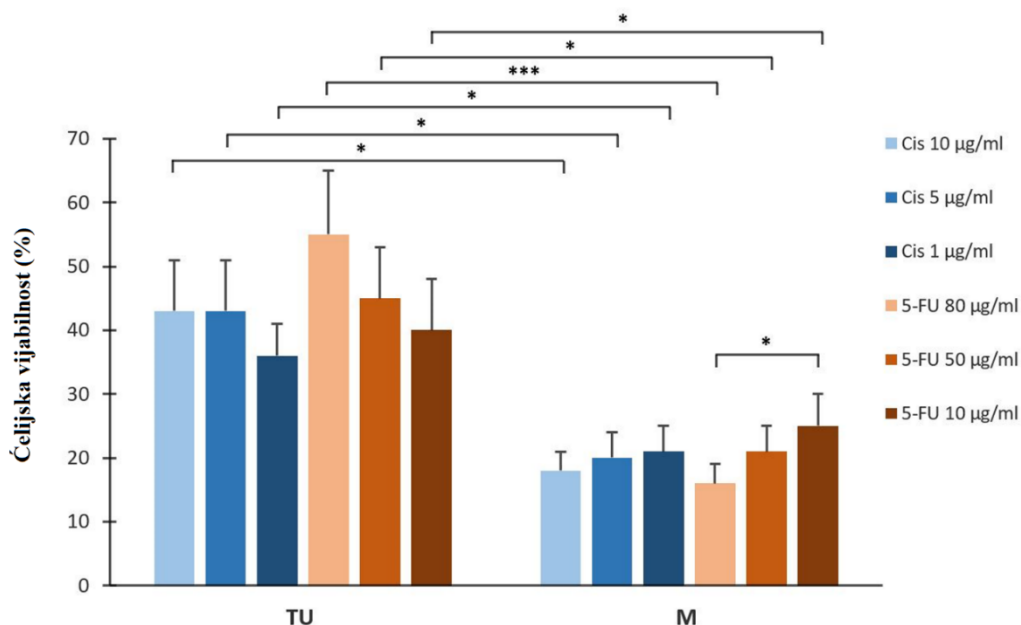
Grafikon 4.5. Ekspresija markera adipogene i neurogene diferencijacije. 21 dan nakon iniciranja procesa adipogeneze nije bilo statistički značajne razlike u nivou ekspresije gena PPAR- γ između indukovanih (BCK KMC-AM) i neindukovanih tumorskih ćelija (a). Sedam dana nakon tretmana tumorskih ćelija neurogenim medijumom (BCK KMC-NM) nije došlo do povećanja markera neurodiferencijacije (Nestin i MAP2) u tretiranim ćelijama (b, c).



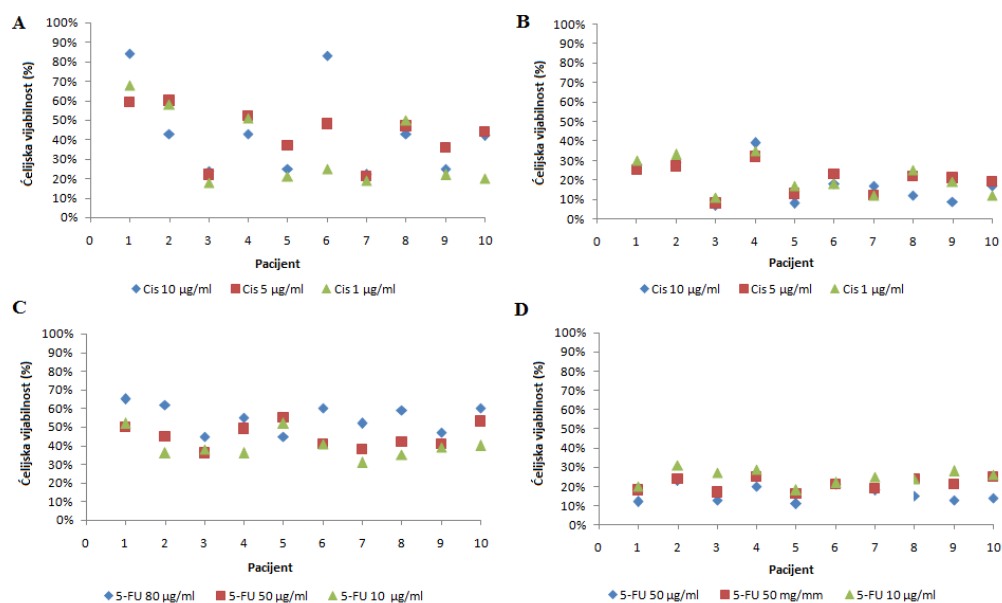
Grafikon 4.6. Uticaj diferencijacije na ekspresiju tumorskih markera. Nivo ekspresije markera CD44 (a) i CD73 (b) u kancerskim matičnim ćelijama bazocelularnog karcinoma se nakon hondrogene diferencijacije (BCK KMČ-HM) smanjuje u odnosu na neindukovane ćelije, za razliku od ćelija tretiranih adipogenim medijumom (BCK KMČ-AM) gde nakon 21. dana nije došlo do adipogeneze.

4.4.11. Test citotoksičnosti

Tumorske ćelije su pokazale veći stepen hemorezistentnosti na dejstvo različitih koncentracija cisplatina i 5-fluorouracila 24 h nakon tretmana. Isti trend je pokazan i nakon 48 h i 7 dana pri čemu je stepen preživljavanja značajno smanjen u funkciji vremena (podaci nisu prikazani). Prosečne vrednosti preživljavanja za 10 pacijenata nakon dvadesetčetvoročasovnog tretmana prikazane su na Grafikonu 4.7. MTT i Neutral red test su pokazali podudarne rezultate (Slika 4.10). U ćelijama margine 24 h nakon tretmana preživljavanje ćelija margine se smanjuje usled povećanja doze leka, za razliku od tumorskih ćelija gde dozna zavisnost nije uočena. Tretman 5-fluorouracilom je pokazao uniformniji citostatski efekat na obe ćelijske kulture za razliku od cisplatina (Grafikon 4.8).

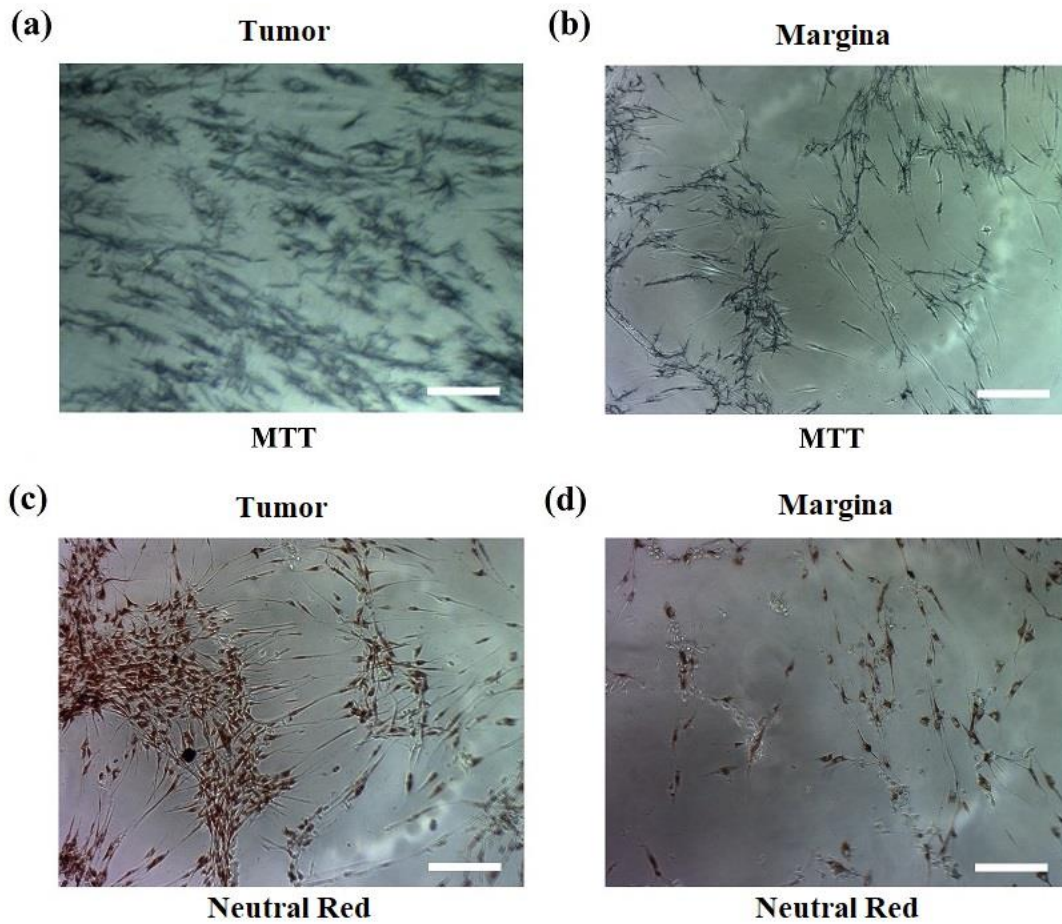


Grafikon 4.7. Hemiorezistentnost tumorskih ćelija. Tumorske ćelije pete pasaže tretirane različitim koncentracijama cisplatina i 5- fluorouracila pokazale su veći stepen preživljavanja u odnosu na ćelije margine. Statistička značajnost razlike preživljavanju tumorskih ćelija nakon dvadesetčetvoročasovnog tretmana u odnosu na ćelije margine predstavljena zvezdicom *, *** određuje *p*-vrednost manju od 0,05 i 0,001 respektivno.



Grafikon 4.8. Dejstvo cisplatina i 5-fluorouracila na ćelije tumora i margine. Postignut efekat nakon 24 h od tretmana različitim koncentracijama Cisplatina na ćelije tumorska (A) i ćelije margine (D) kao i različitih koncentracija 5-fluorouracila na tumorske (C) i ćelije margine (D)

Rezultati su prikazani za svakog pacijenta pojedinačno. Uočava se ujednačeno dejstvo 5-fluorouracila na obe ćelijske populacije.



Slika 4.10. Test citotoksičnosti 48 h nakon tretmana. Dejstvo 5-FU na tumorske ćelije (a, c) i ćelije margine (b, d) detektovano MTT testom (a, b) i Neutral Red testom (b, c). Prikazane su reprezentativne slike. Vrednost razmera je 20 μm .

5. DISKUSIJA

Bazocelularni karcinom je najzastupljeniji maligni tumor kože sa incidencijom u stalnom porastu (Lomas i sar, 2012). UV-zračenje predstavlja jedan od glavnih faktora za nastanak BCK-a, što potvrđuje i njegova najčešća lokalizacija na koži lica (Raaschi i sar, 2006). Istraživanja pokazuju da pri hirurškoj eksciziji bazocelularnog karcinoma šira margina osigurava uspješnu terapiju i smanjuje rizik od recidiva (Gulleth i sar, 2010). Međutim, očuvanje zdravog tkiva na koži lica zbog mogućih funkcionalnih i estetskih defekata predstavlja imperativ, što znatno otežava terapiju, posebno kada je promena lokalizovana u blizini očnih kapaka i vrha nosa. Istraživanja su pokazala da bezbedna širina margine za BCK veličine do 2 cm iznosi 3 mm (Gulleth i sar, 2010).

Za potrebe ove studije prikupljeno je 13 primarnih lezija na koži lica, veličine do 20 mm, tretiranih hirurškom ekscizijom, sa širinom margine od 3 mm. Uspešno je izolovano 10 kultura tumorskih ćelija BCK-a, 10 kultura bliske margine od 3 mm i 10 kultura ćelija zdrave kože. Kod svih uzoraka potvrđena je histološki negativna margina.

Prvu kulturu ćelija humanog bazocelularnog karcinoma uspešno su izolovali Hernandez i saradnici 1985. godine a 1996. godine Grandi i saradnici su uspostavili dugotrajnu ćelijsku kulturu nodularnog BCK-a. So i sar. (2006) su uspeli da tri ćelijske linije BCK-a kože miša održe u preko 20 pasaža. U našoj studiji je od ukupno 13 uzoraka uspešno izolovano 10 primarnih kultura BCK-a čiji je proliferativni kapacitet opadao nakon desete pasaže, izuzev u jednom slučaju gde je zabeleženo više od 20 pasaža.

Otkriće posebne populacije kancerskih ćelija u solidnim tumorima tzv. kancerskih matičnih ćelija značajno je promenilo razumevanje kancerogeneze i pravac terapije u lečenju tumora. Prema Petersonu i sar. (2015) za agresivno ponašanje nekih karcinoma upravo je odgovorna posebna populacija tumorskih ćelija – KMĆ. Brojna istraživanja su potvrdila prisustvo ovih ćelija u hematopoeznim i nekim solidnim tumorima. Ideja postojanja pluripotentnih matičnih ćelija u solidnim tumorima najpre se javila kliničkom opservacijom teratoma, tumora poreklom iz germinativnih ćelije, građenih od nekoliko vrsta tkiva koji poseduju mogućnost diferencijacije u sva tri klicina lista (Andrews i sar, 2002). Ove ćelije čine mali deo ukupne populacije tumorskih ćelija i jedine poseduju sposobnost regeneracije tumorskog tkiva. Istraživanja na animalnom modelu pokazuju da nakon subkutanog ubrizgavanja tumorskih ćelija karcinoma dojke samo određene ćelije ispoljavaju sposobnost stvaranja kolonija (Gioanni i sar, 1988). Slično tome, pedesetih godina prošlog veka, izveden je eksperiment neprihvatljiv prema današnjim etičkim standardima. Naime, kod 35 pacijenata sa tumorima izvršena je autotransplatacija velikog broja tumorskih ćelija sa mesta primarnog tumora u podlakticu ili butinu istog pacijenta,

od čega je „samo“ kod 7 pacijenata došlo do razvoja tumora (Southam i sar, 1960). Takođe, studije koje su ispitivale ćelije akutne mijeloidne leukemije su pokazale da samo 0,1 do 1% ćelija ima potencijal da ponovo inicira i stvori tumorske ćelije (Lapidot i sar, 1994). Iako tačno poreklo matičnih ćelija još uvek nije razjašnjeno pretpostavlja se da KMĆ-a mogu nastati ili malignom transformacijom zdravih matičnih ćelija ili dediferencijacijom zrelih ćelija pod uticajem kancerogena (Cozzio i sar, 2003). Istraživanja su pokazala da bazocelularni karcinom kože vodi poreklo od matičnih ćelija ispučenja folikula dlake, infundibuluma dlake i interfolikularnog epidermisa te se pretpostavlja da kancerske matične ćelije BCK-a kože nastaju malignom transformacijom zdravih matičnih ćelija (Youssef i sar, 2010; Wong i Reiter, 2011; Petersonu i sar, 2015).

