

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Mirjana Z. Prvanović

**Analiza ekspresije ključnih molekula
PTEN/PI3K/mTOR signalnog puta i ABC
transportera kod trostruko negativnih karcinoma
dojke i njihova povezanost sa histopatološkim i
kliničkim parametrima**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Mirjana Z. Prvanović

**Expression analysis of key molecules of
PTEN/PI3K/mTOR signalling pathway and ABC
transporters in triple negative breast cancer and
their associaton with histopathological and clinical
parameters**

doctoral dissertation

Belgrade, 2022

Mentor

dr Nikola Tanić, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Dušanka Savić Pavićević, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Goran Brajušković, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr sci.med Zorka Milovanović, naučni savetnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

dr Svetislav Tatić, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Tatjana Ivković Kapić, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije i na Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Insistutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitetu u Beogradu u okviru projekta "Identifikacija molekularnih markera za predikciju progresije tumora, odgovora na terapiju i ishod bolesti" (III 41031 rukovodilac dr Nikola Tanić) finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Iskreno se zahvaljujem mentoru, dr Nikoli Taniću na ukazanom poverenju, savetima, razumevanju, korisnim kritikama, sugestiji i pomoći u svim fazama izrade ove doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem dr sci med. Zorki Milovanović na stručnoj pomoći, znanju i vremenu koje je podelila sa mnom tokom izrade teze i nesebičnoj pomoći tokom čitavog projektnog perioda prilikom pribavljanja uzoraka, kliničkih i histopatoloških podataka čime je u velikoj meri omogućila da ova studija bude urađena.

Zahvaljujem se dr Nasti Tanić na sugestijama, optimizmu, vremenu i pomoći posebno u finalnoj fazi izrade ove doktorske disertacije.

Za pomoć oko imunohistohemijske analize uzoraka, zahvaljujem se laborantkinji Vesni Petronjević i svim njenim saradnicima iz laboratorije za imunohistohemiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

Veliko hvala dr Milici Nedeljković na stručnoj pomoći tokom eksperimentalnog rada iz genetike.

Takođe, zahvaljujem se svim kolegama sa Instituta za patologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na bezrezervnoj podršci i kolegijalnosti koju su mi pružali tokom ovih zajedno provedenih godina.

Od srca se zahvaljujem svojim roditeljima Zoranu Škodriću i Vesni Gavrilović na podršci, požrtvovanju i odricanju tokom mog celokupnog školovanja.

Neizmerno hvala i sinu Lazaru na bezgraničnoj ljubavi, razumevanju i neiscrpoj energiji svih ovih godina.

Ovu tezu posvećujem svom ocu.

Analiza ekspresije ključnih molekula PTEN/PI3K/mTOR signalnog puta i ABC transportera kod trostruko negativnih karcinoma dojke i njihova povezanost sa histopatološkim i kliničkim parametrima

Sažetak

Trostruko negativni karcinomi dojke su klinički i genetički visoko heterogena grupa humanih maligniteta a zbog varijabilnog odgovora na terapiju predstavljaju jedan od glavnih izazova za savremeno društvo, istraživače i kliničare. TNBC ne ekspimiraju molekularne markere, estrogenski receptor-ER, progesteronski receptor-PR i receptor za humani epidermalni faktor rasta 2-HER2. Navedeni molekularni markeri su ključni za izbor prave terapije i u direktnoj su vezi sa kliničkim ponašanjem, rezistencijom na hemioterapeutike i ishodom bolesti.

PTEN/PI3K/Akt/mTOR (PAM) signalni put i prekomerna ekspresija ABC transportera mogu biti odgovorni za rezistenciju na hemoterapeutike. U vezi sa tim, cilj ove studije bio je utvrđivanje bioloških mehanizama koji su u osnovi rezistencije na hemioterapiju.

PAM signalni put je značajan za progresiju humanih tumora a abnormalna aktivacija PAM signalnog puta jedan je od najčešće poremećenih signalnih puteva u karcinomima dojke. Zato je jedan od osnovnih ciljeva ove studije bio ispitivanje imunoekspresionog profila PTEN, PI3K i mTOR protein i ABCB1 (MDR1) membranskog transportera i njihova povezanost i sa kliničkim i histopatološkim parametrima, tokom i ishodom bolesti.

U cilju utvrđivanja molekularnih mehanizama odgovornih za redukciju ili potpuni gubitak ekspresije PTEN proteina, urađena je analiza gubitka heterozigotnosti (LOH), RT-qPCR metodom, kao pretpostavljenog najčešćeg mehanizma inaktivacije *PTEN* tumor supresor gena. Ekspresioni profili PTEN, PI3K, mTOR proteina i MDR1 transportera dobijeni su imunohistohemijskom (IHC) analizom.

Pokazali smo da je suprimirana ili odsutna PTEN ekspresija sa visokom ekspresijom PI3K i mTOR proteina u asocijaciji sa lošim ishodom bolesti. Potvrdili smo da su *PTEN* delecije glavni mehanizam i uzrok smanjene ili odsutne ekspesije PTEN proteina. Takođe, pokazali smo da se agresivno ponašanje i češće javljanje metastaza TNBC tumora mogu pripisati značajno češćem gubitku heterozigotnosti (LOH) *PTEN* tumor supresor gena. Homozigotne delecije (ne i hemizigotne) bi mogle biti potencijalni marker metastatske bolesti i dobar indikator (pokazatelj) prognoze TNBC tumora. Pored toga, utvrdili smo da bi ABCB1 (MDR1) membranski transporter

mogao biti odgovoran za sticanje rezistencije na hemioterapiju TNBC tumora zbog češćeg višeg ekspresionog skora.

Smatramo da bi naši podaci mogli da doprinesu razvoju personalizovane medicine i uspostavljanju novih terapijskih pristupa. Drugim rečima, istovremeno delovanje na ciljne molekule PTEN/PI3K/mTOR signalnog puta i inhibicija MDR1 membranske pumpe, mogla bi biti logična strategija u budućem terapijskom pristupu kod pacijenata obolelih od TNBC.

Ključne reči: PTEN; PI3K; mTOR; proteinska ekspresija; delecije gena; trostruko negativan karcinom dojke; MDR1; rezistencija na terapiju

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija tumora

UDK broj:

Expression analysis of key molecules of PTEN/PI3K/mTOR signaling pathway and ABC transporters in triple negative breast cancer and their association with histopathological and clinical parameters

Abstract

Triple negative breast cancers are a clinically and genetically highly heterogeneous group of human tumours and, due to their variable response to therapy, represent one of the main challenges for modern society, researchers and clinicians. TNBCs do not express molecular markers, estrogen-ER, progesterone-PR, and human growth epidermal factor 2-HER2. These molecular markers are crucial for choosing the right therapy and are directly related to clinical behavior, resistance to chemotherapeutics and disease outcome. The PTEN/PI3K/Akt/mTOR (PAM) signaling pathway and overexpression of the ABCB1 transporter may be responsible for resistance to chemotherapeutics. In this regard, the aim of this study was to determine the biological mechanisms underlying chemotherapy resistance. The PAM signaling pathway is one of the most commonly disrupted signaling pathways in breast cancers. Therefore, one of the main objectives of this study was to examine the immunoeexpression profile of PTEN, PI3K and mTOR proteins and expression profile of ABCB1 (MDR1) membrane transporter and their association with clinical and histopathological parameters, course of disease and disease outcome. In order to determine the molecular mechanisms responsible for the reduction or complete loss of the *PTEN* gene allele, we performed LOH analysis as the presumed most common mechanism of *PTEN* tumour suppressor gene inactivation. Loss of heterozygosity (LOH) of the *PTEN* tumour suppressor gene was performed by RT-qPCR method and the expression profile of PTEN, PI3K, mTOR proteins and MDR1 transporter by IHC analysis. . Suppressed or absent PTEN expression with high expression of PI3K and mTOR proteins was found to be associated with poor disease outcome. *PTEN* deletions are a major cause of reduced or absent PTEN protein expression. It has been established that MDR1 could be responsible for multidrug resistance to TNBC tumour chemotherapy due to a more frequent and high expression score. It was found that aggressive behavior and more frequent occurrence of the TNBC tumor metastases can be attributed to significantly more frequent loss of heterozygosity (LOH) of the *PTEN* tumour suppressor gene. Homozygous (but not hemizygotic) could be a potential marker of metastasis formation and a good predictor (indicator) of TNBC outcome. These data could contribute to the development of personalized medicine and the establishment of new therapeutic approaches. In other words, a logical strategy in the therapeutic approach, could be simultaneously targeting molecular markers of PTEN/PI3K/mTOR signaling pathway with MDR1 membrane pump in treatment of TNBC patients.

Keywords: PTEN; PI3K; mTOR; protein expression; gene deletions; triple negative breast cancer; MDR1; multidrug resistance.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Tumor molecular biology

UDK number:

SKRAĆENICE

ABC transporteri, ATP vezujuća kasetna transporteri (eng. *ATP-binding cassette*)

ABCB1, gen koji kodira MDR1 protein (MDR1/PgP)

ABCC1, gen koji kodira MRP1 protein

ABCG2, gen koji kodira BCRP protein

Akt (PKB), protein kinaza B (eng. *protein kinase B*, Akt (PKB))

Bad, proapoptoski protein (eng. *Bcl-2 associated agonist of cell death*, Bad)

Bax, proapoptoski protein (eng. *Bcl-2 like protein 4*, BAX(Bcl2-like protein 4))

Bcl-2, član proteinske familije regulatora apoptoze (eng. *B cell lymphoma-2*, Bcl-2)

BL, karcinomi dojke slični bazalnom epitelu (eng. *basal like*, BL)

BCRP, protein rezistencije karcinoma dojke (eng. *breast cancer resistance protein*, BCRP)

BRCA1, tumor supresor gen od značaja u karcinomu dojke (eng. *breast cancer 1*, BRCA1)

Claudin 3, protein od značaja za prognozu u karcinomu dojke (eng. *Claudin 3*)

CDK, ciklin zavisne kinaze (eng. *cyclin-dependent kinase*, CDK)

CDK4/6, ciklin zavisne kinaze 4/6 (eng. *cyclin-dependent kinase*, CDK4/6)

CK4, Citokeratin 4

CK5/6, Citokeratin 5/6

CK6, Citokeratin 6

CK17, Citokeratin 17

CK18, Citokeratin 18

CK19, Citokeratin 19

CSC, kancereske matične ćelije (eng. *cancer stem cells*, CSC)

Ciklin D1, protein regulator ćelijskog ciklusa (eng. *Cyclin D1*)

DEPC, dietilpirokarbonat (eng. *diethylpyrocarbonate*, DEPC)

DCIS, duktalni karcinom in situ (eng. *ductal carcinoma in situ*, DCIS)

DFS, preživljavanje bez progresije bolesti (eng. *disease free survival*, DFS)

DNK, dezoksiribonukleinska kiselina

E2F, familija transkripcionih faktora ključnih u kontroli ćelijskog ciklusa (eng. *E2 factors*, E2F)

4EBP-1, translacioni faktor (eng. *eukaryote translation initiation factor 4E binding protein-1*, 4EBP-1)

E-Cadherin, tumor supresor gen od značaja u karcinomu dojke (eng. *E cadherin*)

EDTA, eilendiaminotetraacetat (eng. *Ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA)

EGCG, epigalatektin galat, sadrži katehin, antioksidant (eng. *Epigallocatechin gallate*, EGCG)

EGFR, receptor epidermalnog faktora rasta (eng. *epidermal growth factor receptor*, EGFR)

ER, estrogenski receptor (eng. *estrogen receptor*, ER)

FOX, geni regulatori familije transkripcionih faktora (eng. *forkhead box*, FOX)

FOXO, transkripcioni proteini FOX familije

GPCR, (eng. *G protein coupled receptor*, GPCR)

GSK, glikogen sintaza 3 (eng. *glycogen synthase 3*, GSK)

HER2, receptor za humani epidermalni factor rasta 2 (eng. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER2)

HIF-1 α , transkripcioni faktor (eng. *hypoxia inducible factor-1 apha*, HIF-1 α)

IDC, invazivni duktalni karcinomi (eng. *invasive ductal carcinoma*, IDC)

IGF, insulinu sličan faktor rasta (eng. *Insulin like growth factor*, IGF)

ILC, invazivni lobularni karcinom (eng. *invasive lobular carcinoma*, ILC)

IHC, imuhohistohemisjko bojenje (eng. *Immunohistochemistry*, IHC)

LAR, molekularni podtip karcinoma dojke sa ekspresijom androgenih receptora (eng. *luminal androgen receptor*, LAR)

LOH, gubitak heterozigotnosti (eng. *Loss of heterozygosity*, LOH)

MAPK, mitogenom aktivirane proteinske kinase (eng. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK)

MDR, rezistencija na višestruke lekove (eng. *multiple drug resistance*, MDR)

MDR1 (PgP), protein rezistencije na višestruke lekove tip 1, P glikoprotein (eng. *multidrug resistance protein 1, P-glycoprotein MDR1(PgP)*)

MMP, matriks metaloproteinaze (eng. *matrix metalloproteinase, MMP*)

MRP1, protein asociran sa rezistencijom na višestruke lekove tip 1 (eng. *multidrug resistance-associated protein 1, MRP1*)

mTOR, serin/treonin kinaza (eng. *mammalian target of rapamycin, mTOR*)

mTORC1 proteinski kompleks (eng. *mammalian target of rapamycin complex1, mTORC1*)

mTORC2 proteinski kompleks (eng. *mammalian target of rapamycin complex2, mTORC2*)

NBD, nukleotid vezujući domen (eng. *nucleotide-binding domain, NBD*)

NF-κB, nuklearni faktor, regulator genske transkripcije (eng. *nuclear factor kappa beta subunit, NF-κB*)

NF1, tumor supresor gen (eng. *neurofibromatosis type 1, NF1*)

NST, invazivni duktalni karcinom bez druge specifikacije (eng. *no special type, NST*)

OS, verovatnoća ukupnog preživljavanja (eng. *overall survival, OS*)

PAM, PTEN/ PI3K /AKT/mTOR signalni put

PARP, poli ADP riboza sintaza enzim (eng. *poly ADP-ribose polymerase 1, PARP*)

PDZ (eng. *postsynaptic density protein domain, PDZ*)

PEST, peptidne sekvence bogate aminokiselinama (eng. *peptide sequences rich in proline, glutamate, serine and threonine, PEST*)

PIK3CA, onkogen koji kodira katalitičku subjedinicu fosfatidilinozitol-4, 5-bisfosfat 3-kinaze (eng. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform, PIK3CA*)

PIKK, familija protein kinaza (eng. *phosphoinositide 3-kinase related protein kinase, PIKK*)

PIP2, fosfatidil inozitol 4,5 difosfat (eng. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP2*)

PIP3, fosfatidil-inozitol 3,4,5 trifosfata (eng. *phosphatidylinositol 3, 4,5-trisphosphate, PIP3*)

PCR, lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction, PCR*)

PDK1, fosfoinozimid zavisna kinaza, signalni protein (eng. *phosphoinositide dependent protein kinase, PDK1*)

PI3K, fosfatidilinozitol-4, 5-bisfosfat 3-kinaza (eng. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*, PI3K)

PKC, proteinaza C

PR, progesteronski receptor (eng. *progesterone receptor*, PR)

PTEN, fosfataza i tenzin homolog tumor supresor gen (eng. *phosphatase and tensin homolog*, PTEN)

PTHS, kancerski hamartoma sindrom (eng. *PTEN Hamartoma Tumor Syndromes*, PTEN)

PTP, tirozin specifična proteinska fosfataza (eng. *protein tyrosinphosphatase*, PTP)

RAS, citoplazmatski signalni protein (eng. *rat sarcoma*, RAS)

RAF, serin treonin kinaza (eng. *rapidly accelerated fibrosarcoma*, RAF)