Visok proliferativni kapacitet i sposobnost samoobnavljanja predstavljaju jednu od fundamentalnih karakteristika KMĆ-a (Bonnet i Dick, 1997). Deobom zdravih matičnih ćelija nastaju ćerke ćelije koje poseduju ograničenu sposobnost samoobnavljanja, za razliku od KMĆ-a gde je ova sposobnost neograničena. U našem istraživanju tumorske ćelije pokazale su veći proliferativni kapacitet u odnosu na ćelije margine i kontrole. Poznato je da se tumorska masa sastoji iz heterogene populacije ćelija a zahvaljujući pasažiranju ćelija uspostavlja uniformnija ćelijska kultura. Tumorske ćelije su pokazale veći proliferativni kapacitet sa porastom broja pasaža za razliku od kontrole. Ovaj fenomen je takođe bio prisutan i u margini ali bez statističke značajnosti. Neka istraživanja koja su imala za cilj da uspostave ćelijske linije bazocelularnog karcinoma ukazuju da proliferativni kapacitet ovih tumorskih ćelija tokom pasaža opada. Studija koja ispituje klonogeni kapacitet ćelija BCK-a prve pasaže pokazala je uspešnost stvaranja kolonija samo u 47% slučajeva (Hernandez i sar, 1985). Grandu i sar. (1996) ukazuju da u ranim primarnim kulturama tokom vremena dolazi do smanjenja proliferativne sposobnosti ali da zadržavaju sposobnost stvaranja kolonija.

Neke od karakteristika za razlikovanje patološkog od fiziološkog ponašanja ćelija su migracija i ćelijska invazija. Ćelijska migracija se definiše kao kretanje pojedinačnih ili grupe ćelija sa jednog mesta na drugo (Friedl i sar, 2000; Friedl i sar, 2003). Test zarastanja rane ili „Scratch wound assay“ je našao primenu u ispitivanju ponašanja brojnih tumora. Iako BCK pokazuje veoma malu sklonost ka metastaziranju neki podtipovi ovog tumora imaju osobinu invazivnog rasta prema okolnim strukturama. Rezultati naše studije pokazuju da ćelije izolovane iz tumorskog tkiva pokazuju veću

sposobnost migracije u odnosu na ćelije okolne margine i zdrave kože. U studiji Nelson i sar. (2014) u karcinomu dojke, gotovo polovina prostora između ćelija napravljenog grebanjem je popunjena za 16 h što ukazuje na značajno bržu sposobnost migracije karcinoma dojke u odnosu na tumorske ćelije BCK-a.

Kao važan funkcionalni test za detektovanje populacije KMĆ-a koristi se test formiranja sfera. U cilju utvrđivanja specifičnih KMĆ-a ovaj test je našao primenu u ispitivanju mnogih tumora, uključujući tumor dojke (Ponti i sar, 2005), debelog creva (Ricci-Vitiani i sar, 2007; Shaheen i sar, 2016), prostate (Collins i sar, 2005), i dr. U našoj studiji je pokazano da tumorske ćelije mogu stvarati pravilne sferične forme na neadherentnoj podlozi za razliku od kontrolnih ćelija koje nisu pokazale tu sposobnost. Takođe, rezultati su pokazali da određeni broj ćelija margine poseduje ovu sposobnost pri čemu je broj i dijametar sfera margine manji od sfera tumora. U ćelijama tumora je uočena jasna korelacija između CD44 markera i broja tumorosfera, što može ukazivati da ćelije sa većom sposobnošću formiranja sfera poseduju i veći tumorski potencijal, što je u saglasnosti sa rezultatima *in vitro* studije Kim i sar. (2016) sprovedene na karcinomu dojke.

Za razliku od hematopoeznih tumora koji ekspimiraju hematopoezne markere, tumorske ćelije solidnih tumora ekspimiraju tkivno specifične markere. Prema do sada poznatim podacima u literaturi ne postoji specifična kombinacija markera za identifikaciju pojedinačnih kancerskih matičnih ćelija.

Transkripcioni faktor Oct4 igra važnu ulogu u ranoj embriogenezi i ispoljavanju osobine pluripotentnosti (Nichols i sar, 1998). Pored toga, detektovan je u diferentovanim ćelijama benignih i malignih tumora (Tai i sar, 2005). Uloga, transkripcionog faktora Sox2 se ogleda u indukciji procesa proliferacije, migracije, metastaziranja i invazije KMĆ pomoću različitih signalnih puteva zavisno od vrste karcinoma (Schoenhals i sar, 2009). Pored Oct4 i Sox2, u nekim solidnim tumorima registrovano je i prisustvo transkripcionog faktora Nanog sa kojima deli ulogu u procesima regulacije matičnosti (Ezeh i sar, 2005; Huang i sar, 2009).

Ovo je prva komparativna analiza nekoliko ključnih markera matičnosti u ćelijama bazocelularnog karcinoma i bliske margine. Marker Oct4, Sox2 i Nanog, glavni regulatori samoobnavljanja matičnih ćelija, čije je prisustvo pokazano i u različitim KMĆ-a i tumorskim ćelijskim linijama (Amin i sar, 2014), do sada nisu ispitivani na

BCK-u ili njegovim marginama. U ovoj studiji, uočili smo povećanu ekspresiju Oct4, Sox2 i Nanog markera u ćelijskim kulturama tumorskog tkiva. Slični nalazi zabeleženi su kod kolorektalnog karcinoma (Meng i sar, 2010), ezofagealnog karcinoma (Huang i sar, 2009), karcinoma prostate (Gu i sar, 2007) i karcinoma dojke (Ben-porath i sar, 2008). U našoj studiji uočena je neznatna razlika u nivou ekspresije ovih gena između ćelijske kulture margine i zdrave kontrole.

Mezenhimski markeri CD44, CD73 i CD90 su otkriveni u sve tri grupe ćelijskih kultura, iako s različitim nivoima ekspresije.

Transmembranski protein CD44 funkcioniše kao receptor za mnoge komponente ekstracelularnog matriksa, i predstavlja signalnu platformu za integraciju mikrokruženja sa faktorima rasta i citokinima što indirektno utiče na nivo ekspresije različitih gena odgovornih za ćelijsku migraciju, proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje (Naor i sar, 2008). Protein CD44 je prisutan u zdravim adultnim tkivima kao što su centralni nervni sistem, pluća i epidermis (Senbanjo i Chellaiah, 2017). Receptor CD44 je jedan od najvažnijih markera KMC i prethodno je identifikovan u brojnim solidnim tumorima poput karcinoma dojke (Basakran, 2015), kolorektalnog karcinoma (Yamane i sar, 1999), karcinoma prostate (Gupta i sar, 2012), pankreasa (Yan i sar, 2015) i skvamocelularnog karcinoma glave i vrata (Prince i sar, 2007). U našoj studiji u ćelijskoj kulturi zdravih ćelija nivo ekspresije ovog markera je bio značajno niži u odnosu na ćelije tumora i margine.

U istraživanjima koja se bave molekularnom osnovom kancerogeneze različitih vrsta tumora, CD90 se pominje kao jedan od kancerskih biomarkera (Shaikh i sar, 2016). Prema Kundrotasu i sar. (2012), prisustvo markera CD90 zabeleženo je i u ćelijama bazalne membrane i ćelijama stabla folikula dlake izolovanih iz zdrave kože, što ukazuje na ozbiljan problem u diskriminaciji između zdravih i kancerskih matičnih ćelija kada je ovaj marker u pitanju. Naši podaci potvrđuju prisustvo ovog glikoproteina u kulturama BCK-a i njihove margine ali i visok nivo ekspresije u zdravom tkivu.

Marker CD73 pored značajne uloge u brojnim fiziološkim i patofiziološkim procesima smatra se i značajnim prognostičkim faktorom kod oralnog skvamocelularnog karcinoma (Reni i sar, 2016), karcinoma jajnika (Song i sar 2017) i karcinoma pljuvačnih žlezda (Ranjbar i sar, 2019). Prisustvo trećeg mezenhimalnog markera CD73 bilo je izraženije u BCK-u nego u margini i zdravom tkivu.

Naši rezultati pokazuju veću ekspresiju Bmi-1 u tumoru u odnosu na marginu ali ne i u odnosu na kontrolu. Neke studije su pokazale značajan nivo ekspresije ovog markera u BCK-u ali i fibroblastima i suprabazalnim keratinocitima što bi moglo biti objašnjenje za prisustvo ovog proteina i u kontrolnim, zdravim ćelijama (Reinisch i sar, 2007). Specijalna subpopulacija ezofagealnog karcinoma tzv. kancer-inicirajuće ćelije pokazale su veću ekspresiju ovog markera u odnosu na druge tumorske ćelije (Huang i sar, 2009).

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je značajno veća ekspresija GPR49 markera u tumoru u odnosu na ćelije margine i kontrole što je u saglasnosti sa nekim ranijim studijama. Tako, npr., prema istraživanjima Tanese i sar. (2008) ovaj glikoprotein iz porodice G proteina, član Wnt signalnog puta koji je odgovoran za proliferaciju, migraciju i malignu transformaciju ćelija, igra važnu ulogu u procesu geneze BCK-a.

Zdrave matične ćelije svoju sposobnost samoobnavljanja tokom razvoja tkiva i održavanja homeostaze, postižu aktiviranjem različitih signalnih puteva. Abnormalnosti pojedinih signalnih puteva mogu dovesti do procesa kancerogeneze i nastanka tumora. Poznato je da Shh signalni put igra važnu ulogu u razvoju kožnih tumora među kojima i BCK-a. Istraživanja su pokazala da blokadom Shh signalnog puta postepeno nastaje regresija BCK-dok dok ponovnom aktivacijom signalnog puta dolazi do reaktivacije tumora. Najveći broj (80%–90%) slučajeva BCK je uzrokovan mutacijom i inaktivacijom tumor supresornog gena PTCH1 (High i Zedan, 2005), dok je mutacijom/aktivacijom protoonkogeno Smo uzrokovano 10%–20% slučajeva BCK-a (Epstein, 2011). U inaktivnom stanju Hh receptor Patched (Ptch) inhibira nishodni deo puta Smoothened (Smo). PTCH1 je ciljni gen ovog signalnog puta i njegovom aktivacijom se povećava ekspresija PTCH (High i Zedan, 2005). Po vezivanju Hh liganda, Ptch inhibicija slabi, a Smo signali preko citosolnog kompleksa proteina aktiviraju nishodni deo puta. Deo puta nishodno od Smo, koji još uvek nije dovoljno ispitan, obuhvata tri transkripciona faktora: GLI1, GLI2 i GLI3, koji se smatraju važnim u patogenezi BCK-a (High i Zedan, 2005). Istraživanja su pokazala da izražena ekspresija GLI1 i GLI2 dovodi do BCK-a kože miša. Smatra se da je Gli1 direktna transkripciona meta Hh signalizacije i marker aktivnosti ovog signalnog puta. Za sada je poznato da se mehanizam delovanja GLI1 zasniva na delovanju na trombocitni faktor rasta (PDGFRa) čija je povećana ekspresija zapažena u BCK sisara i ljudi (Xie i sar, 2001).

Dok je aktivnost Hh signalnog puta u folikulu dlake ograničena samo na period aktivnog rasta, odsustvom Shh liganda ovaj put postaje konstantno aktivan i zbog mutacija u PTCH ili Smo dolazi do razvoja BCK-a (Xie i sar, 1998).

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je nivo ekspresije PTCH1 niži u tumorskim ćelijama obe pasaže ali bez statističke značajnosti. Tokom pasaža nivo ekspresije GLI1 gena u tumorskim ćelijama raste i u petoj pasaži u odnosu na ćelije margine i kontrole je značajno više eksprimiran. Ovi podaci ukazuju na poremećaj regulacije nishodnog dela puta BCK-a. Abnormalnosti u signalnom putu koje se odnose na komponente Shh, PTCH1, Smo, Gli1 i Gli2 imaju bitan uticaj u nastanku BCK-a (Athar i sar, 2006).

Studija u kojoj aktivacija GLI2 Δ N mutiranog alela u keratin 15⁺ ćelijama proširenja korena dlake vodi ka razvoju ovog tumora potvrđuje ulogu ovog transgena u razvoju BCK-a (Grachtchouk i sar, 2003). Takođe transgenom aktivacijom GLI2 gena dolazi do regresije BCK-a (Hutchin i sar, 2005).