Rb, retinoblastoma tumor supresor protein (eng. *retinoblastoma protein*, Rb)

RNase, ribonukleaza

RT-qPCR, kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (eng. *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*, RT-qPCR)

RTK, receptor tirozin kinaza (eng. *receptor tyrosine kinase*, RTK)

S6K-1, regulator translacije proteina (eng. *translation-regulating factors ribosomal S6 kinase-1*, S6K-1)

SC, matične ćelije (eng. *stem cells*, SC)

SDS, natrijum dodecil sulfat (eng. *Sodium dodecyl sulfate*, SDS)

SZO, Svetska zdravstvena organizacija

TE, pufer koji se rutinski koristi za čuvanje DNK, sadrži Tris i EDTA (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA)

TMD, transmembranski domen (eng. *transmembrane domen*, TMD)

TNBC, trostruko negativni karcinom dojke (eng. *triple negative breast cancer*, TNBC)

TSC1, tumor supresor gen tuberoznog skleroze kompleksa 1 (eng. *tuberous sclerosis complex 1*, TSC1)

TSC2, tumor supresor gen tuberoznog skleroze kompleksa 2 (eng. *tuberous sclerosis complex 2*, TSC2)

VEGF, vaskularni endotel faktor rasta(eng *vascular endothelial growth factor*, VEGF)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Karcinomi dojke	1
1.2. Klasifikacija karcinoma dojke – histopatološka i molekularna	2
1.3. Intratumorska heterogenost tumora dojke	6
1.4. Intertumorska heterogenost karcinoma dojke	10
1.5. PTEN/PI3K/AKT/mTOR signalni put	11
1.5.1. Mehanizmi inaktivacije <i>PTEN</i> tumor supresorskog gena	16
1.5.2. Građa i funkcija PTEN proteina	17
1.5.3. Građa i funkcija PI3K proteina	19
1.5.4. Građa i funkcija mTOR proteina	20
1.6. ABC transporteri	22
1.7. Povezanost PI3K/PTEN/AKT/mTOR signalniog puta i MDR 1 proteina	24
1.8. Rezistencija na terapiju- TNBC	26
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	29
3. MATERIJAL I METODE	30
3.1. Materijal	30
3.2. Metodologija rada	31
3.2.1. Ispitivani parametri trostrukonegativnih karcinoma dojke	31
3.2.2. Metodologija određivanja ekspresije PTEN, PI3K, mTOR i MDR1 proteina, kao i ER, PR i HER2 receptora	32
3.2.2.1. Metoda određivanja ekspresije PTEN proteina	32
3.2.2.2. Metoda određivanja ekspresije PI3K proteina	33
3.2.2.3. Metoda određivanja ekspresije mTOR proteina	35
3.2.2.4. Metoda određivanja ekspresije MDR1 proteina	36
3.2.2.5. Metoda određivanja steroidnih receptora (ER i PR)	37
3.2.2.6. Metoda određivanja HER2 receptorskog statusa (Human Epidermal Growth Factor Receptor)	38
3.2.3. Metoda za detekciju gubitka heterozigotnosti (LOH) <i>PTEN</i> gena	39
3.2.3.1. Izolacija DNK iz parafinskih kalupa	39
3.2.3.2. Određivanje koncentracije i provera kvaliteta izolovane DNK	40
3.2.3.3. LOH analiza PTEN tumor supresor gena	40
3.2.4. Statistička analiza rezultata	41
4. REZULTATI	43

4.1. Opis cele ispitivane grupe i karakteristike bolesti	43
4.2. Imunohistohemijska analiza ekspresije PTEN, PI3K, mTOR proteina i MDR1 membranskog transportera.....	44
4.3. Povezanost PTEN ekspresije sa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC	55
4.4. Povezanost PI3K ekspresije sa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC	58
4.5. Povezanost mTOR ekspresije sa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC.....	63
4.6. Asocijacija imunoekspresije PTEN, PI3K i mTOR proteinasa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC tumora	66
4.7. Povezanost <i>PTEN</i> LOH-a sa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC	71
4.8. Imunoekspresija ABCB1 (MDR1) transmembranskog proteina i njegova povezanost sa kliničko-histopatološkim parametrima	76
4.9 Aktivacija PAM signalnog puta i ekspresija MDR1 proteina.....	79
5. DISKUSIJA.....	80
6. ZAKLJUČCI	86
7. LITERATURA	88

1. UVOD

1.1. Karcinomi dojke

Karcinom dojke je najčešći tip maligniteta i vodeći uzrok smrti u populaciji žena širom sveta. Svake godine od malignih tumora dojke oboli više od dva miliona, a umre preko 600 000 žena (Bray et al., 2018).

Zvanični epidemiološki nalazi i podaci SZO (Svetska zdravstvena organizacija) jasno pokazuju da i incidenca i smrtnost uzrokovana ovim malignim bolestima uprkos sakupljenim znanjima i dalje raste. Rastući trend u oboljevanju je posebno uočljiv u visoko razvijenim zemljama dok je smrtnost, zahvaljujući razvitku novih dijagnostičkih metoda i terapijskih pristupa, značajno redukovana. Istovremeno, smrtnost uzrokovana karcinomima dojke je u nerazvijenim zemljama, zbog kašnjenja u detekciji i terapiji, u stalnom porastu (Ghoncheh et al., 2015, 2016; Miricescu et al., 2020).

Geneza malignih tumora dojke je složeni, višefazni proces koji počinje sa patološkim hiperproliferacijama čiju osnovu čine strukturne i/ili funkcionalne lezije gena odgovornih za kontrolu ključnih procesa u ćeliji - ćelijsku deobu, diferencijaciju, apoptozu. Rezultat ovih genetičkih lezija biće postupna progresija od displazija i karcinoma *in situ* do visoko invazivnih tumora i pojave metastatske bolesti.

Terapija karcinoma dojke uključuje kombinaciju hirurgije, hemioterapije i /ili radioterapije. I mada se danas zna da su radioterapija i hemioterapija vrlo efikasne u smanjenju veličine tumora, hemioterapija u suzbijanju mikrometastatske bolesti, klinički vidljiva metastataza koja se kod visokoinvazivnih karcinoma dojke najčešće javlja na plućima, jetri, kostima ili mozgu, i dalje je neizlečiva bolest za koju ni jedan od navedenih terapijskih protokola nije rešenje (Sambi et al., 2017).

Karcinomi dojke se smatraju najheterogenijom populacijom humanih maligniteta, čija etiologija još uvek nije jasna. Naime, duga lista potencijalnih uzročnika obuhvata hormonske i sredinske i genetske faktore rizika (Miricescu et al., 2020). U hormonske faktore rizika koji mogu doprineti razviću malignih tumora dojke spadaju: rana menarha, kasna menopauza, rađanje, dojenje, dugotrajne hormonske terapije, uticaj endogenog testosterona i egzogenih estrogena. Sredinski faktori rizika obuhvataju: izloženost različitim genotoksičnim i negenotoksičnim agensima, način ishrane i stil života, dok se pozitivna porodična istorija i mutacije u određenim tumor supresorskim genima, pre svega *BRCA 1*, *BRCA 2* i *p53* genu, smatraju ključnim genetskim faktorima rizika (Shah et al., 2014).

U genezi malignih tumora dojke posebno mesto pripada estrogenskom receptoru (ER) i njegovim ligandima. Estrogenski receptor (ER) predstavljaju važan prediktivni faktor od kog zavisi izbor odgovarajuće terapije, dok je nivo njegove ekspresije kao i ekspresije progesteronskog (PR) i HER2+ receptora (eng. *Human Epidermal Growth Factor*, HER2) ključni kriterijum za podelu karcinoma dojke na (i) hormon zavisne – one koji ekspimiraju ER, PR i/ili HER2+ receptor i na (ii) trostruko negativne tumore dojke (eng. *Triple Negative Breast Carcinoma*, TNBC) (Dent et al., 2007; Kennecke et al., 2010).

Trostruko negativni karcinomi dojke čine oko 15% svih karcinoma dojke koji kao što im ime kaže, ne ekspimiraju gene za estrogenski (ER), progesteronski (PR) i receptor za humani epidermalni faktor rasta (HER2-neu/ErbB2) (Pal et al., 2011). Zbog visoke stope recidiva i čestih relapsa, odnosno reaktivacije bolesti koja je bila u mirnoj fazi, TNBC se smatraju najagresivnijim podtipom karcinoma dojke (Yu et al., 2013). Oboleli od TNBC ne reaguju na hormonsku, niti na ciljanu terapiju, a zbog visoke učestalosti pojave udaljenih metastaza, ne reaguju ni na konvencionalnu hemioterapiju. Posledica rezistencije TNBC na većinu raspoloživih terapijskih tretmana jeste lošije preživljavanje i lošija prognoza. Sve to ukazuje na veoma visoku heterogenost ovih tumora kako na imunohistohemijskom tako i na genetičkom nivou (Bosch et al., 2010; Yu et al., 2013).

Heterogenost je najupečatljivija karakteristika karcinoma dojke i glavni razlog njihove ogromne varijabilnosti u odgovoru na terapiju. Drugim rečima, različiti odgovori na iste terapijske protokole kod karcinoma dojke su po svemu sudeći, posledica njihove ekstremne kliničke i genetičke različitosti. Zato je, precizna klasifikacija ovih maligniteta od presudnog značaja za izbor pravog terapijskog protokola, odnosno za adekvatno lečenje, tok i krajnji i ishod bolesti.

1.2. Klasifikacija karcinoma dojke – histopatološka i molekularna

Karcinomi dojke su visokoheterogena grupa humanih maligniteta čija precizna klasifikacija zbog ekstremne različitosti predstavlja istovremeno veliki problem, ali i ogroman izazov za istraživače i kliničare. Tačna dijagnoza i odgovarajuća klasifikacija su u direktnoj vezi sa izborom pravog terapijskog tretmana, kao i sa njegovim ishodom.

U zavisnosti od toga koji kriterijum usvojimo kao polaznu osnovu, karcinome dojke možemo grupisati, odnosno klasifikovati na različite načine. Tako, počemo li od invazivnosti kao osnove za njihovu klasifikaciju, delimo ih na: (i) neinvazivne ili *in situ* - karcinome čije ćelije se drže u masi, odnosno one koji ne infiltriraju okolna tkiva i na (ii) invazivne ili infiltrativne –

karcinome čije ćelije infiltriraju susedna tkiva, kao i lokalne limfne čvorove ili poseduju potencijal da metastaziraju. Po učestalosti javljanja, češći su invazivni.

U odnosu na histološki tip ćelija u kojima se desila maligna transformacija, karcinome dojke delimo na (i) duktalne, (ii) lobularne, (iii) mešovite – one koji kao što im ime kaže, sadrže oba ćelijska tipa i (iv) retke histološke tipove u koje spadaju papilarni, medularni, tubularni, mucinozni i ostali.

Ukoliko histološkom tipu ćelija pridružimo stepen invazivnosti, onda među neinvazivnim karcinomima dojke razlikujemo (i) lobularni karcinom *in situ* -LCIS, (ii) duktalni karcinom *in situ* -DCIS (Kumar et al, 2014), a među invazivnim (iii) invazivni duktalni bez druge specifikacije (eng. *No special type*, NST) i (iv) invazivni lobularni karcinom. Duktalni karcinom *in situ* je daleko češći od lobularnog karcinoma *in situ*, a najpoznatiji tipovi su: komedo, kribriformni, mikropapilarni, papilarni i solidni. Sa incidencom koja se kreće od 70 - 80%, invazivni duktalni karcinom bez druge specifikacije (eng. *No special type*, NST) je daleko češći od svih gore navedenih karcinoma dojke. U retke karcinome dojke spadaju metaplastični, apokrini i adenoid cistični karcinom (Lakhani et al., 2012).

Invazivni tumori dojke se međusobno mogu značajno razlikovati po histološkom gradusu, odnosno stepenu diferentovanosti koja pokazuje koliko tumorske ćelije histomorfološki nalikuju ćelijama normalnog tkiva iz kog su se razvile. Za definisanje stepena diferentovanosti nekog tumora ključna su tri parametra – nuklearni pleomorfizam, prisustvo tubularnih/glandularnih struktura i mitotski indeks tumorskih ćelija. Na osnovu histološkog gradusa ili stepena diferentovanosti, invazive tumore dojke delimo na dobro diferentovane (Gradus1), srednje diferentovane (Gradus2) i loše diferentovane (Gradus3). Tumori višeg histološkog gradusa su, po pravilu daleko agresivniji i imaju lošiju prognozu (Malhotra et al., 2010).

Tubularni, papilarni i mucinozni karcinomi imaju bolju prognozu i bolji odgovor na hemioterapiju u odnosu na invazivne duktalne i lobularne karcinome, dok metaplastični, slabodiferentovani duktalni karcinomi imaju loš odgovor na konvencionalnu hemioterapiju i lošiju prognozu bolesti (Turashvili and Brogi, 2017).

Medularni karcinomi dojke uprkos visokim mitotskim indeksom i zabrinjavajućim citološkim osobinama imaju odličnu prognozu, a tretiraju se po protokolu za TNBC (Huober et al., 2012; Pareja et al., 2016).

Jedna od najčešćih podela karcinoma dojke bazira se na molekularnom profilu genske ekspresije estrogenskog (ER), progesteronskog (PR) i HER2 (ErbB2) receptora. Po ovom kriterijumu, tumore dojke delimo na hormon zavisne ili (ER+) karcinome dojke koji ekspimiraju

bar jedan od navedenih receptora i trostruko negativne karcinome dojke (TNBC) koji ne ekspimiraju ni jedan od navedenih receptora po čemu su i dobili ime (Banin Hirata et al., 2014).

Velika većina histološki slabo diferentovanih invazivnih trostruko negativnih karcinoma dojke pripada duktalnim invazivnim karcinomima, NST sa centralnom nekrozom, izraženim limfocitnim infiltratom, značajnim nuklearnim pleomorfizmom i brojnim mitozama (Turner and Reis-Filho, 2013).

Takođe, postoje brojni ređi histološki tipovi sa trostruko negativnim fenotipom kao što su: apokrini karcinomi, medularni karcinomi, metaplastični karcinomi, karcinomi sa skvamoznom i mezenhimalnom diferencijacijom (Pareja et al., 2016).

Većina slabo diferentovanih TNBC pokazuje klinički agresivno ponašanje, dok se visokodiferentovani tumori sa trostruko negativnim imunoprofilom, odlikuju indolentnim tokom bolesti. U ovu grupu spada karcinom sa osobinama tumora pljuvačnih žlezda. (Lakhani et al., 2012).

Dakle, klasifikacija - definisanje tipa inazivnih karcinoma dojke bazira se prvensteno na ekspresiji tri tumorska markera, odnosno tri receptora – estrogenskog (ER), progesteronskog (PR) i HER2 receptora. U odnosu na ekspresioni profil ovih markera, razlikujemo hormon zavisne (ER+) i trostruko negativne karcinome dojke (TNBC). Još preciznije definisanje tipa/podtipa tumora omogućeno je uvođenjem dodatnih molekulskih kriterijuma tj analizom ekspresionog profila receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR), atezivnih proteina i markera proliferacije Ki67 (Shah and Allegrucci, 2012).

Prema molekularnoj klasifikaciji baziranoj na ekspresiji gore pomenutih gena, karcinome dojke delimo na:

- (i) **Luminalne** podtipa **A** i **B** - tumore sa ekspresionim profilom sličnim ekspresionom profilu normalnog luminalnog epitela. Za ove tumore dojke je karakteristična visoka ekspresija estrogenskog (ER) i progesteronskog receptora (PR) kao i promenljiva (varijabilna) ekspresija HER2 receptora – Imunohistohemijski opisani **Luminal A** = ER+/PR+/HER2-; Imunohistohemijski opisani **Luminal B** = ER+/PR+/-/HER2+;
- (ii) **HER2 pozitivne** – tumore savisokom ekspresijom HER2 niskom ekspresijom epitela sličnog luminalnom. Dakle, imunohistohemijski opisani **HER2 positive** =HER2+/ER-/PR-
- (iii) **“Nalik” normalnom** – tumore čiji ekspresioni profil liči na ekspresioni profil zdravog tkiva dojke.

- (iv) **Basal like (BL)**–tumori čiji ekspresioni profil podseća na profil zdravog bazalnog epitela. Dakle, kod ovih tumora nisu ekspimirani ni estrogenski, ni progesteronski, a ni HER2 receptori i gotovo uvek imaju visok proliferativni indeks. Imunohistohemijski opisani **Basal like** =ER-/ PR-/ HER2-/EGFR+/CK5/6+ (Adebamowo et al., 2008; Sorlie et al., 2003).
- (v) **Klaudin niski**–tumori koji najčešće, imaju trostruko negativni imunofenotip, ne ekspimiraju athezivne proteine i poseduju visoku ekspresiju markera epitelijalno-mezenhimalne tranzicije, tzv EMT-markeri (eng. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) (Dias et al., 2017; Prat et al., 2010).

Tumori siromašni klaudinom kao i podtipovi tumora sličnih bazalnom karcinomu su tumori koje karakteriše odsustvo luminalnih markera diferencijacije, prisustvo mezenhimalnih markera i niska proliferacija u odnosu na “basal like” karcinome (Prat and Perou, 2011; Shah et al., 2012).

Slika 1

Molekularna klasifikacija karcinoma dojke



Slika 1. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke. Modifikovano iz (Malhotra et al., 2010)

S obzirom da histološka podela karcinoma dojke a posebno TNBC ima najvećim delom samo prognostički značaj i ograničavajuća je za nove vidove terapije postavlja se pitanje potrebe za novim molekularnim klasifikacijama i novim vidovima ciljane terapije. Potreba za novim klasifikacijama, uključivanjem novih molekularnih markera svrstava pacijente u posebne podgrupe u odnosu na relativni rizik od recidiva ili progresije bolesti. Značaj molekularne podele karcinoma dojke je u različitoj prognozi (ili predviđanju) ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez znakova bolesti. Dakle, pokazano je da BL karcinomi dojke imaju najkraći interval preživljavanja (Prat et al., 2015).

Različite studije jasno pokazuju da čak 70-80% TNBC poseduje molekularni profil tumora BL karcinoma, dok 90-95% hormon zavisnih (ER+) tumora dojke poseduje molekularni profil luminalnih A i luminalnih B tumora. Istovremeno, utvrđeno je da oko 20% karcinoma koji nisu

trostruko negativni karcinomi dojke (TNBC) poseduju ekspresioni profil sličan ili isti kao i takozvani “basal like”- BL karcinomi dojke (Prat and Perou, 2011).

Iako najveći broj trostruko negativnih karcinoma dojke spada u BL karcinome dojke imunohistohemijski markeri svih TNBC i “basal like” karcinoma nisu u potpunosti isti. Imunofenotip “basal like” karcinoma pokazuje visoku ekspresiju bazalnih keratina (CK5/6, CK4, CK17) i nisku ekspresiju HER2, nisku ekspresiju ER, PR i luminalnih keratina (CK18, CK19) i veoma nisku ili nikakvu ekspresiju Claudina 3 i E-Cadherina (Prat et al., 2010).

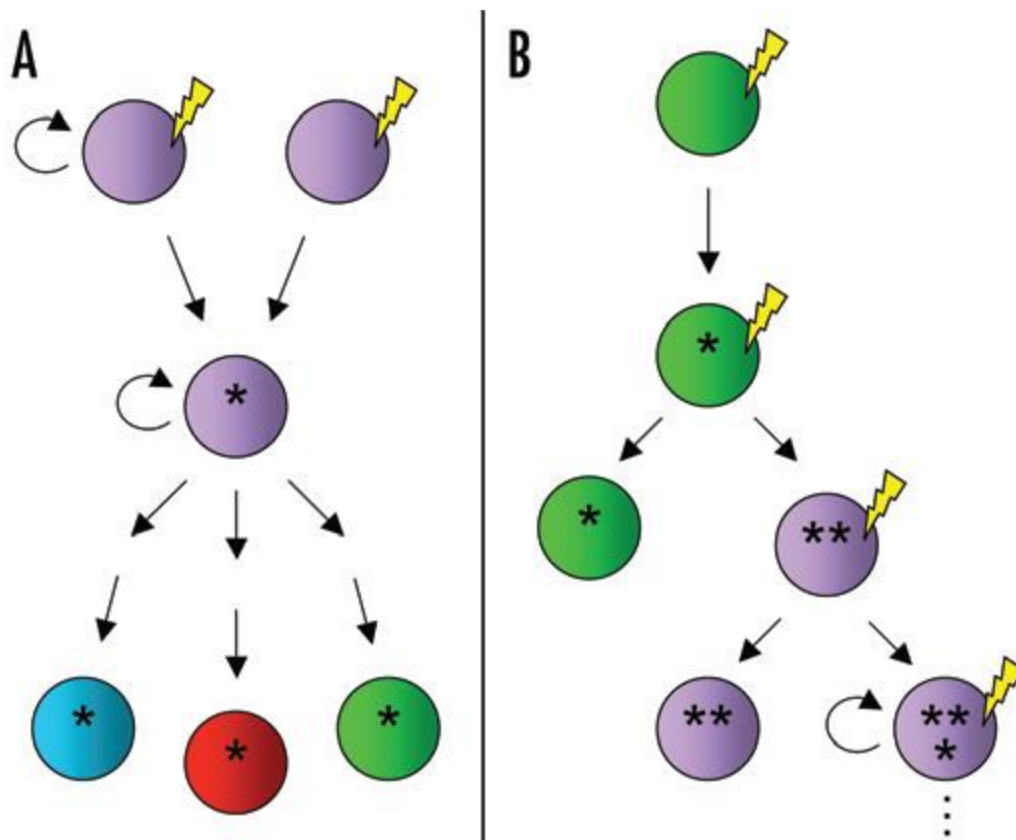
Molekularni profil trostruko negativnih karcinoma dojke su takođe proučavali Lehmann i saradnici kada su ustanovili postojanje šest različitih podtipova trostruko negativnih profila karcinoma dojke: podtip 1-BL 1 (prekomerna deoba ćelije i oštećen put sistema popravke DNK) , podtip 2- BL 2 (ispoljavanje faktora rasta i mioepitelnih markera), podtip 3- imunomodulatorni podtip (imunski procesi u ćeliji i imunski posredovana signalna kaskada), podtip 4 -mezenhimalni , podtip 5- mezenhimalni nalik matičnim ćelijama (bogat u genima epitelno mezenhimalne tranzicije) i podtip 6- luminal androgen receptor podtip (eng. *luminal androgen receptor*, LAR), ekspresija epitelnih luminalnih gena i ER (Lehmann et al., 2011).

Većina duktalnih (NST) trostruko negativnih karcinoma dojke imaju BL molekularni profil 1/2, apokrini TNBC imaju LAR molekularni podtip, dok TNBC sa skvamoznom i/ili mezenhimalnom diferencijacijom su na molekularnom nivou podtipovi siromašni kladinom ili tumori slični bazalnom karcinomu (Weigelt et al., 2009, 2015).

1.3. Intratumorska heterogenost tumora dojke

Heterogenost je urođena, prirodna karakteristika svakog tumora koja proizilazi iz činjenice da se unutar tumorske mase osim transformisanih – tumorskih ćelija nalaze i ćelije strome kao i imunske i vaskularne ćelije (O’Flaherty et al., 2012). Tumorske ćelije se, osim toga, sastoje od matičnih ćelija koje poseduju sposobnost samoobnavljanja, ali i od diferencijovanih progenitorskih ćelija (van Niekerk et al., 2017)

Nastanak heterogenosti kao inherentnog svojstva svih maligniteta, objašnjavaju (tumače) dva različita modela: model matičnih kancer ćelija (eng. *Cancer Stem Cells*, CSC) i model klonalne evolucije. **Slika 2**



Slika 2. Model kancerskih matičnih ćelija i model i klonalne evolucije. A: Model kancerskih matičnih ćelija: normalne odrasle matične ćelije ili progenitorske ćelije mutacijom stvaraju ćelije tumora koje mogu da se samoobnavljaju i diferenciraju u druge tumorske ćelije. B: Model klonalne evolucije: svaka odrasla normalna ćelija može mutacijama da stekne sposobnost razvoja različitih kompetentnih tumorskih klonova. Munja-mutagenaza, Zvezde- mutacije i višestruke mutacije. Krugovi-ćelije, Ljubičasti krug ćelije sa osobinama matičnih ili progenitorskih ćelija. Preuzeto iz (Campbell and Polyak, 2007).

Normalne matične ćelije (eng. **Stem Cells, SC**) poseduju sposobnost samoobnavljanja, sposobnost proliferacije, a zbog pluripotentnosti i sposobnost da se diferenciraju u više različitih tipova ćelija (O'Flaherty et al., 2012)

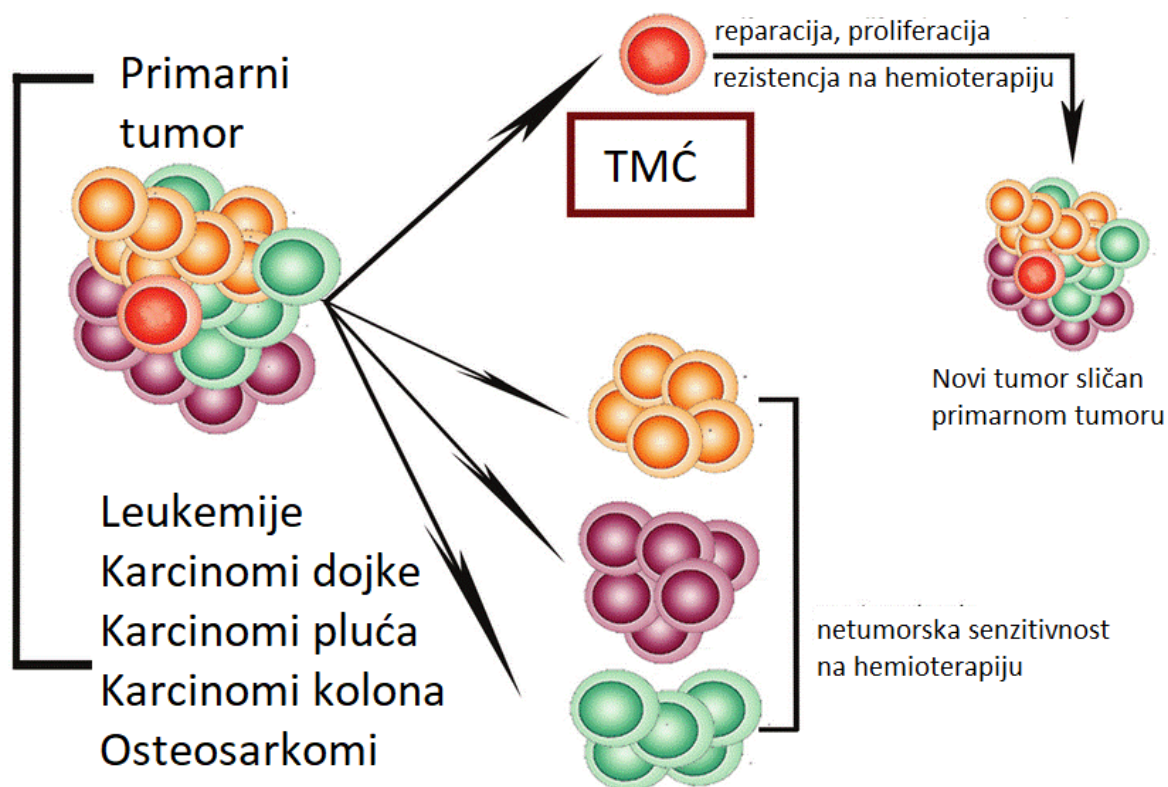
Matične ćelije i zrele dediferentovane ćelije u tumorskom tkivu mogu mutacijama dovesti do razvika različitih ćelijskih linija, slično kao u normalnom tkivu (Matić, 2010). Kancerske matične ćelije (CSC) imaju slične karakteristike kao normalne matične ćelije (SC) i potiču ili od normalnih matičnih ćelija ili od visoko proliferativnih progenitorskih ćelija koje su se zbog različitih onkogenih mutacija dediferencirale i stekle karakteristike stem ćelija tj vratile se u stadijum matičnih ćelija (Krstic and Stojnev, 2014).

Model kancerskih matičnih ćelija (CSC) pokazuje da unutar tumora postoji grupa CSC koja nastaje mutacijama matičnih stem ili progenitorskih ćelija i koja indukuje inicijaciju i dalju diferencijaciju tumora (Visvader and Lindeman, 2012).

Ta grupa CSC usled novih, dodatnih onkogenih mutacija i epigenetskih modifikacija dovodi i do razvoja jedne manje grupe rezistentnih klonova, kojiza razliku od njihovih diferencijiranih progenitora sa ograničenom sposobnošću samoobnavljanja i diferencijacije, poseduju sposobnost neograničenog samoobnavljanja. Ovu pojavu nazivamo tumorskom heterogenošću i hijerarhijom (Campbell and Polyak, 2007). Smatra se da je ova mala grupa kancerskih stem ćelija odgovorna za progresiju tumora, u kasnijoj fazi bolesti, kao i za metastatsko širenje, relaps i rezistenciju bolesti na hemio- i radioterapiju (O'Flaherty et al., 2012; Campbell and Polyak, 2007). **Slika 3**

Smatra se takođe, da kod pomenutih, malobrojnih CSC, zbog poremećaja u ključnim signalnim putevima i posledične aktivacije transkripcionih faktora dolazi do pojave ozbiljne genomske nestabilnosti (Krstic and Stojnev, 2014). Vremenom, zbog genomske nestabilnosti i pojave novih dodatnih mutacija stvaraju se novi slični klonovi CSC koji mogu da budu u različitim stadijumima diferencijacije što generiše tumorsku intraheterogenost. Hemioterapija i/ili target terapija može uticati na smrt ovih klonova ali se opstanak makar i jednog rezistentnog klona koji ima visoku moć samoobnavljanja i proliferacije smatra ozbiljnim rizikom za pojavu relapsa, lošu prognozu i krajnji ishod bolesti (van Niekerk et al., 2017). Modelom klonalne evolucije u kome ne postoji hijerarhija unutar tumora, dolazi do genetskih i epigenetskih promena u zreloj diferencijiranoj somatskoj ćeliji koja stiče sposobnost razvoja različitih kompetentnih tumorskih klonova koji neprestano proliferišu i stvaraju dodatne mutacije. Vremenom, gomilanjem dodatnih mutacija koje se mogu ponavljati beskonačno, tumorske ćelije stiču nove osobine, kao što je dominacija u rastu, proliferaciji i razvoju tumora u odnosu na druge tumorske klonove (Campbell and Polyak, 2007).

U oba pomenuta modela, modelu CSC kao i u modelu klonalne evolucije tumorska mikrookolina predstavlja veoma važan faktor za selekciju tumorskih klonova (Krstic and Stojnev, 2014).



Slika 3. Hipoteza CSC. Mala populacija tumorskih matičnih ćelija stiče rezistenciju na hemioterapiju, sposobnost samoobnavljanja i održavanja heterogenosti tumora. Modifikovano iz (Romano et al., 2015).

Kao što je već rečeno, potomci normalne stem ćelije tokom razvića gube razne metaboličke funkcije i postepeno se diferenciraju tj specijalizuju za funkciju tkiva kome pripadaju pri čemu gube sposobnost deobe (proliferacije). Međutim, ukoliko se usled transformacije koju najčešće indukuju mutacije, dogodireverzija fenotipa matične ćelije (dediferencijacija), takve će tumorske ćelije povratiti sve metaboličke puteve koje su prethodno izgubile što ih čini otpornim na različite terapije (Lobo et al., 2007).