Pored gore opisanih standardnih metoda karakterizacije kancerskih matičnih ćelija, korišćena je i dopunska metoda – ramanska spektroskopija. Ramanska spektroskopija je neinvazivna optička metoda koja se koristi za određivanje biohemijskog sastava bioloških uzoraka kao što su ćelije i tkiva. Temelji se na interakciji monohromatskog svetla i vibriranja molekula i međumolekulskih veza unutar uzoraka (Koningstein, 1971). Ova metoda je poslednjih godina našla i svoju kliničku primenu u skriningu i dijagnostici tumora a koristi se i kao vodič za razlikovanje tumorskog od zdravog tkiva intraoperativno (Jermyn i sar, 2016; Santos i sar, 2017). Patološke promene na nivou tkiva i ćelija dovode do promena u biohemijskom sastavu što se može ustanoviti upravo ovom metodom. Istraživanje Nijssen i sar. (2002) je pokazalo da Raman spektroskopija pokazuje 100% senzitivnosti i 93% selektivnost u razlikovanju tkiva bazocelularnog karcinoma od tkiva zdrave kože. Primenom tzv. vidljive rezonantne Ramanske spektroskopije u dijagnostikovanju bazocelularnog karcinoma postiže se 94,5% tačnosti u poređenju sa histopatološkom analizom koja se smatra zlatnim standardom (Cheng-hui i sar, 2019). Gniadecka i sar. (1997) su utvrdili da se analizom regiona 928-940, 1220-1300, 1420-1450 i 1640-1680 može jasno videti razlika između BCK i zdravog tkiva što se i iz naših rezultata može zaključiti. Naša studija je takođe ukazala na značajne biohemijske razlike između tumorskih ćelijskih kultura, kultura margine i kontrole, potvrđujući, sa jedne strane pouzdanost metode kada je reč o

pravljenju fine razlike između različitih ćelija, a sa druge pokazujući specifičnosti biohemijskog sastava ovih ćelijskih populacija.

Terapija diferencijacijom predstavlja novu strategiju u tretmanu karcinoma, koja je zasnovana na konceptu da kancerske ćelije vode poreklo od zdravih matičnih ćelija sa kojima dele osobine plastičnosti i matičnosti (Sell, 2010; Jin i sar, 2017). Sposobnost diferencijacije u više različitih ćelijskih linija predstavlja jednu od ključnih karakteristika matičnosti (Alison i sar, 2009). U fiziološkim uslovima, kod zdravih matičnih ćelija dolazi do terminalne diferencijacije kada ćelija postaje tkivno specifična. Za razliku od zdravih matičnih ćelija u tumorskim matičnim ćelijama ne dolazi do spontane diferencijacije i sposobnost kontinuiranog umnožavanja se neograničeno održava (Dean i sar, 2015). Ukoliko u ranoj fazi razvoja i stanju nedovoljne diferencijacije dejstvom onkogenih faktora dođe do oštećenja matičnih ćelija, to može dovesti do maligne transformacije. Terapija diferencijacijom ima za cilj da indukuje tumorsku ćeliju ka kontinuiranom sazrevanju i diferencijaciji. Iako većina agenasa koji indukuju diferencijaciju ne mogu direktno uništiti neoplastične ćelije, oni ipak mogu inhibirati njihovu proliferaciju i indukovati terminalnu diferencijaciju i na kraju apoptozu, odnosno programiranu ćelijsku smrt. Poznato je da stepen diferencijacije i malignosti nekog tumora zavisi od stepena diferencijacije ćelija porekla na kojima je došlo do zastoja u sazrevanju i onkogene mutacije. Smatra se da slabo diferencijovani tumori sa visokim malignim potencijalom vode poreklo od ćelija zaustavljenih u ranoj fazi diferencijacije dok više diferencijovani tumori sa manjim malignim potencijalom potiču od ćelija koje su na višem stupnju diferencijacije (Sell, 2004). Terapija diferencijacijom može slabo diferencijovan i agresivan tumor prevesti u stadijum u kom je moguća uspešna primena konvencionalne terapije (Yan i Liu, 2016).

Još 70-ih godina javila se ideja o diferencijacionoj terapiji BCK-a. Flaxman (1972) je došao na ideju da ćelije BCK-a treba usmeriti ka terminalnoj epitelnoj diferencijaciji – keratinizaciji kako bi se izazvala apoptoza. Najpre je uspeh na polju diferencijacione terapije postignut u terapiji akutne mijeloidne leukemije (Degos i sar, 1995). Istraživanja na solidnim tumorima, najpre tiroidnom karcinomu (Yan i sar, 2014) a zatim nazofaringealnom karcinomu (Grunwald i sar, 1998), ukazala su na potencijalnu uspešnu primenu ove vrste terapije. Nedavna istraživanja na ćelijama karcinoma debelog creva (Storm i sar, 2016) i glioblastoma (Gravina i sar, 2017) pokazala su da dolazi do

smanjene proliferacije tumorskih ćelija i povećanja osetljivosti na hemioterapiju i radioterapiju nakon diferencijacione terapije. Svi ovi podaci idu u prilog tome da bi kod karcinoma kod kojih je potvrđeno prisustvo KMC-a diferencijaciona terapija mogla naći svoju uspešnu primenu (de Thé, 2018). Dosadašnja istraživanja su pokazala da u ćelijama BCK-a do diferencijacije i spontane keratinizacije dolazi samo u *in vitro* uslovima dok u *in vivo* uslovima to nije slučaj.

Jedan od ključnih ciljeva ove studije bio je ispitivanje multipotentnosti tumorskih ćelija BCK-a, te je odgovarajućim medijumom indukovani proces diferencijacije u četiri različite ćelijske linije, odnosno pokrenute su osteodiferencijacija, hondrodiferencijacija, adipodiferencijacija i neurodiferencijacija. Paralelno, pod istim uslovima gajene su ćelije u kompletnom medijumu koje su služile kao kontrola.

U biološkim istraživanjima bojenje Alizarin crvenom se koristi kao standardna metoda za detekciju slobodnog kalcijuma, kalcijuma u kostima i nekih jedinjenja kalcijuma u drugim tkivima. Ova metoda služi kao standardna kolorimetrijska metoda za kvantitativno određivanje kalcijumovih depozita prisutnih u ćelijama osteogenog porekla, na osnovu čega se određuje stepen mineralizacije tkiva (Clark, 1973).

Kao što je prikazano u rezultatima, nakon bojenja tumorskih matičnih ćelija gajenih u osteogenom medijumu u trajanju od 21. dana, u tretiranim ćelijskim kulturama uočava se prisustvo crveno prebojenih depozita kalcijuma, za razliku od ćelijskih kultura gajenih u kontrolnom medijumu gde njegovo prisustvo nije detektovano. Prisustvo mineralizacije u tretiranoj ćelijskoj kulturi ukazuje na sposobnost diferencijacije kancerskih matičnih ćelija.

I drugi autori su u svojim studijama ukazali na osteogeni potencijal tumorskih ćelija. Zakaria i sar. (2015) su pokazali da ćelijske linije kancerskih matičnih ćelija nesitnoćelijskog karcinoma pluća nakon 3 nedelje indukcije u osteogenom medijumu pokazuju sposobnost osteogene diferencijacije. Zhau i sar. (2011) dolaze do sličnih rezultata nakon 3 nedelje osteogene indukcije ćelijske linije karcinoma prostate kao i Ding i sar. (2016) nakon osteogene indukcije primarnih ćelija epitelnog karcinoma jajnika. Zhang i sar. (2008) u svom istraživanju detektuju osteogeni potencijal sitnoćelijskog karcinoma pluća već nakon prve nedelje od započetog tretmana.

Enzim alkalna fosfataza je visoko eksprimirana u ćelijama mineralizovanih tkiva. Mehanizam pomoću kog ovaj enzim sprovodi svoju funkciju nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da kao promotor mineralizacije deluje na povećanje lokalne koncentracije neorganskih fosfata i smanjenje koncentracije ekstracelularnog pirofosfata, koji inhibira formiranje minerala (Holtz i Kantrowitz, 2011). U procesu osteodiferencijacije mezenhimalnih matičnih ćelija ALP se eksprimira u početnoj fazi diferencijacije (Aubin, 2001). Glavni gen u osteodiferencijaciji mezenhimalnih matičnih ćelija a time i održavanju integriteta kosti i remodelaciji je *Ranx2* gen (Carbonare i sar, 2012). Nedavna istraživanja pokazuju učešće ovog gena u ćelijskoj proliferaciji, epitelno-mezenhimalnoj tranziciji, apoptozi i metastaziranju što implicira da može biti važan u terapiji karcinoma (Owens i sar, 2014). Transkripcija mnogih faktora povezanih sa osteoblastima i formiranjem kosti kao što su osteopontin i osteokalcin (Cohen, 2009) kao i proces terminalne hondrogene diferencijacije regulisan je od strane *Ranx2* gena (Otto i sar, 1997). Osteokalcin je jedan od osteoblast-specifičnih gena i najzastupljeniji je u koštanom tkivu pored COL 1. Smatra se da igra važnu ulogu u diferencijaciji osteoblastnih progenitorskih ćelija, formiranju koštanog matriksa kao i procesu mineralizacije (Hoffmann i sar, 1996). U procesu osteodiferencijacije javlja se kao kasni marker diferencijacije (Hoffmann i sar, 1996). Povećanje ekspresije osteogenih markera (alkalne fosfataze, *Ranx2* i osteokalcina) u tretiranim ćelijama je u skladu sa rezultatima Zhang i saradnika (2008) s tim što je u njihovom istraživanju analizirana ekspresija proteina, a ne iRNK kao u našoj studiji. Zhau i sar. (2011) RT-PCR metodom već nakon 8 dana od indukcije detektuju rast osteogenih markera osteokalcina i osteopontina kao i *Ranx2* u osteoindukovanim ćelijskim linijama karcinoma prostate. Grupa BMP proteina (bone morphogenetic proteins) je grupa srodnih proteina prvobitno identifikovanih u ekstraktu demineralizovane kosti. BMP igraju važnu ulogu u promociji diferencijacije pluripotentnih matičnih ćelija duž različitih linija, na primer, u osteogenezi (Levi i sar 2011), adipogenezi (Tseng i sar, 2008) i hondrogenezi (Kim i Im, 2009). Prema literaturi BMP2, BMP4 i BMP6 pokazuju visok osteoinduktivni potencijal, utičući na odontogenezu, regeneraciju i zaceljivanje kostiju, formiranje koštanog tkiva i heterotopsku indukciju kostiju (Kochanowskai sar, 2007). Frank i sar (2002) RT-PCR metodom potvrđuju osteogenu diferencijaciju ćelija koštane srži povećanjem ekspresije BMP2 i BSP. Naša studija takođe pokazuje povećanje ekspresije koštanog morfogenetičkog proteina 2 (BMP2) i BSP u osteoblastima sličnim ćelijama.

Bojenje Safranin O bojom predstavlja metodu prebojavanja glikozaminoglikana u hrskavičavom tkivu što predstavlja potvrdu hondrogene diferencijacije. Intenzitet narandžasto crvene prebojenosti Safraninom O je proporcionalan količini proteoglikana u tkivu ili ćelijskoj kulturi. Kao što je već pomenuto u rezultatima, nakon izlaganja tumorskih matičnih ćelija dejstvu hondrogenog medijuma u trajanju od tri nedelje uočeno je novoformirano hrskavičavo tkivo.

Veća ekspresije markera hondrogene diferencijacije u indukovanim ćelijama u odnosu na kontrolne ćelije je u saglasnosti sa rezultatima Zhang i saradnika (2008) gde je porast proteina kolagena tipa 1 zabeležen Westen blot metodom, dok je RT-PCR metodom porast kolagena tipa 2 uočen kod primarnih ćelija karcinoma jajnika. Suprotno tome, u istraživanjima Ding i sar. (2016) i Zakaria i sar. (2015) nakon hondrogene indukcije tumorskih ćelija karcinoma pluća nije došlo do hondrogene diferencijacije.

Istraživanja koja su ispitivala sposobnost adipodiferencijacije kod ćelija karcinoma jajnika (Ding i sar, 2016) i karcinoma pluća (Zhau i sar, 2011; Zakaria i sar, 2015) pokazala su da ćelije ovih tumora imaju sposobnost diferencijacije u lipidne ćelije. Lipidne kapi se kod ćelijske kulture karcinoma prostate (Zhau i sar, 2011) uočavaju već nakon 7 dana. U našem istraživanju, 21 dan nakon zasejavanja bojenje Oil Red O bojom nije pokazalo prisustvo lipidnih partikula u ćelijama.

U našoj studiji, glavni regulator transkripcije adipogene diferencijacije – PPAR γ nije pokazao statistički značajno veću ekspresiju u tretiranim ćelijama adipogenim medijumom u odnosu na netretirane ćelije. Suprotno tome, statistički značajno povećanje PPAR γ nakon indukcije pokazali su u svojoj studiji Zhau i sar. (2011) na ćelijama karcinoma prostate RT-PCR metodom i Zhang i sar. (2008) Westen blot metodom.

Neurogeno usmeravanje tumorskih ćelija bazocelularnog karcinoma nije dovelo do neurodiferencijacije što je potvrđeno čak i neznatnim smanjenjem ekspresije Nestin-a i MAP2. Zhang i sar. (2008) su u svojoj studiji indukovali neurogenezu karcinomskih ćelije pluća i za razliku od naše studije pokazali povećanje ekspresije neuron-specifičnih markera.

Tumorske matične ćelije bazocelularnog karcinom pokazale su sposobnost diferencijacije u dve ćelijske linije (osteogenu i hondrogenu) što ukazuje da ove ćelije poseduju osobine matičnosti.

Pored toga što zdrave matične ćelije karakteriše dug životni vek, otpornost na apoptozu i sposobnost DNK reparacije one pokazuju i izvestan stepen rezistencije na lekove. Kako kancerske matične ćelije dele brojna zajednička svojstva sa zdravim matičnim ćelijama postoji mogućnost da iste ove osobine mogu imati i KMĆ. Tumorske ćelije pokazuju rezistenciju na lekove putem više različitih mehanizama kojima se remeti apsorpcija, distribucija i eliminacija leka iz tkiva. Brojna istraživanja u solidnim tumorima (Dou i sar, 2007; Bragado i sar, 2013) ukazuju da su za hemiorezistenciju upravo odgovorne KMĆ.

Pojava recidiva i nakon primarnog pozitivnog odgovora na hemioterapiju ukazuje na rezistentnost tumora na lekove. Postoji nekoliko mogućih objašnjenja za hemiorezistentnost tumora. U određenim tumorskim ćelijama otpornost na terapiju se može javiti kao posledica genskih mutacija koje omogućavaju selektivno preživljavanje tih ćelija i preuzimanje dominacije u odnosu na druge ćelije tumorske mase. Postoji mogućnost i da tumorske matične ćelije prirodno poseduju otpornost na hemioterapiju zbog sposobnosti reparacije DNK ili tu osobinu mogu steći i preneti na svoje potomstvo (Dean i sar, 2005).

Umesto hirurške terapije kod superficijalnih formi BCK-a preporučuje se lokalna aplikacija 5% krema (Clark i sar, 2014). Lek 5-fluorouracil je po hemijskom sastavu fluorirani pirimidin koji blokira reakciju metilacije dezoksiribonukleinske kiseline u timidilicnu kiselinu. Na taj način fluorouracil ometa sintezu DNK i u manjoj meri inhibira stvaranje ribonukleinske kiseline. Budući da su DNK i RNK bitni za rast i deobe ćelije, učinak fluorouracila se ogleda u izazivanju nedostatka timina koji izaziva neuravnotežen rast i dovodi do ćelijske smrti (Padgett i sar, 2001).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da viabilnost ćelija u tumorskim ćelijama i ćelijama margine 24 h, 48 h i 7 dana opada s tim što su značajno veću rezistentnost pokazale tumorske ćelije. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Olesen i sar. (2017) koji su ispitivali dejstvo cisplatina i 5-FU na dve ćelijske linije BCK-a u dva vremenska intervala – 24 i 72 h. U našem istraživanju cisplatin je imao neznatno bolji efekat u odnosu na 5-fluorouracil kao što je slučaj i u pomenutom istraživanju. Mehanizam rezistencije tumora može se objasniti i poremećajem signalnog Hh puta i to na nivou nishodnog dela signalnog puta – GLI1 (Wang i sar, 2017). Analizom signalizacionih kaskada u našem istraživanju u tumorskim ćelijama pokazana je povećana ekspresija GLI1 u odnosu na

ćelije margine i kontrole što može biti objašnjenje za povećanu rezistenciju ovih ćelija na dejstvo citostatika.

Na osnovu pokazanih rezultata, možemo da zaključimo da karakteristike ćelija izolovanih iz tumorskog tkiva BCK-a ukazuju na prisustvo populacija kancerskih matičnih ćelija. Takođe, na osnovu zajedničkih fenotipskih osobina ćelija bliske margine i tumorskih ćelija BCK-a proizilazi i mogućnost prisustva KMĆ i u ćelijama histološki čiste margine zbog čega treba pažljivo razmotriti šta bi predstavljalo optimalnu širinu hirurške ekscizije. Ćelije tumora pokazale su sposobnost diferencijacije u dve ćelijske linije- osteogenu i hondroenu što ukazuje na potencijal diferencijacione terapije kod uznapredovalih BCK-a. Potrebna su dalja istraživanja na polju identifikacije specifičnih markera za detekciju KMĆ BCK-a kao i utvrđivanja stepena prisustva i fenotipskih karakteristika ove subpopulacije ćelija u različitim histološkim podtipovima BCK-a.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu navedenih ciljeva i dobijenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

- 1) Optimizovana je metoda izolacije i kultivacije tumorskih ćelija bazocelularnog karcinoma i bliske margine, odnosno uspešno je generisano 20 primarnih ćelijskih kultura.
- 2) Iz obe vrste kultura (tumor i margina) izolovane su subpopulacije ćelija sa karakteristikama kancerskih matičnih ćelija
- 3) Tumorske ćelije su pokazale veći proliferativni i klonogeni kapacitet i veću migratornu sposobnost u odnosu na ćelije margine i kontrole
- 4) Tumorske ćelije i ćelije margine pokazale su sposobnost formiranja sfera
- 5) U obe vrste kultura je dokazana ekspresija embrionalnih, mezenhimalnih i tumorskih markera matičnosti, dok su hematopoezni markeri bili odsutni
- 6) U tumorskim ćelijama utvrđen je poremećaj regulacije Sonic Hedgehog signalnog puta
- 7) Ramanski spektar BCK se značajno razlikuje od spektra zdrave kože, te ova metoda može biti korisna u diskriminaciji tkiva zahvaćenog tumorom od zdravog tkiva.
- 8) Tumorske ćelije pokazale su sposobnost diferencijacije u osteogenu i hondrogenu ćelijsku lozu što bi otvorilo mogućnost diferencijacione terapije
- 9) Tumorske ćelije pokazale su veći nivo rezistentnosti na dejstvo citostatika u odnosu na ćelije margine i kontrole.

Na osnovu svih analiza urađenih u sklopu ove studije, zaključak je da ćelije margina pokazuju jasnu fenotipsku sličnost sa tumorskim ćelijama, što potencijalno ukazuje na prisustvo kancerskih matičnih ćelija i u histološki čistoj margini.

7. LITERATURA

A

Abbas O, Borman H. Basal cell carcinoma: a single-center experience. *ISRN Dermatol.* 2012: 246542, 2012.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison S, Clarke M. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(7): 3983-8, 2003.

Alison M, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol.* 217: 144–60, 2009.

Altamura D, Menzies S, Argenziano G, Zalaudek I, Soyer H, Sera F, Avramidis M, DeAmbrosis K, Fargnoli M, Peris K. Dermoscopy of basal cell carcinoma: Morphologic variability of global and local features and accuracy of diagnosis. *J Am Acad Dermatol.* 62: 67-75, 2010.

American Cancer Society. Key statistics for basal and squamous cell skin cancers. Dostupno na: <http://www.cancer.org/cancer/skincancerbasalandsquamouscell/detailedguide/skin-cancer-basal-and-squamous-cell-key-statistics> (poslednji put revidirano 08. Januara 2019).

Amini S, Fathi F, Mobalegi J, Sofimajidpour H, Ghadimi T. The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines. *Anat Cell Biol.* 47(1): 1-11, 2014.

Andrews P. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357: 405–17, 2002.

Armstrong L, Magnusson M, Guppy M. The Role of Embryologic Fusion Planes in the Invasiveness and Recurrence of Basal Cell Carcinoma: A Classic Mix-Up of Causation and Correlation. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 3(12): 582, 2016.

Armstrong L, Magnusson M, Guppy M. Risk factors for recurrence of facial basal cell carcinoma after surgical excision: A follow-up analysis. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 70(12): 1738-45, 2017.

Asgari M, Moffet H, Ray G, Quesenberry C. Trends in Basal Cell Carcinoma Incidence and Identification of High-Risk Subgroups, 1998-2012. *JAMA Dermatol.* 151(9): 976-81, 2015.

Athar M, Tang X, Lee J, Kopelovich L, Kim A. Hedgehog signalling in skin development and cancer. *Exp Dermatol.* 15(9): 667-77, 2006.

Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord.* 2: 81-94, 2001.

B

Bachmann I, Puntervoll H, Otte A, Akslen L. Loss of BMI1 expression is associated with clinical progress of malignant melanoma. *Modern Pathology.* 21: 583-90, 2008.

Bailey J, Alsina J, Rasheed Z, McAllister F, Fu Y, Plentz R, Zhang H, Pasricha P, Bardeesy N, Matsui W, Maitra A, Leach S. DCLK1 marks a morphologically distinct subpopulation of cells with stem cell properties in preinvasive pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 146(1): 245-56, 2014.

Basakran N. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Med. J.* 36: 273-79, 2015.

Basset-Seguín N, Hauschild A, Grob J, Kunstfeld R, Dréno B, Mortier L, Ascierto P, Licitra L, Dutriaux C, Thomas L, Jouary T, Meyer N, Guillot B, Dummer R, Fife K, Ernst D, Williams S, Fittipaldo A, Xynos I, Hansson J. Vismodegib in patients with advanced basal cell carcinoma (STEVIE): a pre-planned interim analysis of an international, open-label trial. *Lancet Oncol.* 16(6): 729-36, 2015.

Bastiaens M, Hoefnagel J, Bruijn J, Westendorp R, Vermeer B, Bouwes Bavinck J. Differences in age, site distribution, and sex between nodular and superficial basal cell carcinoma indicate different types of tumors. *J Invest Dermatol.* 110(6): 880-4, 1998.

Basu-Roy U, Seo E, Ramanathapuram L, Rapp T, Perry J, Orkin S, Mansukhani A, Basilico C. Sox2 maintains self renewal of tumor-initiating cells in osteosarcomas. *Oncogene.* 31: 2270-82. 2012.

Ben-Porath I, Thomson M, Carey V, Ge R, Bell G, Regev A, Weinberg R. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet.* 40(5): 499-507, 2008.

Birch-Johansen F, Jensen A, Mortensen L, Olesen A, Kjaer S. Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancer in Denmark 1978-2007: Rapid incidence increase among young Danish women. *Int J Cancer.* 127(9): 2190-8, 2010.

Blanpain C, Lowry W, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell.* 118: 635–48, 2004.

Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(3): 207–17, 2009.

Bonnet D, Dick J. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 3(7): 730–7, 1997,

Botchkarev V, Fessing M. Edar signaling in the control of hair follicle development. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 10(3): 247-51, 2005.

Borenfreund E, Puerner J. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 24(2-3): 119-24, 1985.

Bower C, Lear J, de Berker D. Basal cell carcinoma follow-up practices by dermatologists: a national survey. *Br J Dermatol.* 145(6): 949-56, 2001.

Boyer L, Lee T, Cole M, Johnstone S, Levine S, Zucker J, Guenther M, Kumar R, Murray H, Jenner R, Gifford D, Melton D, Jaenisch R, Young R. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 122(6): 947-56, 2005.

Bradbeer M, Bourne A, Ayberk H, Tang S, Marks R. Growth and antigenic characteristics of basal cell carcinoma in culture. *Arch Dermatol Res.* 280(4): 228-34, 1988.

Bragado P1, Estrada Y, Parikh F, Krause S, Capobianco C, Farina HG, Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA. TGF- β 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF- β -RIII and p38 α / β signalling. *Nat Cell Biol.* 15(11): 1351-61, 2013.

Braun F, Plewig G, Wolff H, Winkelmann R. Malignant epithelial tumors. *Dermatology.* 987-998. Springer, Berlin, Heidelberg, 1991.

Breuer R, Snijders P, Smit E, Sutedja T, Sewalt R, Otte A, van Kemenade F, Postmus P, Meijer C, Raaphorst F. Increased expression of the EZH2 polycomb group gene in BMI-1-positive neoplastic cells during bronchial carcinogenesis. *Neoplasia.* 6: 736-43, 2004.

Bruce W, Van Der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature.* 199: 79-80, 1963.

C

Cancer Council Australia. Skin cancer. Dostupno na: <http://www.cancer.org.au/about-cancer/types-of-cancer/skin-cancer.html> (poslednji put pristupljeno 01. aprila 2019).

Carbonare D, Innamorati G, Valenti M. Transcription factor Runx2 and its application to bone tissue engineering. *Stem Cell Rev.* 8: 891-7, 2012.

Clark G. *Staining Procedures*, 3rd ed., Williams & Wilkins, Baltimore, strana 140, 1973.

Clark C, Furniss M, Mackay-Wiggan J. Basal cell carcinoma: an evidence-based treatment update. *Am J Clin Dermatol.* 15(3): 197-216, 2014.

Clarkson, B.D. & Fried, J. Changing concepts of treatment in acute leukemia. *Med Clin North Am.* 55: 561-600, 1971.

Clayton E, Doupé D, Klein A, Winton D, Simons B, Jones P. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature.* 446(7132): 185-9, 2007.

Cohen M. Perspectives on RUNX genes: An update. *Am J Med Genet A.* 149: 2629-46, 2009.

Collins A, Berry P, Hyde C, Stower M, Maitland N. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 65:10946-51, 2005.

Colgan S, Eltzschig H, Eckle T, Thompson L. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal.* 2: 351-60, 2006.

Cozzio A, Passegue E, Ayton P, Karsunky H, Cleary M, Weissman I. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev.* 17(24): 3029-35, 2003.

Cheng-hui L , Binlin W, Laura S, Susie B, Vidyasagar S, Chunyuan Z , Hugh B, Lin Z, Zhe P, Lingyan S, Robert A. A pilot study for distinguishing basal cell carcinoma from normal human skin tissues using visible resonance Raman spectroscopy. *J Cancer Metastasis Treat.* 5: 4, 2019.

Christenson L, Borrowman T, Vachon C, Tollefson M, Otley C, Weaver A, Roenigk R. Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. *JAMA.* 294(6): 681-90, 2005.

Cronkite E. Acute leukemia: is there a relationship between cell growth kinetics and response to chemotherapy? *Proc Natl Cancer Conf.* 6: 113–7, 1970.

Crowson A. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol.* 19(2): 127, 2006.

D

Dandurand M, Petit T, Martel P, Guillot B. Management of basal cell carcinoma in adults: Clinical practice guidelines. *Eur J Dermatol.* 16: 394-401, 2006.

de Thé H. Differentiation therapy revisited. *Nat Rev Cancer.* 18(2):117-27, 2018.

Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer.* 5(4): 275-84, 2005.

Degos L, Dombret H, Chomienne C, Daniel M, Micléa J, Chastang C, Castaigne S, Fenaux P. All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 85(10): 2643-53, 1995.

Deng W, Han Q, Liao L. CH: long-term distribution of adult stem cells in different tissues after transplantation. *Stem Cell Cell Ther.* 1: 62–65, 2003.

Ding D, Liu H, Chu T. Interleukin-6 from Ovarian Mesenchymal Stem Cells Promotes Proliferation, Sphere and Colony Formation and Tumorigenesis of an Ovarian Cancer Cell Line SKOV3. *J Cancer.* 7(13): 1815-23, 2016.

Dou J, Pan M, Wen P, Li Y, Tang Q, Chu L, Zhao F, Jiang C, Hu W, Hu K, Gu N. Isolation and identification of cancer stem-like cells from murine melanoma cell lines. *Cell Mol Immunol.* 4(6): 467-72, 2007.

Dourmishev L, Rusinova D, Botev I. Clinical variants, stages, and management of basal cell carcinoma. *Indian Dermatol Online J.* 4(1): 12-7, 2013.

Dubas L, Ingraffea A. Nonmelanoma skin cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 21(1): 43-53, 2013.

Dukers D, van Galen J, Giroth C, Jansen P, Sewalt R, Otte A, Kluin-Nelemans H, Meijer C, Raaphorst F. Unique polycomb gene expression pattern in Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's lymphoma-derived cell lines. *Am J Pathol.* 164: 873–81, 2004.

Durand R, Raleigh J. Identification of nonproliferating but viable hypoxic tumor cells in vivo. *Cancer Res* 58: 3547–50, 1998.

E

Eccles S, Box C, Court W. Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery. *Biotechnol Ann Rev.* 11: 391-421, 2005.

Eder K , Dietzel S , Harreus U , Mack B , Guhlich M , Eggert C , Berghaus A , Gires O , Canis M. An Intravital Multiphoton Microscopy Model for visualization of tumor cell dissemination and lymphatic vasculature. *Cancer Research Frontiers.* 1(2): 200-7, 2015.

Epstein E. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer.* 8(10): 743-54, 2008.

Epstein E. Mommy - where do tumors come from? *J Clin Invest.* 121(5): 1681-3, 2011.

Eramo A, Lotti F, Sette G, Pillozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 15(3): 504-14, 2008.

Ezeh U, Turek P, Reijo R, Clark A. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer.* 104: 2255-65, 2005.

F

Flaxman B. Growth in vitro and induction of differentiation in cells of basal cell cancer. *Cancer Res.* 32(3): 462-9, 1972.

Flohil S, Seubring I, van Rossum M, Coebergh J, de Vries E, Nijsten T. Trends in Basal cell carcinoma incidence rates: a 37-year Dutch observational study. *J Invest Dermatol.* 133(4): 913-8, 2013.

Frank N, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser A, Gasser M, Sayegh M, Sadee W, Frank M. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 65(10): 4320-33, 2005.

Frank I, Heim M, Jakob M, Barbero A, Schäfer D, Bendik I, Dick W, Heberer M, Martin I. Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *J Cell Biochem.* 85(4): 737-46, 2002.

Friedl P, Broecker E. The biology of cell locomotion within 3-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 57: 41-64, 2000.

Friedl P, Hegerfeldt Y, Tusch M. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol.* 48: 441-9, 2004.

Friedl P, Wolf K. Tumor-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 3(5): 362-74, 2003.

G

Gailani M, Bale S, Leffell D, DiGiovanna J, Peck G, Poliak S, Drum M, Pastakia B, McBride O, Kase R, Greene M, Mulvihill J, Bale A. Developmental defects in Gorlin syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9. *Cell.* 69(1): 111-7, 1992.

Gailani M, Bale A. Developmental genes and cancer: role of patched in basal cell carcinoma of the skin. *J Natl Cancer Inst.* 89(15): 1103-9, 1997.

Gallagher R, Bajdik C, Fincham S, Hill G, Keefe A, Coldman A, McLean D. Chemical exposures, medical history, and risk of squamous and basal cell carcinoma of the skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 5(6): 419-24, 1996.

Geisse J, Rich P, Pandya A, Gross K, Andres K, Ginkel A, Owens M. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: a double-blind, randomized, vehicle-controlled study. *J Am Acad Dermatol.* 47(3): 390-8, 2002.

Ghazizadeh S, Taichman, L. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J.* 20: 1215–22, 2001.

Gioanni J, Farges M, Duplay H, Hery M, Zanghellini E, Schneider M, Mazeau C, Namer M, Courdi A. In vitro clonogenicity in relation to kinetic and clinicopathological features of breast cancer. *Bull Cancer* 75: 285–90, 1988.

Glinsky G, Berezovska O, Glinskii A. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Clin Invest.* 115: 1503-21, 2005.

Gniadecka M, Wulf H, Mortensen N, Faurskov O, Christensen D. Diagnosis of Basal Cell Carcinoma by Raman Spectroscopy. 28(2-3): 125-9, 1997.

Grachtchouk V, Grachtchouk M, Lowe L, Johnson T, Wei L, Wang A, de Sauvage F, Dlugosz A. The magnitude of hedgehog signaling activity defines skin tumor phenotype. *EMBO J.* 22(11): 2741-51, 2003.

Grando S, Schofield O, Skubitz A, Kist D, Zelickson B, Zachary C. Nodular basal cell carcinoma in vivo vs in vitro. Establishment of pure cell cultures, cytomorphologic characteristics, ultrastructure, immunophenotype, biosynthetic activities, and generation of antisera. *Arch Dermatol.* 132(10): 1185-93, 1996.

Gravina G, Mancini A, Colapietro A, Vitale F, Vetusch A, Pompili S, Rossi G, Marampon F, Richardson P, Patient L, Patient L, Burbidge S, Festuccia C. The novel CXCR4 antagonist, PRX177561, reduces tumor cell proliferation and accelerates cancer stem cell differentiation in glioblastoma preclinical models. *Tumour Biol.* 39(6): 1010428317695528, 2017.

Grunwald F, Pakos E, Bender H, Menzel C, Otte R, Palmedo H, Pfeifer U, Biersack H. Redifferentiation therapy with retinoic acid in follicular thyroid cancer. *J Nucl Med.* 39(9): 1555–8, 1998.

Gorlin R. Nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatol Clin N Am.* 13: 113–25, 1995.

Gu G, Yuan J, Wills M, Kasper S. Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo. *Cancer Res.* 67(10): 4807-15, 2007.

Gulleth Y, Goldberg N, Silverman R, Gastman B. What is the best surgical margin for a Basal cell carcinoma: a meta-analysis of the literature. *Plast Reconstr Surg.* 126(4): 1222-31, 2010.

Gupta A, Cao W, Chellaiah M. Integrin avb3 and CD44 pathways in metastatic prostate cancer cells support osteoclastogenesis via a Runx2/Smad 5/receptor activator of NF- κ B ligand signaling axis. *Mol Cancer.* 11: 66, 2012.

Gustaitytè-Larsen D, Illum P. Non-melanoma skin cancer of the auricle is treated according to national guidelines. *Dan Med J.* 60(3): 4587-91, 2013.

H

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulous P, Gailani M, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden A, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell D, Gerrard B, Goldstein A, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B, Bale A. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell.* 85(6): 841-51, 1996.

Han J, Fujisawa T, Husain S, Puri R. Identification and characterization of cancer stem cells in human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 14: 173, 2014.

Hanna H, Mir L, Andre F. In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem Cell Res Ther.* 9(1): 203, 2018.

Hausman G, Champion D, McNamara J, Richardson R, Martin R. Adipose tissue development in the fetal pig after decapitation. *J Anim Sci.* 53(6): 1634-44, 1981.

Helsing P, Kramer P, Haugstvedt A, Aarebrot S, Todal A, Moseng D, Loeb M. Surgical treatment of basal cell carcinoma. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 124(21): 2740-2, 2004.

Hemmati H, Nakano I, Lazareff J, Masterman-Smith M, Geschwind D, Bronner-Fraser M, Kornblum H. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(25): 15178-83, 2003.

Hernandez A, Hibbs M, Postlethwaite A. Establishment of basal cell carcinoma in culture: evidence for a basalcell carcinoma-derived factor(s) which stimulates fibroblasts to proliferate and release collagenase. *J Invest Dermatol.* 85(5): 470-5, 1985.

High A, Zedan W. Basal cell nevus syndrome. *Curr Opin Oncol.* 17(2): 160-6, 2005.

Ho M, Ng A, Lam S, Hung J. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res.* 67: 4827-33, 2007.

Hoffmann H, Beumer T, Rahman S, McCabe L, Banerjee C, Aslam F, Tiro J A, van Wijnen A, Stein J, Stein G, Lian J. Bone tissue-specific transcription of the osteocalcin gene: role of an activator osteoblast-specific complex and suppressor hox proteins that bind the OC box. *J Cell Biochem.* 61: 310–324, 1996.

Hollestein L, Vries E, Aarts M, Schroten C, Nijsten T. Burden of disease caused by keratinocyte cancer has increased in The Netherlands since 1989. *J Am Acad Dermatol,* 71(5): 896-903, 2014.

Holtz KM, Kantrowitz ER. The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Lett.* 462: 7–11, 1999.

Horwitz R, Webb D. Cell migration. *Curr Biol.* 13: 756-9, 2003.

Howell J, Caro M. The basal cell nevus. *Arch Dermatol.* 79: 67–80, 1959.

Hsu S, Liang S, Hsueh A. Characterization of two LGR genes homologous to gonadotropin and thyrotropin receptors with extracellular leucine-rich repeats and a G protein-coupled, seven-transmembrane region. *Mol Endocrinol.* 12(12): 1830-45, 1998.

Hutchin M, Kariapper M, Grachtchouk M, Wang A, Wei L, Cummings D, Liu J, Michael L, Glick A, Dlugosz A. Sustained Hedgehog signaling is required for basal cell carcinoma proliferation and survival: conditional skin tumorigenesis recapitulates the hair growth cycle. *Genes Dev.* 19(2): 214-23, 2005.

I

Iczkowski K. Cell adhesion molecule CD44: its functional roles in prostate cancer. *Am J Transl Res.* 3(1): 1-7, 2010.

International Classification of Diseases for Oncology, World health organization, poslednji put revidirano 2011. godine.

J

Jacob A. Observations respecting an ulcer of peculiar character, which attacks the eyelids and other parts of the face. *Dublin Hospital Rep Commun Med Surg.* 4: 232–9, 1827.

Jaiswal S, Traver D, Miyamoto T, Akashi K, Lagasse E, Weissman I. Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(17): 10002-7, 2003.

Jensen A, Birch-Johansen F, Olesen A, Christensen J, Tjønneland A, Kjær SK. Intake of alcohol may modify the risk for non-melanoma skin cancer: results of a large Danish prospective cohort study. *J Invest Dermatol.* 132(12): 2718-26, 2012.

Jensen U, Yan X, Triel C, Woo S, Christensen R, Owens D. A distinct population of clonogenic and multipotent murine follicular keratinocytes residing in the upper isthmus. *J. Cell Sci.* 121(5): 609–17, 2008.

Jermyn M, Desroches J, Aubertin K, St-Arnaud K, Madore W, De Montigny E, Guiot M, Trudel D, Wilson B, Petrecca K, Leblond F. A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology. *Physics in Medicine and Biology.* 61(23): 370–400, 2016.

Jeter C, Yang T, Wang J, Chao H, Tang D. Concise Review: NANOG in Cancer Stem Cells and Tumor Development: An Update and Outstanding Questions. *Stem Cells.* 33(8): 2381–90, 2015.

Jiang J, Zhang Y, Chuai S, Wang Z, Zheng D, Xu F, Zhang Y, Li C, Liang Y, Chen Z. Trastuzumab (herceptin) targets gastric cancer stem cells characterized by CD90 phenotype. *Oncogene.* 31(6): 671-82, 2012.

Jin X, Jin X, Kim H. Cancer stem cells and differentiation therapy. *Tumour Biol.* 39(10): 1010428317729933, 2017.

Johnson R, Rothman A, Xie J, Goodrich L, Bare J, Bonifas J, Quinn A, Myers R, Cox D, Epstein E Scott M. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*. 272(5268): 1668-71, 1996.

K

Kalderon D. The mechanism of hedgehog signal transduction. *Biochem Soc Trans*. 33(6): 1509-12, 2005.

Kamstrup M, Gniadecki R, Skovgaard G. Putative cancer stem cells in cutaneous malignancies. *Exp Dermatol*. 16(4): 297-301, 2007.

Karhadkar S, Bova G, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs J, Berman D, Beachy P. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*. 431(7009): 707-12, 2004.

Kim H, Sohng S, Shin D, Choi J, Bae Y. Immunohistochemical expression of cytokeratin 15, cytokeratin 19, follistatin, and Bmi-1 in basal cell carcinoma. *Int J Dermatol*. 55(1): 36-44, 2016.

Kim H, Im G. Combination of transforming growth factor-beta2 and bone morphogenetic protein 7 enhances chondrogenesis from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 15(7): 1543-51, 2009.

Kim J, Yoon S, Kim C, Joo J, Moon S, Choe I, Choe Y, Kim J. The Bmi-1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins. *Cancer Lett*. 203: 217-24, 2004.

Kim M, Kim M, Kim K, Park M, Jeong J, Park S, Ji Y, Kim K, Lee T, Ryu P, Kang J, Lee Y. In vivo monitoring of CD44+ cancer stem-like cells by γ -irradiation in breast cancer. *Int J Oncol*. 48(6): 2277-86, 2016.