Mutacije u onkogenima i/ili tumor supresor genima, odnosno u signalnim putevima izazvaće ekspanziju ili širenje (uvećanje) tumorskog klona (Dalerba et al., 2007). Imajući u vidu da CSC i SC dele većinu signalnih puteva, terapijski modaliteti bi podrazumevali terapije (metaboličke blokatore) koje bi uticale na jedinstvene regulatorne mehanizme (različite proteine i signalne puteve) ciljajući samu CSC. Smatra se da rezistencija na hemioterapiju CSC nastaje zbog antiapoptotske aktivnosti i povećanog nivoa ekspresije proteinskih pumpi za efluks lekova što određenu populaciju tumorskih ćelija čini otpornim, odnosno rezistentnim na više lekova (Romano et al., 2015).

Prema modelu klonalne evolucije ciljana terapija bi bila usmerena na više tipova tumorskih ćelija sa više različitih farmakoloških agenasa (Krstic and Stojnev, 2014).

1.4. Intertumorska heterogenost karcinoma dojke

Tumorska interheterogenost kod karcinoma dojke može se objasniti postojanjem više histomorfoloških i molekularnih podtipova karcinoma dojke kod različitih bolesnica (različiti imunofenotip i molekularni profil) (Campbell and Polyak, 2007). Dakle, intertumorska heterogenost se kod karcinoma dojke uočava u postojanju različitih histoloških tipova tumora, različitog stepena diferentovanosti tumora (gradus tumora- dobro, srednje i loše diferentovani tumori), različitog imunohistohemijskog profila i molekularnog profila primarnih tumora. Intratumorska heterogenost se može objasniti postojanjem više vrsta histomorfoloških tipova karcinoma u jednom istom tumoru i/ili različit imunofenotip i gradus kod primarnih tumora i metastatskih tumora iste vrste kod jedne bolesnice (Turashvili and Brogi, 2017).

Histomorfološka heterogenost se objašnjava u postojanju više od 18 različitih histopatoloških podtipova karcinoma dojke od kojih je najzastupljeniji duktalni invazivni karcinom (NST) u koji spada heterogena grupa tumora sa nedovoljno morfoloških karakteristika koje bi ga svrstale u specifičan tip tumora dojke (Shah and Allegrucci, 2012).

Imunohistohemijska heterogenost tumora dojke se objašnjava različitim prediktivnim i prognostičkim faktorima kod bolesnica sa (ER+) karcinomima dojke u odnosu na bolesnice kod trostruko negativnih karcinoma dojke.

Genetička (molekularna) heterogenost objašnjava različito biološko ponašanje unutar četiri osnovne grupe molekularnih tipova karcinoma dojke (luminalni A i B, HER2 bogati, BL karcinomi dojke) (Turashvili and Brogi, 2017).

Epitel dojke je građen od dva tipa ćelija, epitelnih luminalnih i mioepitelnih. Takođe, nađen je mali broj bazalnih nediferentovanih ćelija za koje se smatra dasu najvećim delom odgovorne za heterogenost unutar epitela tkiva dojke. Te ćelije su opisane kao matične ćelije - MaSc ćelije (eng. *Mammary gland stem cells*, MaSc). Moguće je da karcinomi dojke potiču ili od MaSc ćelija ili od matičnih diferentovanih progenitorskih ćelija genetičkim i epigenetičkim reprogramiranjem i da teorijom matičnih karcinomskih ćelija dojke ili klonalnom evolucijom samih zrelih somatskih ćelija dovode do razvoja tumora otpornih na klasičnu i ciljanu terapiju (Shah and Allegrucci, 2012.)

MaSc ćelije imunohistohemijski ne ekspimiraju steroidne receptore (ER i PR) (Bishop, 2013).

BL karcinomi dojke i sekretorni karcinomi pljuvačnih žlezda spadaju u trostruko negativne karcinome dojke jer ne eksprimiraju steroidne receptore i smatra se da upravo potiču od MaSc ćelija (Bishop, 2013; Turashvili and Brogi, 2017).

Takođe, “basal like” karcinomi visoko eksprimiraju bazalni citokeratin 6(CK6) koji je eksprimiran u diferentovanim progenitorskim ćelijama bazalnog epitela dojke (Stingl and Caldas, 2007).

Pošto konvencionalna hemoterapija nije dovoljna da ubije sve tumorske ćelije smatra se da mali broj tumorskih ćelija ostaje rezistentan sa visokim tumorigenim potencijalom omogućavajući neometani tumorski rast i predstavljaju izvor rekurencije (relapsa bolesti) (Al-Hajj et al., 2003).

MaSc ćelijekao i dediferentovane zrele ćelije mogu biti odgovorne za rezistenciju na hemoterapeutike različitim mehanizmima kao što su veoma mala sposobnost popravke DNK nakon oštećenja, prekomerna ekspresija ABC transportera i abnormalna aktivacija brojnih signalnih puteva među kojima je i PTEN/PI3K/AKT/mTORSignalni put (Dean et al., 2005; Li et al., 2008).

Terapijska kombinacija koja bi delovala na rezistentne tumorske klonove mogla bi da spreči ponovni rast i razvoj tumora i prevenira relaps bolesti (Li et al., 2008).

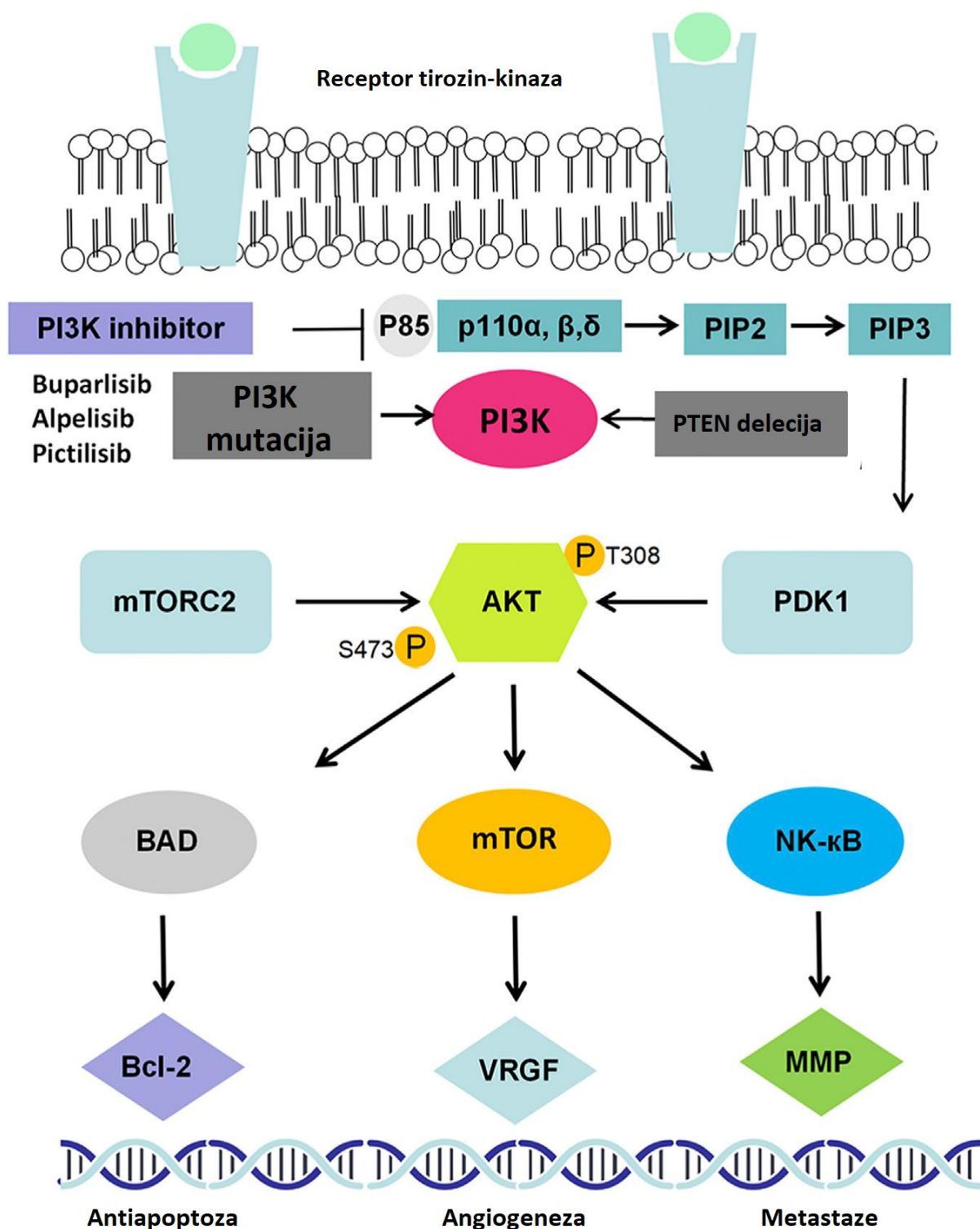
1.5 PTEN/PI3K/AKT/mTOR signalni put

Komunikacija ćelija sa drugim ćelijama ili sa okolinom ostvaruje se kroz proces takozvane ekstracelularne signalizacije. Naime, ćelije proizvode specifične molekule koji se vezuju za specifične receptore na drugim ćelijama iz okruženja (parakrina stimulacija) ili za vlastite receptore (autokrina stimulacija) i tako pokreću (aktiviraju) intracelularne puteve za prenos signala. Na ovaj način ćelije odgovaraju na promene iz okruženja, odnosno integrišu različite signale spoljašnje sredine i na njih se adaptiraju (Lim et al., 2015).

PTEN/PI3K/AKT/mTOR (PAM) predstavlja jedan od najvažnijih puteva za prenos ekstracelularnih signala u ćeliji. Ovaj signalni put igra ključnu ulogu u esencijalnim (najbitnijim) ćelijskim procesima kao što su metabolizam, rast ćelije, proliferacija, apoptoza, angiogeneza (Beg et al., 2015; Owonikoko and Khuri, 2013). PAM signalni put je značajan i za progresiju humanih tumora, jer reguliše tumorsku angiogenezu kao i izmenjeni metabolizam maligne ćelije (Kawano et al., 2007; Wu et al., 2005).

Aktivacija tj.prenos signala ovim signalnim putem počinje vezivanjem liganda kao što je npr. insulina ili nekog drugog faktora rasta sličnog insulinu-IGF (eng. *insulin growth factor*, IGF) za receptor eksprimiran na ćelijskoj membrani kao što je receptor tirozin kinaza – RTKs (eng.

receptor tyrosine kinase, RTK) ili G-protein vezujući receptor – GPCR (eng. *G protein coupled receptor*, GPCR). Aktivacija receptora ekstracelularnim ligandom indukuje aktivaciju fosfatidil inozitol trifosfat kinaze (eng. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*, PI3K), enzima koji katalizuje fosforilaciju fosfatidil 4,5 difosfat (eng. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*, PIP2) do fosfatidil-inozitol 3,4,5 trifosfata (eng. *Phosphatidylinositol 3, 4,5-trisphosphate*, PIP3). Protein PIP3 će privući signalne proteine PDK1 (eng. *Phosphoinositide-dependent protein kinase*, PDK1) i AKT (eng. *Protein kinase B*, AKT) do ćelijske membrane - vrbovaće ih. Fosforilacijom nekih od familije onkoproteina AKT-a (AKT1, AKT2, AKT3) stimuliše se ćelijski rast i preživljavanje tako što aktivirani AKT dovodi do fosforilacije pojedinih ključnih molekula. Fosforilacijom superfamilije FOX (eng. *forkhead box*, FOX) koji sadrže transkripcione faktore (FOXO familija), supresore ćelijskog rasta i proliferacije, inhibira se njihova aktivnost. Fosforilacijom glikogen sintaze 3 (eng. *glycogen sintase 3*, GSK) utiče na razgradnju ciljnih molekula koji učestvuju u metabolizmu ćelije (Rascio et al., 2021). Pored ovih proteina AKT fosforiliše i nekoliko nishodnih efektoru kao što su matriks metaloproteinaze - MMP (eng. *matrix metalloproteinase*, MMP) odgovorne za metastaziranje tumora i vaskularni endotelni faktor rasta VEGF (eng. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) odgovoran za angiogenezu i metastaziranje tumora (Dong et al., 2021). AKT fosforiliše proapoptotske proteine Bad i Bax, inhibira njihovu funkciju, a istovremeno aktivacijom antiapoptotskog Bcl-2 proteina promovise ćelijsko preživljavanje (Liu et al., 2020). PI3K posredovan fosforilisani AKT pomera se iz citoplazme na ćelijsku membranu i aktivira nuklearni faktor NF- κ B (eng. *nuclear factor kappa beta subunit*, NF- κ B), regulator genske transkripcije, zadužen za ćelijsko preživljavanje i proliferaciju (Liu et al., 2020). **Slika 4**

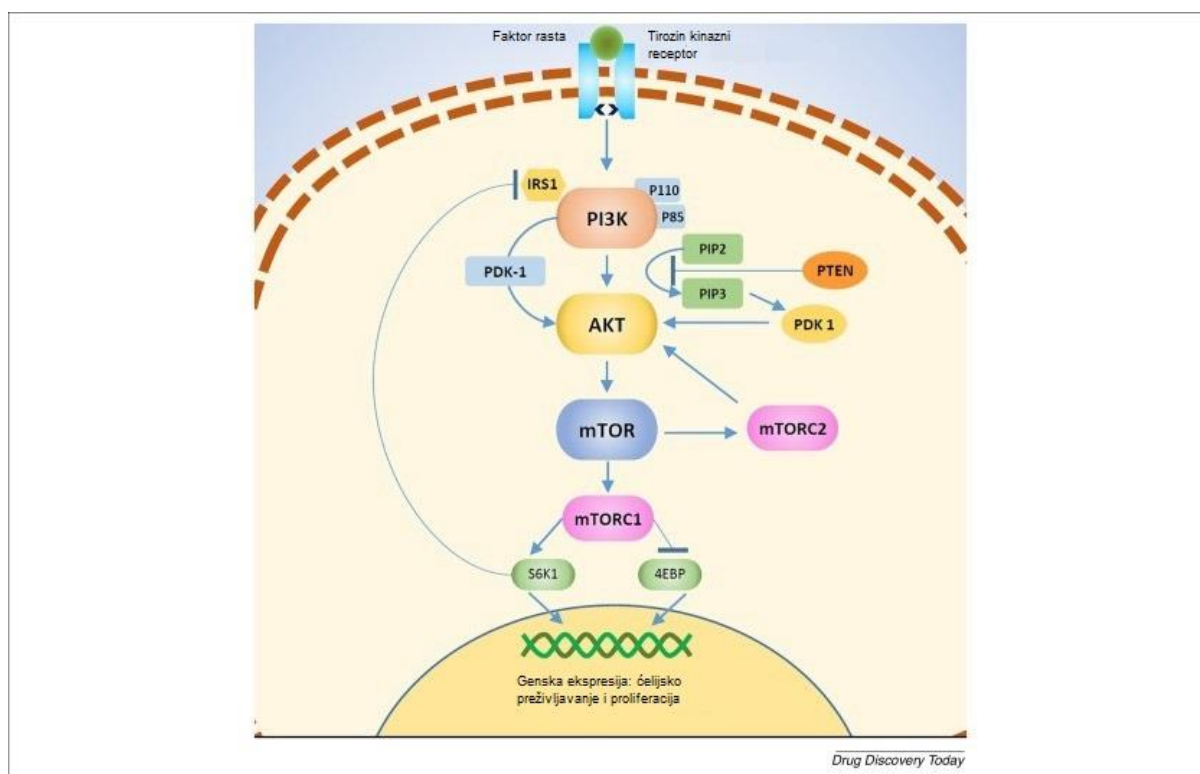


Slika 4. Mutacijom *PI3K* i inaktivacijom *PTEN* gena dolazi do aktivacije AKT-a koji aktivacijom Bcl-2 dovodi do antiapoptoze, aktivacijom mTOR-a i VEGF-a do angiogeneze i aktivacijom NF-κB i MMP-a do pojava metastaza. Modifikovano iz (Dong et al., 2021)