Kimyai-Asadi A, Alam M, Goldberg L, Peterson S, Silapunt S, Jih M. Efficacy of narrow-margin excision of well-demarcated primary facial basal cell carcinomas. *J Am Acad Dermatol*. 53(3): 464-8, 2005.

Kochanowska I, Chaberek S, Wojtowicz A, Marczyński B, Włodarski K, Dytko M, Ostrowski K. Expression of genes for bone morphogenetic proteins BMP-2, BMP-4 and BMP-6 in various parts of the human skeleton. *BMC Musculoskelet Disord*. 8: 128, 2007.

Koningstein J. Introduction to the Theories of the Raman Effect. Dordrecht, D. Reidel Publishing Co., 1971.

Køster B, Thorgaard C, Clemmensen I, Philip A. Sunbed use in the Danish population in 2007: a cross-sectional study. *Prev Med.* 48(3): 288-90, 2009.

Kregel S, Kiriluk K, Rosen A, Cai Y, Reyes E, Otto K, Tom W, Paner G, Szmulewitz R, Vander Griend D. Sox2 is an androgen receptor-repressed gene that promotes castration-resistant prostate cancer. *PLoS One.* 8(1): 53701, 2013.

Kricker A, Armstrong B, English D, Heenan P. A dose-response curve for sun exposure and basal cell carcinoma. *Int J Cancer.* 60(4): 482-8, 1995.

Krishnamurthy S, Nör J. Orosphere assay: a method for propagation of head and neck cancer stem cells. *Head Neck.* 35(7): 1015–21, 2012.

Krompecher E. Der drüsenartige Oberflächenepithelkrebs. Carcinoma epitheliale adenoides. *Beitr z path Anat u z adg Path.*28: 1–41, 1900.

Krompecher E. *Der Basalzellenkrebs.* Jena: Gustav Fischer; 1903.

Kuijpers D, Thissen M, Neumann M. Basal cell carcinoma: treatment options and prognosis, a scientific approach to a common malignancy. *Am J Clin Dermatol.* 3(4): 247-59, 2002.

Kundrotas G. Surface markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Acta Med Litu.* 19: 75–9, 2012.

L

Lalević-Vasić B, Meedenica Lj, Nikolić M. Dermatovenerologija sa propedevtikom. Udžbenik za student medicine, šesto izdanje, 2003.

Lajtha L. Stem cell concepts. *Differentiation.* 14: 23–34, 1979.

Laloo M, Sood S. Head and neck basal cell carcinoma: treatment using a 2-mm clinical excision margin. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 25(5): 370-3, 2000.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri M, Dick J. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 367(6464): 645–8, 1994.

Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol.* 810: 120-40, 2014.

Leong K, Karsan A. Recent insights into the role of notch signaling in tumorigenesis. *Blood.* 107: 2223–33, 2006.

Levanat S, Musani V, Komar A, Oreskovic S. Role of the hedgehog/patched signaling pathway in oncogenesis: a new polymorphism in the PTCH gene in ovarian fibroma *Ann N Y Acad Sci.* 1030: 134-43, 2004.

Levi B, Hyun J, Nelson E, Li S, Montoro D, Wan D, Jia F, Glotzbach J, James A, Lee M, Huang M, Quarto N, Gurtner G, Wu J, Longaker M. Nonintegrating knockdown and customized scaffold design enhances human adipose-derived stem cells in skeletal repair. *Stem Cells.* 29(12): 2018-29, 2011.

Levy V, Lindon C, Zheng Y, Harfe B, Morgan, B. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J.* 21(7): 1358–66, 2007.

Li C, Heidt D, Dalerba P, Burant C, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke M, Simeone D. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67(3): 1030-7, 2007.

Li G, Zheng B, Meszaros L, Vella J, Usas A, Matsumoto T, Huard J. Identification and characterization of chondrogenic progenitor cells in the fascia of postnatal skeletal muscle. *J Mol Cell Biol.* 3(6): 369–77, 2011.

Li Y, Lv Z, He G, Wang J, Zhang X, Lu G, Ren X, Wang F, Zhu X, Ding Y, Liao W, Ding Y, Liang L. The SOX17/miR-371-5p/SOX2 axis inhibits EMT, stem cell properties and metastasis in colorectal cancer. *Oncotarget.* 6: 9099–112, 2015.

Li Y, Dong M, Kong F, Zhou J, Liang D, Xue H. MicroRNA-371-5p targets SOX2 in gastric cancer. *Oncotarget.* 7: 31993–2005, 2016.

Lichter M, Karagas M, Mott L, Spencer S, Stukel T, Greenberg E. Therapeutic ionizing radiation and the incidence of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. The New Hampshire Skin Cancer Study Group. *Arch Dermatol.* 136(8): 1007-11, 2000.

Ling G, Chen D, Wang B, Zhang L. Expression of the pluripotency markers Oct3/4, Nanog and Sox2 in human breast cancer cell lines. *Oncol Lett.* 4: 1264–8, 2012.

Liu S, Gong Z, Chen M, Liu B, Bian D, Wu K. Lgr5-positive cells are cancer stem cells in skin squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 35(11): 11605-12, 2014.

Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods.* 25(4): 402-8, 2001.

Lo J, Snow S, Reizner G, Mohs F, Larson P, Hruza G. Metastatic basal cell carcinoma: report of twelve cases with a review of the literature. *J Am Acad Dermatol.* 24(5): 715-9, 1991.

Lobo N, Shimono Y, Qian D, Clarke M. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23: 675-99, 2007.

Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 166(5): 1069-80, 2012.

Low M, Kincade P. Phosphatidylinositol is the membrane-anchoring domain of the Thy-1 glycoprotein. *Nature.* 318: 62–4, 1985.

Lucas R, McMichael A, Armstrong B, Smith W. Estimating the global disease burden due to ultraviolet radiation exposure. *Int J Epidemiol.* 37(3): 654-67, 2008.

M

Mallory F. Recent progress in the microscopic anatomy and differentiation of cancer. *JAMA.* 55(18): 1513-16, 1910.

Manfredi M, Vescovi P, Bonanini M, Porter S. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: A review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 33(2): 117–24, 2004.

McCormack C, Kelly J, Dorevitch A. Differences in age and body site distribution of the histological subtypes of basal cell carcinoma. A possible indicator of differing causes. *Arch Dermatol.* 133(5): 593-6, 1997.

McCusker M, Basset-Seguin N, Dummer R, Lewis K, Schadendorf D, Sekulic A, Hou J, Wang L, Yue H, Hauschild A. Metastatic basal cell carcinoma: prognosis dependent on anatomic site and spread of disease. *Eur J Cancer.* 50(4): 774-83, 2014.

Meng H, Zheng P, Wang X, Liu C, Sui H, Wu S, Zhou J, Ding Y, Li J. Over-expression of Nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther.* 9(4): 295-302, 2010.

Mercati F, Pascucci L, Ceccarelli P, Dall'Aglio C, Pedini V, Gargiulo A. Expression of mesenchymal stem cell marker CD90 on dermal sheath cells of the anagen hair follicle in canine species. *Eur J Histochem.* 53(3): 159-66, 2009.

Ming J, Roessler E, Muenke M. Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway. *Mol Med Today.* 4(8): 343-9, 1998.

Moore M, Williams N, Metcalf D. In vitro colony formation by normal and leukemic human hematopoietic cells: characterization of the colony-forming cells. *J Natl Cancer Inst.* 50(3): 603-23, 1973.

Moriwaki S, Ray S, Tarone R, Kraemer K, Grossman L. The effect of donor age on the processing of UV-damaged DNA by cultured human cells: reduced DNA repair capacity and increased DNA mutability. *Mutat Res.* 364(2): 117-23, 1996.

Mosterd K, Krekels G, Nieman F, Ostertag J, Essers B, Dirksen C, Steijlen P, Vermeulen A, Neumann H, Kelleners-Smeets N. Surgical excision versus Mohs' micrographic surgery for primary and recurrent basal-cell carcinoma of the face: a prospective randomised controlled trial with 5-years' follow-up. *Lancet Oncol.* 9(12): 1149-56, 2008.

Mou W, Xu Y, Ye Y, Chen S, Li X, Gong K, Liu Y, Chen Y, Li X, Tian Y, Xiang R, Li N. Expression of Sox2 in breast cancer cells promotes the recruitment of M2 macrophages to tumor microenvironment. *Cancer Lett.* 358(2): 115–123, 2015.

N

Naini F, Nesari K, Mahdavi N, Derakhshan S. OCT-4 Is a Good Predictive Biomarker for Local Recurrence in Head and Neck Basal Cell Carcinoma. *J Islam Dent Assoc Iran.* 29(2): 58-63, 2017.

Naor D, Wallach-Dayana S, Zahalka M, Sionov R. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol.* 18(4): 260–7, 2008.

Nelson, M, Short A, Cole S, Gross A, Winter J, Eubank T, Lannutti J. Preferential, enhanced breast cancer cell migration on biomimetic electrospun nanofiber 'cell highways'. *BMC cancer*. 14: 825, 2014.

Nijssen A, Bakker Schut T, Heule F, Caspers P, Hayes D, Neumann M, Puppels G. Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy. *J Invest Dermatol*. 119(1): 64-9, 2002.

Niessen K, Karsan A. Notch signaling in the developing cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 293(1): 1-11, 2007.

Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 95(3): 379-91, 1998.

NIH NCI skin cancer treatment for health professionals. Dostupno na: <http://www.cancer.gov/types/skin/hp/skin-treatment-pdq> (poslednji put pristupljeno 18. Novembar 2018. god).

Nishigori C. Current concept of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci*. 14(9): 1713-21, 2015.

Nowell P. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 194(4260): 23-8, 1976.

O

Ohno M, Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J Immunol Methods*. 145(1-2): 199-203, 1991.

Okamoto I, Kawano Y, Murakami D, Sasayama T, Araki N, Miki T, Wong A, Saya H. Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *J Cell Biol*. 155(5): 755-62, 2001.

Oldak M, Grzela T, Lazarczyk M, Malejczyk J, Skopinski P. Clinical aspects of disrupted Hedgehog signaling (Review). *Int J Mol Med*. 8(4): 445-52, 2001.

Olesen U, Bojesen S, Gehl J, Haedersdal M. Anticancer drugs and the regulation of Hedgehog genes GLI1 and PTCH1, a comparative study in nonmelanoma skin cancer cell lines. *Anticancer Drugs*. 28(10): 1106-17, 2017.

Otto F, Thornell A, Crompton T, Denzel A, Gilmour K, Rosewell I, Stamp G, Beddington R, Mundlos S, Olsen B, Selby P, Owen M. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 89: 765–71, 1997.

Owens T, Rogers R, Best S, Ledger A, Mooney A, Ferguson A, Shore P, Swarbrick A, Ormandy C, Simpson P, Carroll J, Visvader J, Naylor M. *Runx2* is a novel regulator of mammary epithelial cell fate in development and breast cancer. *Cancer Res*. 74: 5277–86, 2014.

P

Padgett J, Hendrix J. Cutaneous malignancies and their management. *Otolaryngol Clin North Am*. 34(3): 523-53, 2001.

Park S, Li T, Wu S, Li W, Qureshi A, Stampfer M, Cho E. Risk of second primary cancer associated with pre-diagnostic smoking, alcohol, and obesity in women with keratinocyte carcinoma. *Cancer Epidemiol*. 47: 106-13, 2017.

Peterson S, Eberl M, Vagnozzi A, Belkadi A, Veniaminova N, Verhaegen M, Bichakjian C, Ward N, Dlugosz A, Wong S. Basal cell carcinoma preferentially arises from stem cells within hair follicle and mechanosensory niches. *Cell Stem Cell*. 16(4): 400-12, 2015.

Pichardo-Velazquez P, Domínguez-Cherit J, Vega-Memije M, Moreno-Coutino G, Proy H. Surgical option for nonmelanoma skin cancer. *Int J Dermatol*. 43(2): 148–50, 2004.

Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti M, Daidone M. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*. 65(13): 5506-11, 2005.

Prince M, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf G, Kaplan M, Dalerba P, Weissman I, Clarke M, Ailles L. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(3): 973-8, 2007.

R

Raasch B, Buettner P, Garbe C. Basal cell carcinoma: histological classification and body-site distribution. *Br J Dermatol*. 155(2): 401-7, 2006.

- Rall C, Rustgi A. CD44 isoform expression in primary and metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 55(9): 1831–5, 1995.
- Ranjbar M, Ranjbar Z, Zahed M, Nikookar N. CD73 a novel marker for the diagnosis of benign and malignant salivary gland tumors. *J Clin Exp Dent.* 11(3): 213-18, 2019.
- Ren Z, Yuan Y, Ji T, Zhang C. CD73 as a novel marker for poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oncology Letters.* 12(1): 556–6, 2016.
- Registar za rak u Centralnoj Srbiji. Incidencija i mortalitet od raka u Centralnoj Srbiji. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”, 1999-2015.
- Reinisch C, Uthman A, Erovic B, Pammer J. Expression of BMI-1 in normal skin and inflammatory and neoplastic skin lesions. *J Cutan Pathol.* 34(2): 174-80, 2007.
- Reya T, Morrison S, Clarke M, Weissman I. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 414(6859): 105-11, 2001.
- Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 434(7035): 843-50, 2005.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi D, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 445(7123): 111-5, 2007.
- Robinson J, Rigel D, Amonette R. Trends in sun exposure knowledge, attitudes, and behaviors: 1986 to 1996. *J Am Acad Dermatol.* 37(2): 179-86, 1997.
- Robinson S, Zens M, Perry A, Spencer S, Duell E, Karagas M. Photosensitizing agents and the risk of non-melanoma skin cancer: a population-based case-control study. *J Invest Dermatol.* 133(8): 1950-5, 2013.
- Rot S, Taubert H, Bache M, T GreitherT, Würll P, Eckert A, Schubert J, Vordermark, Kappler D. A novel splice variant of the stem cell marker LGR5/GPR49 is correlated with the risk of tumor-related death in soft-tissue sarcoma patients. *BMC Cancer.* 11: 429, 2011.
- Rowe D, Carroll R, Day C. Long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: implications for patient follow-up. *J Dermatol Surg Oncol.* 15(3): 315-28, 1989.