Osnovna uloga AKT-a je da fosforiliše mTOR (eng. *Mammalian target of rapamycin*, mTOR) protein. AKT fosforiliše tuberozni sklerozni kompleks 2 (eng. *tuberous sclerosis complex*

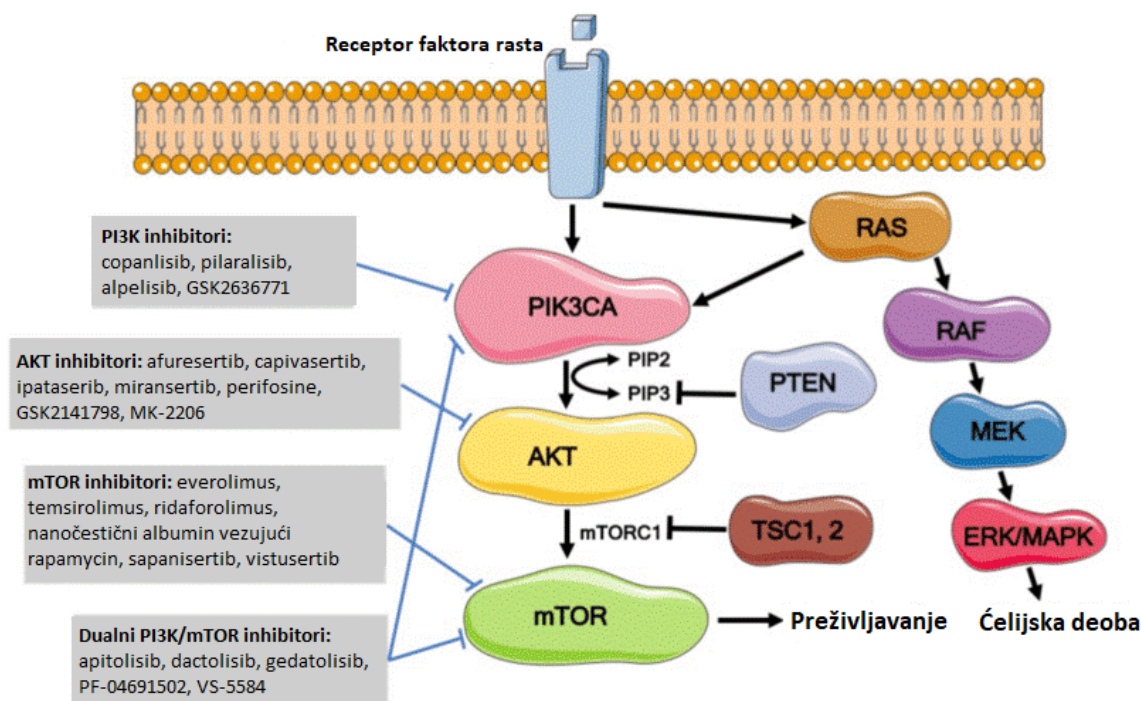
2, TSC2), inhibišući GTP-aznu aktivnost tuberoznog skleroza kompleksa (TSC1/TSC2) tako aktivirajući mTOR (Guimarães et al., 2015).

Nishodna komponenta PI3K/AKT signalnog puta, mTORC1, dovodi do sinteze proteina preko regulatora translacije protein S6K-1 (eng. *Translation-regulating factors ribosomal S6 kinase-1*, S6K-1) i 4EBP-1 (eng. *Eukaryote translation initiation factor 4Ebinding protein-14EBP-1*) koji dovode do povećane translacije faktora inicijacije 4E (eI4E) koji ima antiapoptosku aktivnost, a mTORC2 fosforiliše AKT (PIP3 je direktan supstrat za mTORC2) (Davis et al., 2014; Dowling et al., 2010; Guimarães et al., 2015). Ti efekti se ostvaruju inhibicijom tuberoznog skleroze kompleksa 1 i 2 (TSC1TSC2) koji ima inhibitorne efekte na 4EB1 (Khan et al., 2013). Takođe, delujući na povećanu ekspresiju HIF-1 α (eng. *hypoxia inducible factor-1 apha*, HIF-1) i aktivacijom VEGF-a (eng. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) dovodi do aktivacije procesa angiogeneze (Khan et al., 2013). **Slika 5**



Slika 5. PAM signalni put . PI3K fosforiliše regrutuje PDK1 koji potom deluje na AKT.

Fosforilisani AKT aktivira mTOR koji zatim preko mTORC1 dovodi do sinteze proteina inicijacijom faktora translacije 4E (aktivacijom S6K1 i inhibicijom 4EPB koji je inhibitor E4E1). PTEN inhibira aktivnost PDK1 i AKT-a defosforilacijom PIP3 do PIP2. Modifikovano iz (Khan et al., 2019).



Slika 6. PAM signalni put. PI3K dovodi do fosforilacije i aktivacije AKT-a. AKT preko mTORC1 dovodi do aktivacije mTOR-a i ćelijskog preživljavanja. Fosforilacijom TSC2 inhibira se kompleks TSC1,2 i time podstiče ćelijsko preživljavanje. Putem Ras/Raf/MAPK kaskade signalnog puta podstiče se ćelijska deoba. Modifikovano iz (Lengyel et al., 2020).

PTEN protein deluje kao negativni ili kontra regulator PI3K, glavne fosforilaze u PI3K/AKT/mTOR signalnom putu. PTEN je enzim koji svojom fosfataznom aktivnošću defosforiliše fosfatidil-inozitol 3,4-5 fosfata (PIP3) do fosfatidil inozitol 4,5 difosfata (PIP2) i tako inaktivira AKT koji stimuliše napredovanje ćelije kroz ciklus (Hutchinson et al., 2001). Dakle, PTEN negativno reguliše PI3K, defosforilacijom PIP3 do PIP2 (Engelman, 2009).

MAPK (eng. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK) signalni put je još jedan ekstremno važan put prenosa mitogenih signala, odgovoran za ćelijsku proliferaciju i preživljavanje (Hashimoto et al., 2014). MAPK reguliše nivo ciklina D1, a vezivanjem za ciklin zavisne kinaze CDK 4/6 (eng. *cyclin-dependent kinases 4/6*, CDK4/6) promovise se ulazak ćelije iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa (Cretella et al., 2018). PTEN takođe može da reguliše i nivo ciklina D1, redukcijom njegovog nivoa čime se sprečava fosforilacija MAPK puta i zaustavlja ćelijski ciklus u G1 fazi (Blanco-Aparicio et al., 2007). **Slika 6**

Kao negativan regulator PI3K, gubitak (inaktivacija) *PTEN* gena dovodi do aktivacije PAM signalnog puta (Cleator et al., 2007).

Abnormalna aktivacija PAM signalnog puta jedan je od najčešće poremećenih signalnih puteva koji se mogu detektovati u različitim tumorima uključujući karcinome dojke, kolorektalne

karcinome karcinome endometrijuma, karcinome pluća i glioblastome (Kawano et al., 2007; Liu et al., 2009; Wu et al., 2005).

1.5.1. Mehanizami inaktivacije *PTEN* tumor supresorskog gena

PTEN (eng. *Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10*, *PTEN*) je tumor supresorski gen otkriven 1997 godine. *PTEN* je jedan od najčešće deletiranih gena u mnogim humanim tumorima i ključni inhibitor intenzivnih ćelijskih deoba u PI3K/AKT/mTOR signalnoj kaskadi (Miricescu et al., 2021). Ovaj antionkogen je lociran na dugom kraku hromozoma 10, tačnije na poziciji 10 q 23, u regionu koji je u mnogim humanim tumorima deletiran i inaktiviran mehanizmom gubitka heterozigotnosti – LOH (eng. *Loss of Heterozigosity*, LOH) (Chen et al., 2014; Cristofano and Pandolfi, 2000).

Do sada su opisana tri osnovna mehanizma inaktivacije *PTEN* tumor supresor gena. Naime, do inaktivacije ovoga gena može doći zbog: (i) mutacija u kodirajućoj sekvenci gena, (ii) delecija jednog ili oba alela, odnosno hemizigotne ili homozigotne delecije ovog genskog lokusa, i/ili (iii) hipermetilacijau promotorskom region ovog gena. Mutacije se dele na germinativne ili nasledne i somatske mutacije (Yehia et al., 2020).

Germinativne (nasledne) mutacije *PTEN-a* detektovane su u naslednim kancerskim sindromima označenim kao PTHS (eng. *PTEN Hamartoma Tumor Syndromes*, PTHS) u koje spadaju Cowden-ov, Bannayan-Riley-Ruvalcaba i Proteus sindrom (Ball et al., 2001; Yehia and Eng, 1993).

Germinativne mutacije koje se viđaju kod hereditarnog Cowdenovog sindroma, karakteriše pojava benignih hamartomatoznih lezija, makrocefalija koje su česte. Takvi bolesnici su visoko predisponirani da razviju karcinome endometrijuma, bubrega, mokraćne bešike kao i multifokalne i bilateralne karcinome dojke (Yehia et al., 2020).

Somatske mutacije *PTEN-a* nađene su kako u karcinomima dojke, prostate, endometrijuma, dojke tako i umelanomima, glioblastomima i limfoidnim neoplazmama (Leslie and Downes, 2004; Sakai et al., 1998; Whiteman et al., 2002).

Hipermetilacija promotora *PTEN* gena registrovana je kod 48% bolesnica sa karcinomima dojke (Luo et al., 2016).

Delecija dela ili celog alela, tj. gubitak heterozigotnosti-LOH je jedan od osnovnih mehanizama inaktivacije *PTEN* tumor supresor gena i javlja se u 30-40% karcinoma dojke (Feilotter et al., 1999; Petrocelli and Slingerland, 2001).

LOH je najpoznatiji mehanizam i jedan od najčešćih mehanizama inaktivacije tumor supresor gena ali dok u odnosu na druge tumor supresor gene kao što su *NF1* ili *p53* gde je potrebna kompletna inaktivacija gena, kod *PTEN-a* je dovoljan gubitak samo jednog alela (npr. u karcinomu prostate) koji bi doveo do karcinogeneze (Liu et al., 2019).

Pored karcinoma dojke, gde je u literaturi nađena *PTEN* delecija u oko 4% do 63%, *PTEN* je tumor supresor gen koji je najčešće deletiran gen kod raznih drugih malignih tumora kao što su karcinomi kolona, želuca, nestinoćelijski karcinomi pluća, karcinomi prostate zatim difuzni krupnoćelijski limfomi pa i mezoteliomi (Khan et al., 2018).

Skorašnje studije ukazuju da gubitak *PTEN-a* (delecija) može da uvede karcinomsku stem ćeliju (CSC) u proliferaciju, neograničeno samobnavljanje i tumorogenezu što je pokazano kod stem i progenitorskih ćelija prostate, pluća, creva, pankreasa (Ciuffreda et al., 2014).

1.5.2. Građa i funkcija PTEN proteina

PTEN protein je lipidna fosfataza koja pripada velikoj familiji protein – tirozin fosfataza (eng. *protein tyrosin phosphatase*, PTP) (Kechagioglou et al., 2014; Li et al., 2002).

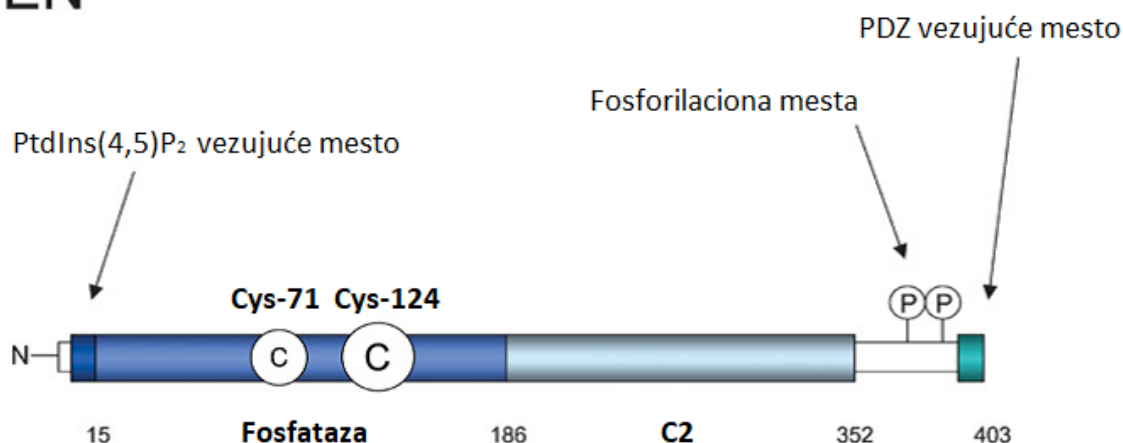
Ponaša se kao protein sa enzimskom aktivnošću kako za proteinske supstrate tako i za fosfolipidne supstrate (Torres and Pulido, 2001). Sastoji se iz 403 aminokiseline i poseduje tri jasno definisana regiona ili domene: amino ili N-terminalni region koji obuhvata 185 aminokiselina, karboksi ili C-terminalni region (186-352 aminokiseline) i završni repni region (353-403 aminokiseline) (Parsons, 2004; Torres and Pulido, 2001.)

N-terminalni domen je fosfatazni domen zadužen za vezivanje fosfolipidnih supstrata i njegovu biološku katalitičku aktivnost i smatra se da je odgovoran za tumor supresornu aktivnost (Simpson and Parsons, 2001; Walker et al., 2004).

C terminalni domen tzv. C2 domen vezuje fosfolipidne membrane i takođe poseduje katalitičko svojstvo i zajedno sa fosfataznim domenom čine katalitičku jedinicu (Minaguchi et al., 2006). Takođe pokazano je da C2 domen može da suprimira ćelijsku migraciju u odsustvu fosfatazne aktivnosti (Leslie and Downes, 2004).

Nekatalitička jedinica se sastoji od veoma kratkog N terminalnog repa i dužeg C terminalnog repa koji sadrži peptidne PEST (eng. *peptide sequences rich in proline, glutamate, serine and threonine*, PEST) sekvence (serin, treonin rezidue) i fosforilaciona mesta neophodne za stabilnost i aktivnost proteina (fosforilisani C rep održava konformaciju koja smanjuje aktivnost proteina) i na krajnjem delu C repa PDZ (eng. *postsynaptic density protein domain*, PDZ) vezujući domen za protein-protein interakcije (Leslie and Downes, 2004; Vazquez et al., 2000). **Slika 7**

PTEN



Slika 7. PTEN protein. Modifikovano iz (Nick R. Leslie and Downes, 2004).

Mutacije N terminalnog regiona su u tumorima mnogo češće dok su mutacije dela C regiona manje poznate (Walker et al., 2004).

Mehanizmi regulacije PTEN proteina podrazumevaju transkripcionu regulaciju, posttranskripcionu regulaciju i posttranslacione modifikacije (fosforilacija, ubikvitinacija i sumoilacija) i upravo te posttranslacione modifikacije utiču na lokalizaciju proteina u ćeliji (Liu et al., 2019; Wang et al., 2007). PTEN protein identifikovan je u citoplazmi i u jedru u normalnim i tumorskim ćelijama. Smatra se da je repertoar ključnih aktivnosti koji uključuje fosfatataza nezavisne aktivnosti upravo u jedru (Song et al., 2012).

Najmanje je raspoloživ na plazma membranama ćelija, a može se naći i u različitim ćelijskim partijama, pa i u mitohondrijama (Liu et al., 2019). U tumorskim ćelijama citoplazmatski PTEN dovodi do akumulacije PIP3 i aktivacije signalnih puteva koji dovode do ćelijskog rasta, preživljavanja, proliferacije, angiogeneze, metabolizma i migracije, a sa druge strane uvodi ćeliju u apoptozu putem aktivacije proapoptoskih gena kao i inaktivacijom odnosno defosforilacijom AKT-a (Franke et al., 2003; Liu et al., 2019).

Smatra se da nuklearni PTEN zaustavlja ćelijski ciklus u G1 fazi smanjenjem aktivnosti ciklina D1i inhibicijom fosforilacije MAPK puta (Cristofano and Pandolfi, 2000).

Suprotno citoplazmatskom PTEN-u koji je više prisutan u tumorskim ćelijama dok ga u zdravim ima jako malo, tj. mali procenat stupa u kontakt sa plazma membranom, nuklearni PTEN je više prisutan u normalnim nego u tumorskim ćelijama (Liu et al., 2019; Song et al., 2012). Kako se glavne komponente PAM puta kao što su PIP2, PIP3, PI3K, PDK-1 i AKT nalaze u jedru, moguće

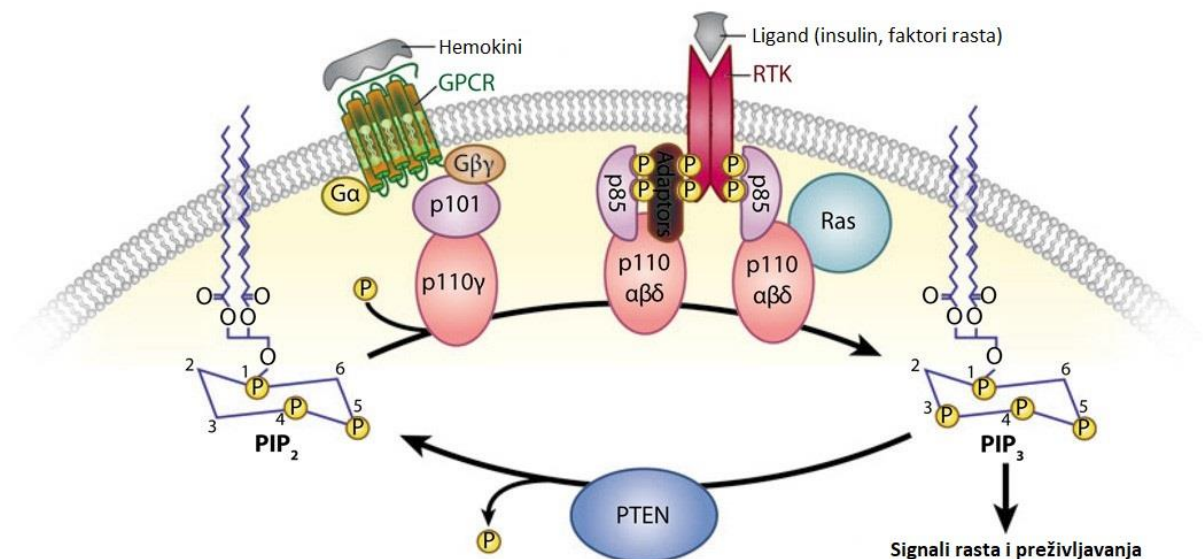
je da PTEN, kao PIP3 fosfataza, ima značajnu ulogu u jedru kao tumor supresor protein (Baker, 2007).

1.5.3. Građa i funkcija PI3K proteina

Fosfatidil-inozitol-trifosfat kinaza – PI3K (eng. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*, PI3K) je prvi put otkrivena 1980 godine i PI3K je sekundarni glasnik uključen u PI3K/PTEN/AKT/mTOR signalni put ćelijskog rasta (Maehama and Dixon, 1998; Wymann and Pirola, 1998).

PI3K superfamilija proteina poseduje više od 12 članova koje su podeljene u dve velike grupe, (i) grupa sa lipidnom i protein kinaznom aktivnošću (klasa I-III) i (ii) druga grupa sa samo protein kinaznom aktivnošću (klasa IV) (Fry, 2001). Najbolje proučene su klasa I PI3K od kojih je kod čoveka najvažnija klasa IA PI3K (Zhang and Richmond, 2021). IA PI3K je prava heterodimerna lipidna kinaza čija je osnovna funkcija fosforilacija fosfoinozitola i fosfoinozitida (Chalhoub and Baker, 2009).

Sastoji se iz regulatorne p85 subjedinice i p110 katalitičke subjedinice i osnovnu ulogu u ćeliji ostvaruje fosforilacijom fosfatidilinozitol-4,5-difosfata (PIP₂) do fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfata (PIP₃), preko G protein receptora, RTK, IGF i putem Ras-a, stimulišući tako ćelijski rast i preživljavanje (Maehama and Dixon, 1998; Sulis and Parsons, 2003). **Slika 8**



Slika 8. PI3K. Modifikovano iz (Chalhoub and Baker, 2009)

Izoforme katalitičkih subjedinica p110α, p110β i p110δ kodirane su od strane tri gena *PI3KCA*, *PI3KCB* i *PI3KCD* (Fry, 2001). Izomer 110α i p110β su široko eksprimirane u humanim tkivima dok je ekspresija p110δ uočena u hematopoetskim ćelijama i ćelijama imunskog sistema

(Fry, 2001; Verret et al., 2019). Subjedinica p110 α je eksprimirana u više od 80% karcinoma dojke i kod 9% TNBC(Guerrero-Zotano et al., 2016). Klasa II PI3K ne sadrži p85 i p110 subjedinice, rasprostranjena je u tkivima jetre, dojke i prostate i njihova tačna uloga još nije poznata (Fry, 2001).

PIK3CA gen je onkogen koji je jedan od najčešće mutiranih i/ili amplifikovanih gena u humanim karcinomima dojke (Dong et al., 2021). Pojedine studije pokazuju češće amplifikacije nego mutacije *PIK3CA* gena. Inaktivacija *PTEN* tumor supresor gena (LOH) češća je kod TNBC u odnosu na mutacije *PI3K* gena (Sporikova et al., 2018) dok su aberacije *mTOR* gena veoma retke(Hare and Harvey, 2017). Mutacije *PI3K* gena su češće nađene u (ER+) karcinomima dojke (23%) u odnosu na TNBC (8%) (Stemke-Hale et al., 2008). Takođe, pokazan je nezavisan rast tumorskih ćelija dojke od faktora rasta, kod *PI3K* mutacija ili gubitka *PTEN* gena (Dong et al., 2021)

Naime, mutacije *PI3KCA*-a sa dodatnim delecijama *PTEN*-a su drugi najčešći mehanizam koji dovodi do karcinogeneze kod TNBC posle mutacija *p53*tumor supresor gena. Genskim mutacijama onkogeno *PIK3CA* i *AKT*-a ili inaktivacijama tumor supresora *PTEN*-a dolazi do hiperaktivacije PAM signalnog puta (Pascual and Turner, 2019).

1.5.4. Građa i funkcija mTOR proteina

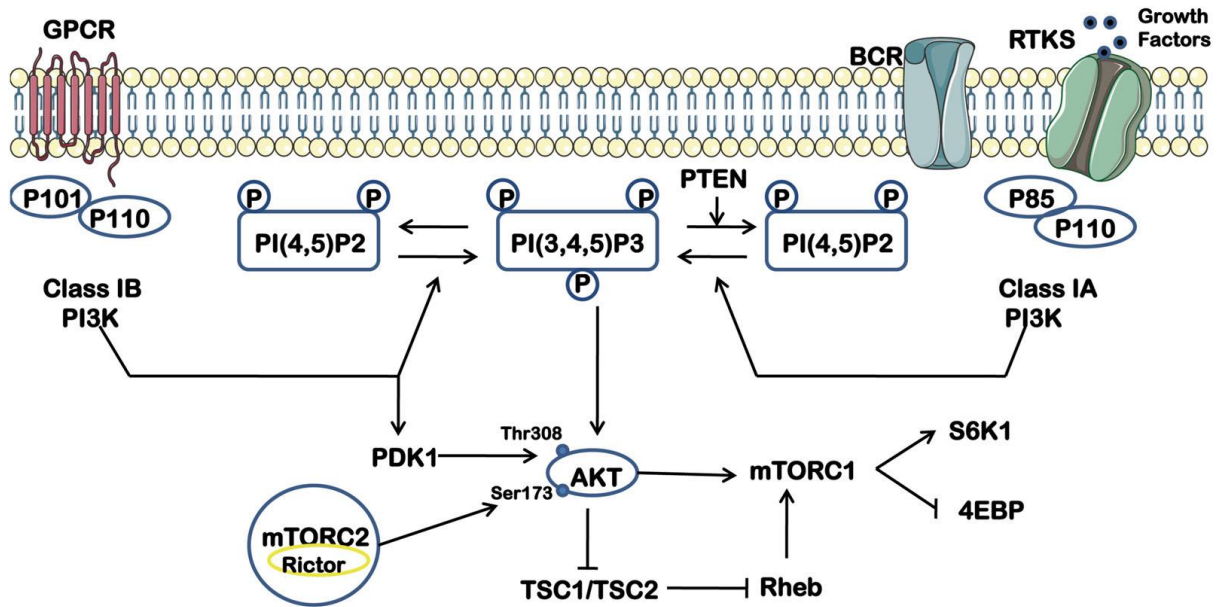
mTOR (eng. *The mammalian target of rapamycin*, mTOR) je serin/treonin kinaza, pripadnik PIKK (eng. *phosphoinositide 3-kinase related protein kinase*, PIKK) superfamiliji kinaza i postoji u dva različita proteinska kompleksa, (i) kompleks mTOR1 (mTORC1) i (ii) kompleks mTOR2 (mTORC2) (Tian et al., 2019).

Kompleksi se međusobno razlikuju u odnosu na senzitivnost na rapamicin, subcelularnu lokalizaciju (mTORC1 - endozomalne lizozomalne membrane, mTORC2 - plazma membrane i ribozomi), supstrate i regulaciju (Davis et al., 2014; Tian et al., 2019).

PI3K preko PIP3 dovodi do aktivacije AKT-a, zatim mTOR kompleksa od kojih mTORC1 učestvuje u procesu ćelijskog rasta (sinteza lipida i proteina), a mTORC2 stimuliše ćelijsko preživljavanje i proliferaciju. Aktivacija mTORC1 zavisi od PAM puta i sekundarnog glasnika PIP3 koji se vezuje za mTORC2 direktno, dok je za aktivaciju mTORC1 potreban AKT protein (Tian et al., 2019).

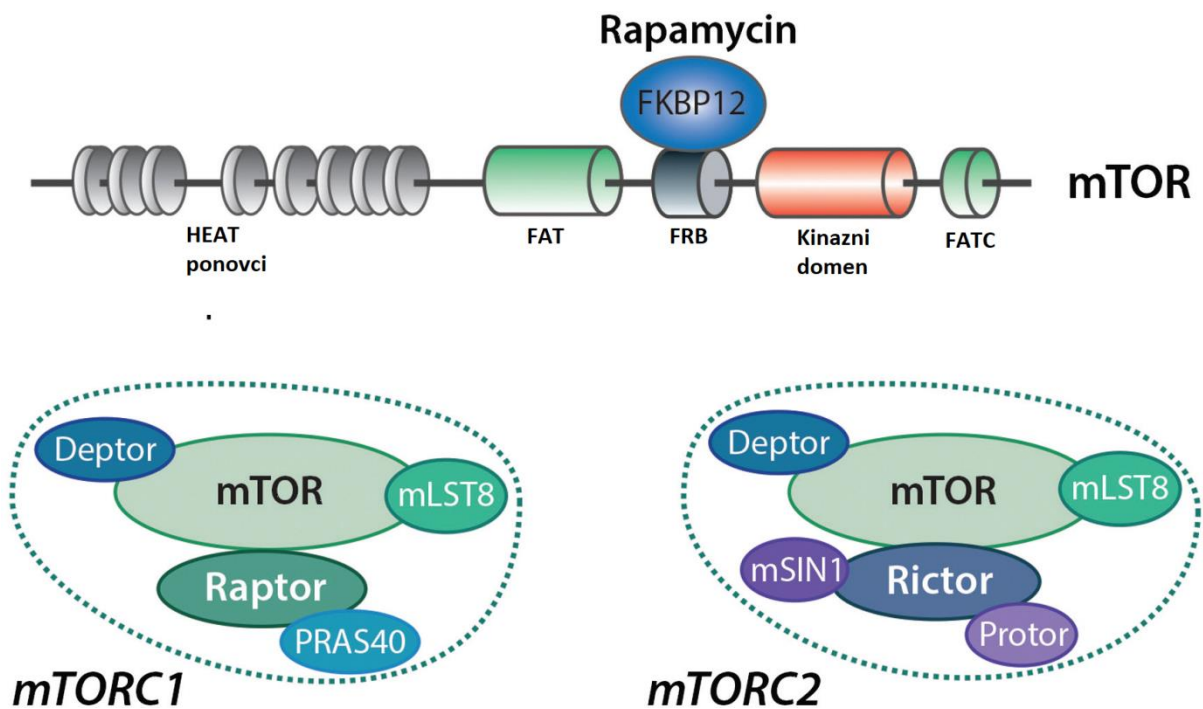
AKT fosforiliše TSC2 i inaktivira TSC1/2 kompleks tako aktivirajući mTORC1. mTORC1 fosforiliše 4EBP1 i S6K1 i dovodi do ćelijskog rasta i proliferacije (Tian et al., 2019). mTORC2 fosforiliše AKT i direktno utiče na aktivaciju AKT-a putem pozitivne povratne sprege (fosforilisani

Akt na S473 fosforiliše i aktivira mTORC2). Inhibicijom mTORC1 i mTORC2 sprečava se aktivnost AKT-a na TSC1/2 kompleks čime se aktivira mTOR protein (Liu et al., 2020). **Slika 9**



Slika 9. PTEN kao negativni regulator PI3K/AKT signalnog puta. AKT inaktivira TSC1/2 kompleks i aktivira mTORC1. Modifikovano iz (Liu et al., 2020).

Strukturno sastoji se iz N terminalnog regiona sa HEAT ponovcima koji služi za protein-protein interakcije, FAT domena i katalitičkog dela C terminalnog regiona koji se nalazi između rapamicin vezujućeg domena i FAT domena (Cargnello et al., 2015). **Slika 10**



Slika 10. mTOR . Modifikovano iz (Cargnello et al., 2015)

Somatske mutacije i amplifikacije *mTOR-a* su istraživane u humanim tumorima i pokušaji sa mTOR inhibitorima i jednog i drugog kompleksa (mTORC1 i mTORC2) kao vid lečenja maligniteta su poznati u literature (Dowling et al., 2010; Murugan, 2019).

Pozitivni rezultati sa mTOR inhibitorima pokazani kod HER2+ karcinoma dojke ,ali ciljana terapija samo sa mTOR inhibitorima u smislu prevazilaženja mehanizama rezistencije još nije dala rezultate kod trostruko negativnih karcinoma dojke (André et al., 2014; Baselga et al., 2012; Cleator et al., 2007).

1.6. ABC transporteri

ABC transporteri (eng. *ATP binding cassette*, ili "*Traffic ATP-aze*) su familija proteina koji se nalaze u ćelijama prokariota i eukariota (Schneider and Hunke, 1998) .Osnovna uloga u ćelijama je da vrše energetski ATP zavistan transport raznih supstanci kroz ćelijske membraneodržavajući intraćelijske nivoe hormona, jona, lipida, ksenobiotika i drugih malih molekula (He et al., 2021; Linton, 2007). Vršeći transport raznih supstanci kroz ćelijske membrane u ćelije (influks) iili iz ćelija (efluks) ovi transmembranski proteini ponašaju se kao ATP zavisne pumpe (Vasiliou et al., 2009).