Ruan J, Wei B, Xu Z, Yang S, Zhou Y, Yu M, Liang J, Jin K, Huang X, Lu P and Cheng H. Predictive value of Sox2 expression in transurethral resection specimens in patients with T1 bladder cancer. *Med Oncol.* 30(1): 445, 2013.

Ruiz-Villaverde R, Sanchez-Cano D, Burkhardt-Perez P, Sintes R. Has imiquimod 5% cream a role in the management of recurrent basal cell carcinoma? *Eur J Dermatol.* 19: 481-3, 2009.

S

Saalbach A, Haustein U, Anderegg U. A ligand of human thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 115(5): 882-8, 2000.

Sanchez-Camacho C, Rodriguez J, Ruiz J, Trousse F, Bovolenta P. Morphogens as growth cone signalling molecules. *Brain Res Brain Res Rev.* 49(2): 242-52, 2005.

Santos I, Barroso E, Bakker Schut T, Caspers P, Lanschot C, Choi D, van der Kamp M, Smits R, Doorn R et al. Raman spectroscopy for cancer detection and cancer surgery guidance: translation to the clinics. *Analyst.* 142(17): 3025–47, 2017.

Shaheen S, Ahmed M, Lorenzi F, Nateri A. Spheroid-Formation (Colonosphere) Assay for in Vitro Assessment and Expansion of Stem Cells in Colon Cancer. *Stem Cell Rev.* 12(4): 492-9, 2016.

Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, Hose D, Moreaux J, Klein B. Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochem Biophys Res Commun.* 383(2): 157-62, 2009.

Schubert J, Muller A. Basaliomas with invasion of bone: problems and prognosis. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 1(1): 44-6, 1997.

Scrivener Y, Grosshans E, Cribier B. Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. *Br J Dermatol.* 147(1): 41-7, 2002.

Sekulic A, Migden M, Oro A, Dirix L, Lewis K, Hainsworth J, Solomon J, Yoo S, Arron S, Friedlander P, Marmur E, Rudin C, Chang A, Low J, Mackey H, Yauch R, Graham R,

Reddy J, Hauschild A. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 366(23): 2171-9, 2012.

Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 51(1): 1-28, 2004.

Senbanjo L, Chellaiah M. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol.* 5: 18, 2017.

Shaikh M, Kala M, Nivsarkar M. CD90 a potential cancer stem cell marker and a therapeutic target. *Cancer Biomark.* 16(3): 301-7, 2016.

Shi F, Yu M, Zloty D, Bell R, Wang E, Akhoundsadegh N, Leung G, Haegert A, Carr N, Shapiro J, McElwee K. Notch signaling is significantly suppressed in basal cell carcinomas and activation induces basal cell carcinoma cell apoptosis. *Mol Med Rep.* 15(4): 1441-54, 2017.

Silva J, Nichols J, Theunissen T, Guo G, van Oosten A, Barrandon O, Wray J, Yamanaka S, Chambers I, Smith A. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell.* 138(4): 722-37, 2009.

Silverman M, Kopf A, Bart R, Grin C, Levenstein M. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 3: Surgical excision. *J Dermatol Surg Oncol.* 18(6): 471-6, 1992.

Singh S, Clarke I, Terasaki M, Bonn V, Hawkins C, Squire J, Dirks P. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63: 5821–28, 2003.

Sirard C, Lapidot T, Vormoor J, Cashman J, Doedens M, Murdoch B, Jamal N, Messner H, Addey L, Minden M, Laraya P, Keating A, Eaves A, Lansdorp P, Eaves C, Dick J.. Normaland leukemic SCID-repopulating cells (SRC) coexist in the bone marrow and peripheral blood from CML patients in chronic phase, whereas leukemic SRC are detected in blast crisis. *Blood.* 87(4): 1539–48, 1996.

Skellett A, Hafiji J, Greenber D, Wright K, Levell N. The incidence of basal cell carcinoma in the under-30s in the UK. *Clin. Exp Dermatol.* 37(3): 227-9, 2012.

Smeets N, Krekels G, Ostertag J, Essers B, Dirksen C, Nieman F, Neumann H. Surgical excision vs Mohs' micrographic surgery for basal-cell carcinoma of the face: randomised controlled trial. *Lancet*. 364(9447): 1766-72, 2004.

So P, Langston A, Daniallinia N, Hebert J, Fujimoto M, Khaimskiy Y, Aszterbaum M, Epstein E. Longerm establishment, characterization and manipulation of cell lines from mouse basal cell carcinoma tumors. *Exp Dermatol*. 15(9): 742-50, 2006.

Song L, Ye W, Cui Y, Lu J, Zhang Y, Ding N, Hu W, Pei H, Yue Z, Zhou G. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) is a biomarker for clear cell renal carcinoma stem-like cells. *Oncotarget*. 8(19): 31977-92, 2017.

Southam C, Brunschwig A. Quantitative studies of autotransplantation of human cancer. *Cancer*. 14: 971-78, 1960.

Spychala J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther*. 87: 161-73, 2000.

Srinivasan M, Bharali D, Sudha T1, Khedr M, Guest I, Sell S, Glinsky G, Mousa S. Downregulation of Bmi1 in breast cancer stem cells suppresses tumor growth and proliferation. *Oncotarget*. 8(24): 38731-42, 2017.

Staples M, Elwood M, Burton R, Williams J, Marks R, Giles G. Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust*. 184: 6-10, 2006.

Steding-Jessen M, Birch-Johansen F, Jensen A, Schüz J, Kjaer S, Dalton S. Socioeconomic status and non-melanoma skin cancer: a nationwide cohort study of incidence and survival in Denmark. *Cancer Epidemiol*. 34: 689-95, 2010.

Storm, E. Durinck S, de Sousa e Melo F, Tremayne J, Kljavin N, Tan C, Ye X, Chiu C, Pham T, Hongo J, Bainbridge T, Firestein R, Blackwood E, Metcalfe C, Stawiski EW2, Yauch R, Wu Y, de Sauvage F. Targeting PTPRK-RSPO3 colon tumours promotes differentiation and loss of stem-cell function. *Nature*. 529(7584): 97-100, 2016.

T

Tai M, Chang C, Kiupel M, Webster J, Olson L, Trosko J. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 26: 495-502, 2005.

Taipale J, Beachy P. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*. 411(6835): 349-54, 2001.

Tanese K, Fukuma M, Yamada T, Mori T, Yoshikawa T, Watanabe W, Ishiko A, Amagai M, Nishikawa T, Sakamoto M. G-protein-coupled receptor GPR49 is up-regulated in basal cell carcinoma and promotes cell proliferation and tumor formation. *Am J Pathol*. 173(3): 835-43, 2008.

Tang K, Dai Y, Tong M, Chan Y, Kwan P, Fu L, Qin Y, Tsao S, Lung H, Lung M, Tong D, Law S, Chan K, Ma S, Guan X. A CD90(+) tumor-initiating cell population with an aggressive signature and metastatic capacity in esophageal cancer. *Cancer Res*. 73(7): 2322-32, 2013.

Taylor G, Lehrer M, Jensen P, Sun T, Lavker R. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*. 102(4): 451-61, 2000.

Ten Seldam REJ, Helwig E. *Histological Typing Of Skin Tumours*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1974.

Thomas D, King A, Peat B. Excision margins for nonmelanotic skin cancer. *Plast Reconstr Surg*. 112(1): 57-63, 2003.

Tian H, Callahan C, DuPree K, Darbonne W, Ahn C, Scales S, de Sauvage F. Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(11): 4254-9, 2009.

Tobias S, Murphy G, Frank N, Yamaura K, Waaga-Gasser A, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan L, Weishaupt C, Fuhlbrigge R, Kupper T, Sayegh M, Frank M. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*. 451(7176): 345-349, 2008.

Trakatelli M, Morton C, Nagore E, Ulrich C, Del Marmol V, Peris K, Baset-seguin N. Update of the European guidelines for basal cell carcinoma management Developed by

the Guideline Subcommittee of the European Dermatology Forum. *Eur J Dermatol.* 24(3): 312-29, 2014.

Tseng Y, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, Tran TT, Suzuki R, Espinoza DO, Yamamoto Y, Ahrens MJ, Dudley AT, Norris AW, Kulkarni RN, Kahn CR. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature.* 454(7207): 1000-4, 2008.

Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry W, Rendl M, Fuchs E. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science.* 303(5656): 359-63, 2004.

V

Vander Lugt N, Domen J, Linders K, van Roon M, Robanus-Maandag E, te Riele H, van der Valk M, Deschamps J, Sofroniew M, van Lohuizen M. Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with targeted deletion of BMI1 proto-oncogene. *Genes Dev.* 8(7): 757-69, 1994.

Vantuchova Y, Curic R. Histological types of basal cell carcinoma. *Scripta Medica (BRNO).* 79 (5-6): 261-70, 2006.

Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, Pear W, Bernstein I. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nature Med.* 6(11): 1278-81, 2000.

Veltri A, Lang C, Lien W. Concise Review: Wnt Signaling Pathways in Skin Development and Epidermal Stem Cells. *Stem Cells.* 36(1): 22-35, 2018.

Videnović G, Miljuš D, Ilić D, Krasić D, Živković. Nonmelanoma skin cancer in the population of the city of Belgrade in the period 1999-2011. *Srp Arh Celok Lek.* 143(5-6): 290-95, 2015.

Vonlanthen S, Heighway J, Altermatt H, Gugger M, Kappeler A, Borner M, van Lohuizen M, Betticher DC. The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in nonsmall cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression. *Br J Cancer.* 84: 1372-6, 2001.

W

Walling H, Fosko S, Geraminejad P, Whitaker D, Arpey C. Aggressive basal cell carcinoma: presentation, pathogenesis, and management. *Cancer Metastasis Rev.* 23(3-4): 389-402, 2004.

Wang X, Ji X, Chen J, Yan D, Zhang Z, Wang Q, Xi X, Feng Y. SOX2 enhances the migration and invasion of ovarian cancer cells via Src kinase. *PLoS One.* 9(6): 99594, 2014.

Wang K, Chen D, Qian Z, Cui D, Gao L, Lou M. Hedgehog/Gli1 signaling pathway regulates MGMT expression and chemoresistance to temozolomide in human glioblastoma. *Cancer Cell Int.* 17: 117, 2017.

Watt F. Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. *Curr Opin Genet Dev.* 11(4): 410-7, 2001.

Wehner M, Shive M, Chren M, Han J, Qureshi A, Linos E. Indoor tanning and non-melanoma skin cancer: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 345: 5909, 2012.

Wei Q, Matanoski G, Farmer E, Hedayati M, Grossman L. DNA repair and aging in basal cell carcinoma: a molecular epidemiology study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(4): 1614-8, 1993.

Weiswald L, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia.* 17(1): 1-15, 2015.

Wennberg A, Larkö O, Stenquist B. Five-year results of Mohs' micrographic surgery for aggressive facial basal cell carcinoma in Sweden. *Acta Derm Venereol.* 79(5): 370-2, 1999.

Wilbertz T, Wagner P, Petersen K, Stiedl A, Scheble V, Maier S, Reischl M, Mikut R, Altorki N, Moch H, Fend F, Staebler A, Bass A, Meyerson M, Rubin M, Soltermann A, Lengerke C, Perner S. SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol.* 24(7): 944-953, 2011.

Williams K, Motiani K, Giridhar P, Kasper S. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Exp Biol Med (Maywood)*. 238(3): 324-38, 2013.

Wolf D, Zitelli J. Surgical margins for basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*. 123(3): 340-4, 1987.

Wong S, Reiter J. Wounding mobilizes hair follicle stem cells to form tumors. *Proc Natl Acad Sci*. 108(10): 4093-98, 2011.

Wulf G, Wang R, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner M, Andreeff M, Goodell M. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood*. 98(4): 1166-73, 2001.

Q

Quinn A, Campbell C, Healy E, Rees J. Chromosome 9 allele loss occurs in both basal and squamous cell carcinomas of the skin. *J Invest Dermatol*. 102(3): 300-3, 1994.

Y

Yamane N, Tsujitani S, Makino M, Maeta M, Kaibara N. Soluble CD44 variant 6 as a prognostic indicator in patients with colorectal cancer. *Oncology* 56: 232-8, 1999.

Yan M, Liu Q. Differentiation therapy: a promising strategy for cancer treatment. *Chin J Cancer*. 35:3, 2016.

Yan M, Zhang Y, He B, Xiang J, Wang Z, Zheng F, Xu J, Chen M, Zhu Y, Wen H, Wan X, Yue C, Yang N, Zhang W, Zhang J, Wang J, Wang Y, Li L, Zeng Y, Lam E, Hung M, Liu Q. IKK α restoration via EZH2 suppression induces nasopharyngeal carcinoma differentiation. *Nat Commun*. 5: 3661, 2014.

Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl Med*. 4(9): 1033-43, 2015.

Yan X, Luo H, Zhou X, Zhu B, Wang Y, Bian X. Identification of CD90 as a marker for lung cancer stem cells in A549 and H446 cell lines. *Oncol Rep*. 30(6): 2733-40, 2013.

Yanamoto S, Kawasaki G, Yamada S, Yoshitomi I, Kawano T, Yonezawa H, Rokutanda S, Naruse T, Umeda M. Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells. *Oral Oncol.* 47(9): 855-60, 2011.

Yamamoto Y, Sakamoto M, Fujii G, Tsuiji H, Kenetaka K, Asaka M, Hirohashi S. Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. *Hepatology.* 37(3): 528–33. 2003.

Yang M, Hsu D, Wang H, Wang H, Lan H, Yang W, Huang C, Kao S, Tzeng C, Tai S, Chang S, Lee O, Wu K. BMI1 is essential in TWIST1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol.* 12(10): 982-92, 2010.

Yang Z, Ho D, Ng M, Lau C, Yu W, Ngai P, Chu P, Lam C, Poon R, Fan S. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell.* 13(2): 153-66, 2008.

Yeom Y, Ha H, Balling R, Scholer H, Artzt K. Structure, expression and chromosomal location of the Oct-4 gene. *Mech Dev.* 35(3): 171–9, 1991.

Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I, Gonda K. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* 208(1): 64–76, 2006.

Yoon K, Gaiano N. NOTCH signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci.* 8(6): 709–15, 2005.

Youssef K, Van Keymeulen A, Lapouge G, Beck B, Michaux C, Achouri Y, Sotiropoulou P, Blanpain C. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat Cell Biol.* 12(3): 299-305, 2010.

Youssef M, Cuddihy A, Darido C. Long-Lived Epidermal Cancer-Initiating Cells. *Int J Mol Sci.* 18(7): 1369, 2017.

Z

Zakaria N, Yusoff N, Zakaria Z, Lim M, Baharuddin P, Fakiruddin K, Yahaya B. Human non-small cell lung cancer expresses putative cancer stem cell markers and exhibits the transcriptomic profile of multipotent cells. *BMC Cancer.* 15: 84, 2015.

Zhang S, Balch C, Chan M, Lai H, Matei , Schilder J, Yan P, Huang T, Nephew K. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res.* 68(11): 4311-20, 2008.

Zhao D, Pan C, Sun J, Gilbert C, Drews-Elger K, Azzam DJ, Picon-Ruiz M, Kim M, Ullmer W, El-Ashry D, Creighton C, Slingerland J. VEGF drives cancer-initiating stem cells through VEGFR-2/Stat3 signaling to upregulate Myc and Sox2. *Oncogene.* 34(24): 3107–19, 2015.

Zhou H, He H, Wang C, Zayzafoon M, Morrissey C, Vessella R, Marshall F, Chung L, Wang R. Human prostate cancer harbors the stem cell properties of bone marrow mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res.* 17(8): 2159-69, 2011.

Zhu H, Wu J, Cui X, Chen X. Bmi-1 serves as a potential novel marker for progression in human cutaneous basal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 10(8): 8928-35, 2017.

Zurawel R, Allen C, Wechsler-Reya R, Scott MP, Raffel C. Evidence that haploinsufficiency of Ptch leads to medulloblastoma in mice. *Genes Chromosomes Cancer.* 28(1): 77-81, 2000.

X

Xie J, Murone M, Luoh S, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas J, Lam C, Hynes M, Goddard A, Rosenthal A, Epstein E, de Sauvage F. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature.* 391(6662): 90–92, 1998.

Xie J, Aszterbaum M, Zhang X, Bonifas J, Zachary C, Epstein E, McCormick F. A role of PDGFR α in basal cell carcinoma proliferation. *PNAS.* 98(16): 9255-59, 2001.

Xu K, Moghal N, Egan E. NOTCH signaling in lung development and disease. *Adv Exp Med Biol.* 727: 89–98, 2012.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Maja S. Milošević rođena je 01.10.1988. godine u Paraćinu, Republika Srbija. Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2007. godine i diplomirala u martu 2013. godine sa prosečnom ocenom 8,57. Lekarski staž obavila je u stomatološkoj ordinaciji „Zubna kuća” u Paraćinu, a državni ispit položila je 2014. godine. Doktorske studije upisala je oktobra 2013. godine i položila sve ispite predviđene nastavnim planom i programom sa prosečnom ocenom 10,00. Od februara 2017. godine angažovana je kao istraživač pripravnik a od juna 2018. godine kao istraživač saradnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Vlade Republike Srbije, pod nazivom “Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije”, evidencioni broj 175075. Od školske 2015/2016. godine angažovana je u obavljanju praktične nastave na predmetu Opšta i oralna biohemija a od školske 2016/2017. godine u obavljanju praktične nastave na predmetu Javno zdravlje, Medicinska ekologija i Menadžment u stomatologiji u okviru integrisanih akademskih studija Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od juna 2019. godine zaposlena je kao asistent na nastavnom predmetu Javno zdravlje na Stomatološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Član je Srpskog lekarskog društva i Društva genetičara Srbije. Do sada je objavila 5 radova na SCI listi.

9. PRILOZI

Prilog 1.

SPISAK SKRAĆENICA

- ALP** (*Alkaline Phosphatase*)- alkalna fosfataza
- APC**- alofikocijanin
- BCK**- Bazocelularni karcinom
- BMP** (*Bone Morphogenic Protein*)- morfoogenetski protein kosti
- DMEM** (*Dulbecco's Modified Eagle' Medium*)
- DMSO**- dimetilsulfoksid
- DNK**- dezoksiribonukleinska kiselina
- EDTA** (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*)- etilendiamintetrasirćetna kiselina
- EGF** (*epidermal growth factor*)- epidermalni faktor rasta
- FITC** (*fluorescein isothiocyanate*)- fluorecein izotiocijanat, fluorohrom
- FGF** (*fibroblast growth factor*)- faktor rasta fibroblasta
- GAPDH** – gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, *housekeeping* gen
- IL-6** -*interleukin 6*
- KMĆ**- kancerske matične ćelije
- KIĆ**- kancer inicirajuće ćelije
- MĆ**- matična ćelija
- MTT** - 4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid
- Oligo dT**- kratka sekvenaca od nekoliko deoksiribonukleotida
- PBS** (*Phosphate Buffered Saline*- azotonični rastvor fosfatnog pufera
- PE**- fikoeritrin
- PPAR- γ** - *peroksizom proliferator-aktivirajući receptor gamma*
- RNK**- ribonukleinska kiselina
- RT-PCR** (*Real Time Polymerase Chain Reaction*)- reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu
- RT** (*Reverse Transcription*)- reverzna transkripcija
- SCK**- Skvamocelularni karcinom
- TNF-alpha**- *tumor nekrosis faktor alfa*
- TGF-b**- *Transforming growth factor beta*

Prilog 2.

Stomatološki fakultet u Beogradu
KLINIK ZA MAKSILOFACIJALNU HIRURGIJU
Dr Subotića 4, Beograd
Telefon: (011) 2685-064; 2685-268

INFORMISANI PRISTANAK ZA UZIMANJE UZORKA TUMORSKOG I MARGINALNOG TKIVA BOLESNIKA SA BAZOCELULARNIM KARCINOMOM KOŽE LICA, VRATA I POGLAVINE U CILJU ISPITIVANJE PRISUSTVA TUMORSKIH MATIČNIH ĆELIJA U TUMORSKOM I MARGINALNOM TKIVU OKO BAZOCELULARNOG KARCINOMA KOŽE LICA.

A. Kratak opis

Istraživanje je usmereno ka otkrivanju prisustva tumorskih matičnih ćelija u tumorskom i graničnom tkivu oko bazocelularnog karcinoma, što može biti uzrok recidiva ove vrste tumora. Da bi se ovo istraživanje sprovelo, neophodno je da se sakupi određeni broj bioloških uzoraka tumorskog i marginalnog tkiva, kliničkih podataka, informacija o načinu života ispitanika i histopatoloških nalaza ovih uzoraka.

B. Materijal i metode

Sakupljaće se biološki uzorci tumorskog i marginalnog tkiva. Uzorci će biti uzeti hirurškom ekscizijom lezije sa okolnim graničnim tkivom, nakon čega će se vršiti histopatološka verifikacija i klasifikacija promene. Iz ovih uzoraka će zatim biti izolovana genomska DNK i RNK i vršiće se zasejavanje ćelija. Za kontrolne uzorke biće uzet bris sluznice svih pacijenata. Kontrolni pregledi u svrhu studije sprovodiće se nakon 3, 6 i 12 meseci od hirurške intervencije.

Lični i klinički podaci biće dobijeni direktno od ispitanika. Pacijenti koji budu učestvovali u studiji imaće pravo da se informišu o rezultatima koji su dobijeni

zahvaljujući njihovim uzorcima biološkog materijala, uz konsultaciju genetičara ili lekara-onkologa, ukoliko to bude neophodno.

Svi uzorci biološkog materijala, kao i podaci ispitanika biće čuvani u šifrovanoj formi. Samo ograničen broj istraživača/tehničara će imati pristup ovoj biobanci i biće obavezni da poštuju tajnost podataka.

Informacije o pacijentima će biti strogo poverljive i nikada neće biti dostupne javnosti. Publikovanje rezultata ove studije uključuje poštovanje anonimnosti pacijenata.

C. Informacija za pacijenta

Ova studija ima za cilj da otkrije prisustva tumorskih matičnih ćelija u tumorskom i graničnom tkivu oko bazocelularnog karcinoma kože lica, vrata i poglavine. Ranija istraživanja su pokazala da se recidivi tumora javljaju i u slučajevima potpunog uklanjanja tumorskog tkiva uključujući i deo preporučene širine marginalnog tkiva. Zbog mogućnosti prisustva tumorskih matičnih ćelija, čije prisustvo nije moguće dijagnostikovati mikroskopskim pregledom tkiva, a koje mogu biti uzrok recidiva, potrebno je sprovesti ovo istraživanje.

Uzorci biološkog materijala podrazumevaju uzimanje dela tumorskog tkiva sa okolnim marginalnim tkivom, tokom rutinskog terapijskog postupaka. Iz biološkog materijala će se daljim laboratorijskim postupcima izolovati nasledni materijal u vidu nukleinskih kiselina (DNK) i ribonukleinske kiseline (RNK) i vršiti zasejavanje ćelija. Uz gore pomenuti biološki materijal, od pacijenata uključenih u istraživanje će se uzimati lični i klinički podaci. Ovi podaci će biti šifrovani i rezultati istraživanja će biti publikovani tako da pacijenti ostanu anonimni. U svakom momentu, pacijent koji učestvuje u istraživanju ima pravo da povuče svoj pristanak na učešće u istraživanju, što neće uticati na tok njegovog lečenja Klinici za Maksilofacijalnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Ukoliko se tokom istraživanja kod pacijenta/ispitanika pronađe promena u genima koja je povezana sa povećanim rizikom za nastanak kancera, biće mu omogućeno da dobije rezultat genetske analize i da prođe kroz proces genetskog savetovanja.

Veoma smo Vam zahvalni na Vašoj saglasnosti da učestvujete u ovom projektu i stojimo Vam na raspolaganju za sva vaša pitanja.

D. Saglasnost ispitanika u istraživanju

Dajem svoju saglasnost da se moj uzorak tumora i okolnog tkiva koristi u istraživačke svrhe.

Ovim izjavljujem da sam primio/la i razumeo/la objašnjenja koja se odnose na ciljeve i izvođenje samog istraživanja. Imao-la sam priliku da postavim pitanja koja se odnose na sve aspekte ovog istraživanja i da dobijem zadovoljavajuće odgovore na njih. Dodatno, dobio-la sam štampanu informaciju za pacijente.

Posle razmatranja svih dobijenih podataka, slažem se da učestvujem u istraživanju prisustva tumorskih matičnih ćelija u tumoru i marginalnom tkivu oko bazocelularnog karcinoma kože lica i da saradujem sa istraživačkim timom koji radi ovoj studiji. Imam pravo da odlučim da napustim istraživanje kada god to zaželim i/ili da zahtevam da se moj genetski materijal izolovan tkiva uništi.

Znam da moji lični podaci neće biti publikovani i da su strogo poverljivi, a prema svim međunarodnim propisima i našim zakonima o zaštiti podataka.

Dobio-la sam informaciju da nemam pravo da pretendujem na rezultate istraživanja u lične svrhe.

Slažem se/ Ne slažem* se da moje tkivo i izolovani genetski materijal budu upotrebljeni u drugim genetskim studijama pod istim uslovima, tj. posle dobijanja adekvatne informacije.

Slažem se sa upotrebom mojih ličnih podataka, kao i sa upotrebom rezultata dobijenih u ovom istraživanju, kako je to i predviđeno. Imam pravo da vidim svoje personalne podatke i da ih izmenim, ukoliko je to neophodno.

***izbrisati nepotrebno**

Ime i prezime pacijenta _____
(štampanim slovima)

Potpis pacijenta _____ Datum _____

Istraživač _____ dr Maja Milošević _____ Br. tel. 064 0159833
(štampanim slovima)

Potpis istraživača/lab tehničara _____ Datum _____

Prilog 3.

Изјава о ауторству

Потписани-а- Маја Милошевић

број индекса- 4013/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Изолација, култивација и карактеризација ћелија пореклом из тумора и туморске маргине пацијената са базоцелуларним карциномом у *ин-витро* условима

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду,

Потпис докторанда

Prilog 4.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора- **Маја Милошевић**

Број индекса- **4013/2013**

Студијски програм- **Базичне стоматолошке науке**

Наслов рада- **Изолација, култивација и карактеризација ћелија пореклом из тумора и туморске маргине пацијената са базоцелуларним карциномом у *ин-витро* условима**

Ментор- **Доц. др Милан Петровић, Проф. др Јелена Милашин**

Потписани/а _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду,

Потпис докторанда

Prilog 5.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Изолација, култивација и карактеризација ћелија пореклом из тумора и туморске маргине пацијената са базоцелуларним карциномом у *ин-витро* условима

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду,

Потпис докторанда

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.