ABC superfamilija membranskih transportera je kod ljudi podeljena u sedam subfamilija od ABC-A do ABC-G a u koje spadaju MDR1 (eng. *multidrug resistance protein 1*, MDR1(ABCB1) ili P-glikoprotein, MRP1 (eng. *MDR- associated protein 1*, MRP1) i BCRP (eng. *Breast resistance protein*, ABCG2) (Abd El-Aziz et al., 2021).

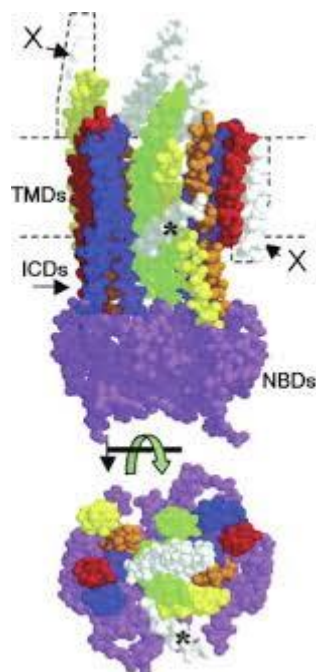
Identifikovano je 49 različitih ABC transportera, a kod čovekase eksprimiraju u ćelijama jetre, creva, moždanoj krvnoj barijeri, krvnoj barijeri testisa, placenti i bubregu, gde ostvaruju svoju uloguštiteći ćelije od toksičnih ksenobiotika i endogenih metabolite (Choi and Yu, 2014; Sharom, 2008; Sissung et al., 2010; Vasiliou et al., 2009).

MDR1 (ABCB1) transporteri su predmet najvećeg broja studija za razliku od ABCC1 i ABCG2 (Wu et al., 2008).

ABCB1 protein, poznat kao MDR1 i P-glikoprotein (Pgp), je najviše studiran od svih transporter proteina familije MDR, produkta *ABCB1* gena, odgovornih za ćelijsku protekciju efluksom toksina, metaboličkih produkata i ksenobiotika iz ćelija (Brayboy et al., 2017; Sarkadi et al., 2006)

ABCB1 je član ABCB subfamilije koja kod čoveka sadrži 11 transportera. *ABCB1* gen je lociran na hromozomu 7q21 i sadrži 28 egzona koji kodiraju 1280 aminokiselina 170-180kDa plazma membranskog glikoproteina MDR1/PgP (Sarkadi et al., 2006).

Plazma membranski PgP se sastoji iz dva transmembranska domena (TMDs) od kojih svaki ima po 6 transmembranskih segmenata, koji igraju značajnu ulogu u vezivanju P glikoprotein supstrata, tačnije formiraju aktivnu poru i zajedno sa dva simetrična intracelularna nukleotid vezujuća domena (NBDs) okrenuta ka citoplazmi učestvuju u eksportu (efluku) lekova kroz poru iz ćelije (Sarkadi et al., 2006; Choudhuri and Klaassen, 2006; Jaramillo et al., 2018). **Slika 11**



Slika 11. ABCB1. Preuzeto iz (Sarkadi et al., 2006).

U zdravim tkivima ekspresija ABCB1 proteina nađena je u gastrointestinalnom traktu, jetri i bubregu, nadbubrežnim žlezdama kao i u endotelnim ćelijama krvno moždane barijere, krvno testikularne barijere i krvno placentalne barijere gde mu je uloga da štiti tkiva od toksičnih metabolita (Faneyte et al., 2001; Tsuruo et al., 2003; Wu et al., 2018). U tumorskom tkivu viđena je visoka ekspresija ovog proteina u brojnim malignim solidnim tumorima kao i akutnim limfoblastnim i mijeloidnim leukemijama, multiplom mijelomu i uznapredovalom nesitnoćelijskom karcinomu pluća i metastatskom karcinomu dojke (Wu et al., 2018).

Pokazano je u mnogim radovima da povećana ekspresija ABCB1 može da bude razlog rezistencije tumorskih ćelija na hemioterapeutike (Steinbach and Legrand, 2007).

Takođe, mnogi hemoterapeutici, kao što su antraciklini, predstavljaju supstrat za ABCB1 što bitno utiče na citotoksični metabolizam lekova, apsorpciju i distribuciju u tumorskim ćelijama (Kovalev et al., 2013; Niero et al., 2014; Xia and Hui, 2014).

Brojni mehanizmi dovode do razvoja rezistencije tumorskih ćelija na citotoksične lekove a smatra se da su ABC transporteri a naročito ABCB1, ABCC1 i ABCG2 jedni od glavnih razloga rezistencije tumorkih ćelija na lekove (Li et al., 2016).

Rezistenciju na hemioterapiju tumorske ćelije postižu različitim mehanizmima kao što su: smanjeno preizimanje lekova, pojačan efluks samih lekova, indukcija apoptotičnih molekula, aktivacija faktora rasta (Tsuruo et al., 2003).

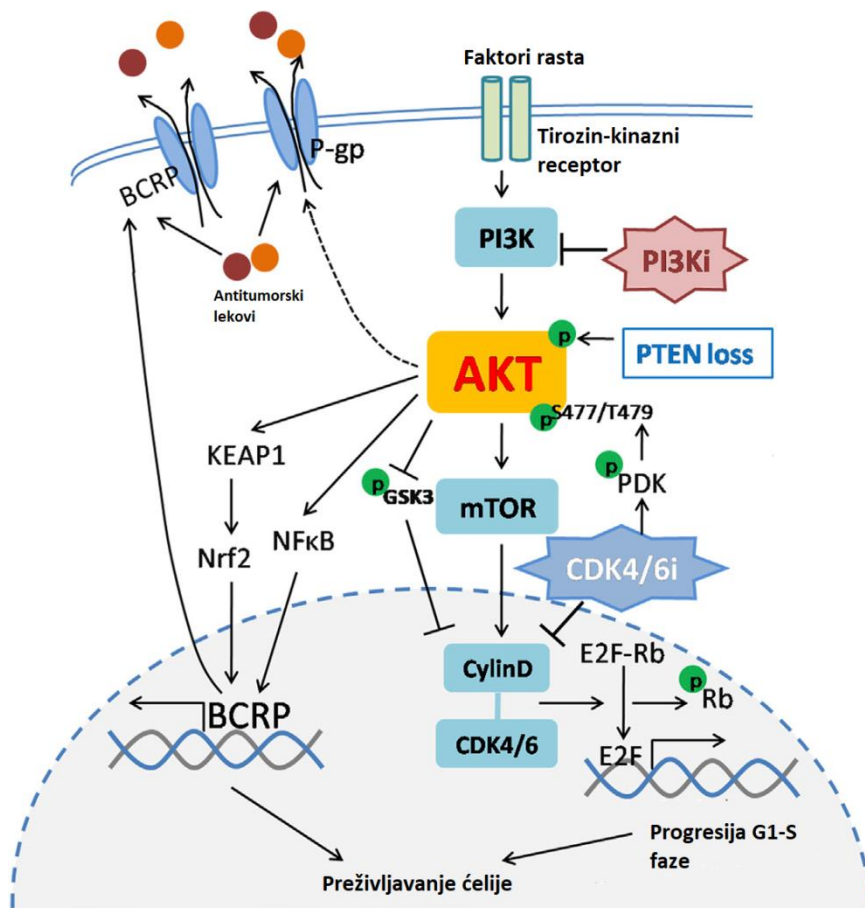
Do sada testirani inhibitori ABCB1(MDR1) transportera nisu imali zadovoljavajuće efekte na preživljavanje i tok bolesti (Robey et al., 2018).

1.7. Povezanost PI3K/PTEN/AKT/mTOR signalniog puta i MDR 1 proteina

ABC transporteri, uključujući BCRP(ABCG2) i MDR1(ABCB1) poboljšavaju efluks hemoterapeutika i dovode do rezistencije tumorskih ćelija. PAM signalni put utiče na efluks hemioterapeutika povećavajući ekspresiju ABC transportera, na prvom mestu BCRP i MDR1 (Dong et al., 2021).

PAM signalni put aktivira transkripciju BCRP proteina uz pomoć nuklearnog faktora B (NF- κ B) dovodeći do povećane ekspresije BCRP i PgP proteina (Dong et al., 2021). Samim tim efluks leka se povećava što dovodi do rezistencije na hemioterapiju (Dong et al., 2021).

PI3K komponenta PAM signalnog puta fosforilše AKT i pokreće kaskadu nishodnih ključnih molekularnih proteina kao što su NF- κ B i mTOR. NF- κ B stimuliše transkripciju ciklina D1 koji aktivira CDK4/6 i ciklin zavisne kinaze stimulišući ćelijsku deobu, rast i preživljavanje (Liu et al., 2020). **Slika 12**



Slika 12. AKT preko NFκB stimuliše transkripciju BCRP protein dovodeći do povećane ekspresije BCRP i Pgp proteina. Modifikovano iz (Dong et al., 2021).

PTEN/PI3K/AKT put inhibira proces apoptoze dok Bcl-2 protein blokira protok apoptotskih proteina Bax i Bad kroz mitohondrijalne membrane. Naime, AKT fosforiliše Bad na S136 i promovise ćelijsko preživljavanje aktivacijom Bcl-2 proteina i inhibicijom Bad-a i Bax-a. *Bcl-2* onkogen je često eksprimiran u MDR1 pozitivnim tumorima (Liu et al., 2020; Rascio et al., 2021).

GSK3 protein kinaza inhibira ciklinD1, transportuje ga van jedra i degraduje. GSK3 protein kinaza je kočnica navedenog procesa jer inhibira aktivnost ciklina D1. CDK4/6 zavisne kinaze i kao ciklinD1/CDK4/6 kompleks fosforilišu Rb protein odvajajući Rb protein od transkripcionog faktora E2F čime se promovise prelazak iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa. AKT fosforilišu GSK3 i inhibirajući njenu aktivost dovodi do porasta nivoa ciklina D1 i promovisanja ćelijske deobe (Dong et al., 2021). Suprimiranjem aktivnosti CDK4/6 zavisnih kinaza fosforiliše se AKT od strane PDK-1 dovodeći do aktivacije PI3K/AKT signalnog puta.

Očigledno je da oštećen signalni PAM put zajedno sa NF-κB i Bcl-2 podstiču ekspresiju MDR1 proteina (Dong et al., 2021; Li et al., 2016).

Onkogenim signalim putevima PI3K, AKT i NF- κ B i MDR1 igraju značajnu ulogu u samobnovljanju SCS, preživljavanju i hemorezistenciji kod karcinoma dojke, ovarijuma i glioblastoma (Begicevic and Falasca, 2017).

1.8. Rezistencija na terapiju- TNBC

Tumorska ćelija progredira prolazeći kroz seriju genetskih i epigenetskih aberacija koje utiču na pogrešnu regulaciju ključnih signalnih puteva uključenih u rast ćelije, maligno ponašanje i rezistenciju na terapiju.

Na molekularnom nivou do razvoja tumora dolazi na tri načina: mutacijom protoonkogeno (*Ras*, *Raf*), gubitkom heterozigoteta tumor supresor gena (*Rb*, *p53*, *PTEN*) i genomskom nestabilnošću koja je posledica mutacija u genima popravljajima DNK (*BRCA1*, *BRCA2*) (IMRAN et al., 2017; Mylavarapu et al., 2018).

Za te tri vrste mutacija postoje novi biološki lekovi a tačan lek se određuje na osnovu genetske analize. Na primer, rucaparib je ADP-riboza polimerazni inhibitor (PARP) koji se koristi u lečenju pacijentkinja sa *BRCA1* i *BRCA2* mutacijama (naslednim germinativnim ili somatskim) koje imaju karcinom ovarijuma, tube ili primarni karcinom peritoneuma rezistentan na dve ili više hemioterapija (Pennington et al., 2014).

U neoplastičnim matičnim ćelijama razni signalni putevi igraju vodeću ulogu u samobnavljanju i preživljavanju. Pošto je tumorska ćelija dediferenciranjem, vrativši se do stadijuma matične ćelije, stekla sve metaboličke puteve koje je prethodno izgubila svrha savremene terapije je da se pomoću metaboličkih blokatora, npr. berberin, dipiridamol, propranolol istovremeno izblokiraju svi metabolički putevi tumora. Dodatni lekovi poput salinomicina ili EGCG (epigalotakehin-3 galat) specifično deluju na matične ćelije ("FoundationOne CDx | Foundation Medicine," 2021).

Pokazano je da kod trostruko negativnih karcinoma dojke propranolol zajedno sa metforminom smanjuje rast tumora kao i rizik od pojave metastaza i tako utiče na poboljšanje preživljavanja kod bolesnica sa ovim tipom karcinoma dojke (Pantziarka et al., 2018).

Zato je neophodno pronaći nove mete za ciljanu/biološkoterapiju u TNBC. Komponente ključnih signalnih puteva kao što je PAM signalni put izmenjene su u TNBC i omogućavaju tumorskim ćelijama da prežive terapiju, da rastu i metastaziraju. ABC transporteri su takođe kandidat za biološku terapiju.. Kako su istraživanja u toku, postoje brojni agensi.

Honokiol, derivat familije Magnoliaceae, je inhibitor NF-kb, EGFR, m-TOR i MAPK-a i tako suprimira citokine, inducibilne enzime, adhezivne molekule i ključne molekule odgovorne za ćelijski ciklus i apoptozu utičući na smanjenje proliferacije, angiogeneze, invaziju i pojavu metastaza (Arora et al., 2012). Honokiol suprimira aktivaciju mTOR-a i njegove medijatore 4E-BP1 i p70 S6 kinaze (S6K) bilo inhibicijom AKT puta bilo povećanom ekspresijom PTEN-a. Honokiol u kombinaciji sa mTOR inhibitorima (Rapamycin) se koristi u lečenju agresivnih i hemorezistentnih karcinoma dojke. Naime, pokazano je da Honokiol suprimira Ras protein kao i Ras zavisnu fosfolipazu inhibišući EGFR kod ćelija karcinoma dojke. Poznato je da je EGFR visoko eksprimiran u različitim karcinomima i da mu je uloga da promoviše proliferaciju i ćelijski rast aktivacijom PI3K/Akt i mitogen aktivirane protein kinaze (MAPK). Najzad, takođe pokazano je da inhibicija NF-kB nishodnom regulacijom utiče na smanjenu ekspresiju P-glikoproteina i tako utiče na povećanu osetljivost tumorskih ćelija na hemioterapeutike (Arora et al., 2012) Sa druge strane PAM put preko NF-kB dovodi do povećane ekspresije P-glikoproteina (Dong et al., 2021).

Alpelisib, kinazni inhibitor u kombinaciji sa fulvestrantom koji je antiestrogen su se pokazali uspešnim u lečenju HR+ karcinoma dojke, HER2 negativnih, *PIK3CA* mutiranih uznapredovalih ili metastatskih karcinoma dojke (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Inhibitori zavisnih kinaza CDK4/6 su se pokazali efikasnim kod ER+ karcinoma dojke (Li et al., 2020).

Dvojni inhibitori PI3K/AKT/mTOR signalnog puta kao što su inhibitori mTOR-a i AKT-a su kod TNBC pokazali sinergističko dejstvo (Chan et al., 2019).

Gedatolisib (inhibitor PI3K i mTORC inhibitor) kao i inhibitor PI3K zajedno sa AKT inhibitorima pokazali su efikasnim u lečenju endometrijalnih tumora. Međutim ciljana terapija na molekule PAM signalnog puta u lečenju TNBC još je u razvoju i nedovoljno je razjašnjena (Costa et al., 2018).

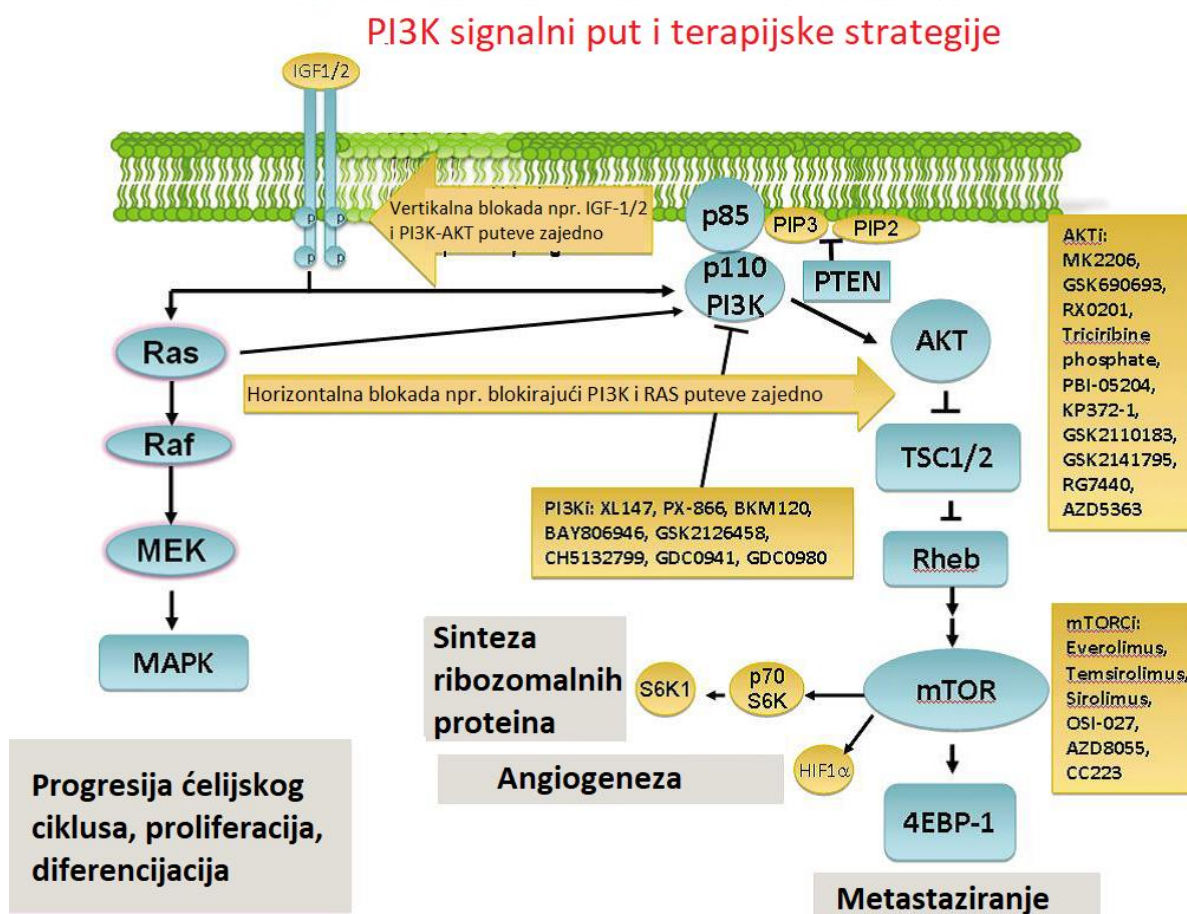
Trenutna terapija izbora za trostruko negativne karcinome dojke je citotoksična hemioterapija, uključujući antracikline, antimetabolite i taksanepošto nije moguće primeniti ni endokrinu (modulatori ER receptora, Tamoksifen) i/ili biološku terapiju (monoklonska antitela/ inhibitori tizoin kinaze na HER2 neu/EGFR, Herceptin) (Wahba and El-Hadaad, 2015).

Upravo zato je lečenje ovih karcinoma veoma teško, jer većina pacijentkinja nema odgovor na hemioterapiju ili inicijalno odgovore na citotoksične agense ali ubrzo dolazi do rezistencije uz smanjeno ukupno preživljavanje i pojavu metastaza (Bosch et al., 2010; Yu et al., 2013).

Matične ćelije kancera (SCS) i progenitorske ćelije kod TNBC mogu biti odgovorne za rezistenciju na hemoterapeutike različitim mehanizmima kao što prekomerna ekspresija ABC

transportera i abnormalna aktivacija brojnih signalnih puteva među kojima je i PI3K/AKT/mTOR signalni put (Dean et al., 2005; Li et al., 2008; Denisov et al., 2014).

Povećana ekspresija MDR1 proteina a sa druge strane oštećen signalni PAM signalni put (*PI3K* mutacija, inaktivaciju *PTEN-a*, *AKT* i *mTOR* mutacija) mogu doprineti u značajnoj meri rezistenciji TNBC na terapiju i ukazati na eventualne nove markere, koji bi doprineli razvoju novih terapijskih modaliteta, što će u najvećem obimu biti tema ove studije. (Hasanabady and Kalalinia, 2016; Ullah, 2008; Chan et al., 2019).



Slika 13. Mogući terapijski modaliteti PAM signalnog puta.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opšti cilj ove studije bio je da se ispita status i uloga PTEN/PI3K/AKT/mTOR signalnog puta i MDR1 proteina u progresiji trostruko negativnih karcinoma dojke i rezistenciji na terapiju. U skladu sa tim definisani su konkretni ciljevi rada:

-Analizirati međuzavisnost ekspresije PTEN, PI3K i mTOR proteina kako u odnosu na patohistološke faktore prognoze (veličina tumora, histološki tip, histološki gradus, status regionalnih - aksilarnih limfnih čvorova i status udaljenih limfnih čvorova i pojavu metastaza) tako i u odnosu na ishod bolesti (ukupno preživljavanje i preživljavanje bez znakova bolesti).

-Odrediti status *PTEN* gena analizom gubitka heterozigotnosti (LOH) kao pretpostavljenog najbitnijeg mehanizma inaktivacije ovog tumor supresor gena. Analizirati međuzavisnost delecije *PTEN* gena sa patohistološkim faktorima prognoze (veličina tumora, histološki tip, histološki gradus i status regionalnih - aksilarnih limfnih čvorova i status udaljenih limfnih čvorova i pojavu metastaza) i sa ishodom bolesti (ukupno preživljavanje i preživljavanje bez znakova bolesti).

-Analizirati delecioni status *PTEN* gena u odnosu na status ekspresije PTEN proteina kao i u odnosu na ekspresioni status ostalih ključnih molekula PAM signalnog puta.

-Analizirati potencijalnu zavisnost nivoa ekspresije MDR1 proteina u odnosu na patohistološke faktore prognoze (veličina tumora, histološki tip, histološki gradus, status regionalnih - aksilarnih limfnih čvorova i status udaljenih limfnih čvorova i pojavu metastaza) i u odnosu na ishod bolesti (ukupno preživljavanje i preživljavanje bez znakova bolesti).

-Analizirati međuzavisnost ekspresionog statusa MDR1 proteina, delecije *PTEN* tumor supresor gena i ekspresije ključnih molekula PTEN/PI3K/Akt/mTOR signalnog puta.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Ova studija je obuhvatila analizu ukupno 70 patohistoloških uzoraka bolesnica obolelih od trostruko negativnih karcinoma dojke (TNBC). Kontrolnu grupu su predstavljala 46 uzorka bolesnica obolelih od hormon zavisnih karcinoma dojke (ER+, PR+, HER2/Neu+). Korelaciona analiza proteinske ekspresije PTEN, PI3K i mTOR gena kao i gubitka heterozigotnosti (LOH) *PTEN* gena urađena je na uzorku od 70 TNBC pacijentkinja i 16 pacijentkinja iz kontrolne grupe. Za analizu ekspresije MDR1 proteina na raspolaganju smo imali 66 TNBC uzoraka i 46 uzoraka iz kontrolne grupe. Ova diskrepanca u broju uzoraka objašnjava se potrošnjom materijala, tj. gubitkom tumorskog reprezentativnog tkiva prilikom pripreme materijala za imunohistohemijsku ili molekularnu analizu.

Za sve analize korišćen je arhivirani materijal (pisana dokumentacija, parafinski kalupi, patohistološki preparati) Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS) u periodu od 2005. godinedo 2010. godine. Pisana dokumentacija, tj. istorije bolesti, korišćena je u cilju dobijanja kliničkih podataka (klinički i patohistološki parametri, primenjena terapija, preživljavanje bolesnica). Period praćenja bolesnica bio je između 7 i 156 meseci. ER, PR i HER2 status je određivan rutinskom semikvantitativnom imunohistohemijskom metodom iz parafinskih kalupa tumorskog tkiva i na osnovu toga klasifikovani su kaotrostruko negativni (TNBC) i hormonskizavisni (ER+) tumori.

Arhivirani parafinski kalupi su korišćeni za imunohistohemijsku analizu PTEN, PI3K, mTORi MDR1 proteina kao i za analizu gubitka heterozigotnosti (LOH) *PTEN* tumor supresor gena.

Patohistološko i imunohistohemijsko istraživanje je obavljeno u IORS-u, na Odeljenju za citologiju i patohistologiju, a genetičko oistraživanje je obavljeno u Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković".

Za korišćenje humanog materijala u naučno-istraživačke svrhe dobijena je saglasnost Etičkog odbora Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije br. 900-01. Uzorci su sakupljeni i analizirani u skladu sa etičkim standardima Helsinške deklaracije donete 1964. godine.

3.2. Metodologija rada

Analizirana je imunohistohemijska ekspresija PTEN, PI3K i mTOR i MDR1 proteina, njihova međuzavisnost kao i njihova zavisnost sa ostalim patohistološkim faktorima prognoze od kojih su ključni:

- veličina (T), histološki tip i histološki gradus tumora (G1-G3)
- status regionalnih limfnih čvorova (L0-L3) i udaljenih metastaza (M1-M3)

Prognostički značaj ekspresije PTEN, PI3K i mTOR proteina za ispitivanu i kontrolnu grupu određivao se kroz:

- verovatnoću ukupnog preživljavanja (OS)
- verovatnoću preživljavanja bez znakova (relapsa) bolesti (DFI)

Pored toga, analiziran je gubitak heterozigotnosti (LOH) *PTEN* gena u odnosu na smanjenu i /ili odsutnu PTEN proteinsku ekspresiju i u odnosu na kliničko patološke parametre.

3.2.1. Ispitivani parametri trostrukonegativnih karcinoma dojke

A) Starost bolesnica

Prema životnoj dobi bolesnice su podeljene u dve grupe, premenopauzne, <50 godina starosti i postmenopauzne, ≥50 godinastarosti.

B) Veličina tumora

Prema veličini tumora, T parametri iz TNM klasifikacije označeni su kao T1: ≤20mm, T2: > 20mm i ≤ 50mm, T3: > 50mm, T4: bilo koja veličina sa širenjem na zid grudnog koša, kožu. Veličina tumora merena je u tri dimenzije i izražavana je u milimetrima (mm) (American Joint Comitee on Cancer, AJCC Cancer Staging Manual Sixth Edition. New York, Springer 2002).

C) Histološki tip tumora

Histološki tipovi karcinoma prema Svetskoj Zdravstvenoj Organizaciji – SZO (eng. *World Health Organization-WHO*) klasifikovani su u: invazivni duktalni karcinom – NST (eng. *No Special Type*), invazivni lobularni karcinom, medularni karcinom, mucinozni karcinom, papilarni karcinom, tubularni karcinom, adenoid cistični karcinom, sekretorni karcinom, apokrini karcinom, karcinom sa metaplazijom i Padžetova bolest dojke (lat. *Morbus Paget mammilae*).

D) Histološki gradus tumora

Histološki gradus tumora određen je na osnovu histoloških karakteristika i prikazan kao G1-dobro diferentovani tumor, G2-umereno diferentovani tumor i G3-slabo diferentovani tumor (sistem Scarff-Bloom Richardson).

E) Limfonodalni status i regionalne metastaze

Ovaj parametar se odnosi na prisustvo ili odsustvo regionalnih metastaza u regionalnim-aksilarnim limfnim nodusima, i definiše se kao: N0 – bez metastaza, i Nx – sa metastazama u više regionalnih limfnih nodusa i to N1:1-3, N2:4-9 i N3:>9.

F) Udaljene metastaze

Parametar se odnosi na prisustvo metastaza u udaljenim limfnim nodusima i metastazama u udaljenim organima (pluća, kosti, mozak i dr), i označava se kao M0 – nema metastaza i M1 – ima metastaza.

3.2.2. Metodologija određivanja ekspresije PTEN, PI3K, mTOR i MDR1 proteina, kao i ER, PR i HER2 receptora

Imunohistohemijska (IHC) analiza podrazumeva vezivanje antitela za antigene u analiziranom uzorku tkiva koje posmatramo. Procena nivoa imunohistohemijske ekspresije, primarna i sekundarna antitela dobijena su u zavisnosti od ispitivanog proteina. Testiranje IHC-ih preparata izvršeno je nezavisno od strane dva patologa na svetlosnom mikroskopu. (Olympus BX50, Olympus, Tokijo, Japan)

3.2.2.1. Metoda određivanja ekspresije PTEN proteina

Za imunohistohemijsko određivanje ekspresije proteina korišćeni su parafinski preseći debljine 3-5 mikrona postavljeni na Super-Frost pločice (KEFO, Beograd, Srbija). Redosled događaja podrazumeva sledeće korake:

- sušenje u inkubatoru (DAKO, Kopenhagen, Danska) na 56 stepeni preko noći (18 sati);
- deparafinizacija ksilolom 2x15min;
- dehidracija alkoholom 100% 2x15min, 96% 2x10min, destilovana voda 2x2min;
- demaskiranje antigena puferom Target Retrieval Solution (DAKO, Kopenhagen, Danska) 10x conc. pH=9 u vodenom kupatilu na 95 stepeni 45min;
- hlađenje u istom puferu (Target Retrieval Solution 10xconc. pufer pH=9) na sobnoj temperaturi, ispiranje u destilovanoj vodi i primena TBS-a (DAKO, Kopenhagen, Danska) 2x2min;

-blokiranje endogene peroksidaze 3% vodonik peroksidom 5min, zatim ispiranje destilovanom vodom i primena TBS-a 2x2min;

-dodavanje primarnog mišjeg monoklonskog antitela (Monoclonal Mouse Anti-Human PTEN), Clone 6H2.1 (DAKO, Kopenhagen, Danska) sa razblaženjem u razmeri 1:100 razređivačem antitela koji smanjuje pozadinski signal (Antibody Diluent with Background Reducing Components, DAKO, Kopenhagen, Danska) 60min

-primena TBS-a 2x2 min

-bojenje uzorka sekundarnim antitelom i vizuelizacija proteinske ekspresije, tačnije primena zečijeg antimišijeg antitela za koje se vezuje polivalentno kozje antizečije antitelo uz inkubaciju 30 min i polimerizacioni sistem ("ready to use" kit Dako Envision System+ HRP) u dva sledeća koraka:

1. HRP obeležen polimer sa sekundarnim antitelom LSAB+HRP Link 15-30 min zatim ponovo TBS 2x2min, LSAB +HRP streptavidin peroksidase 15-30 min, TBS 2x2min (DAKO, Kopenhagen, Danska);

2. kontrastno hematoksilinsko bojenje primenom Chromogen-Liquid DAB+ (1ml supstrata+ 1 kap hromogena), inkubacija 5-10min;

-ispiranje destilovanom vodom 2x2min, kontrastiranje Majerovim hematoksilinom 2-5min, ispiranje destilovanom vodom i

-dehidracija (96% alkohol 2x5min, 100% alkohol 2x5min, ksilol 2x5min)

i pokrivanje pločica DPX-om. (DAKO, Kopenhagen, Danska).

Analiza PTEN imunoreaktivnosti podrazumeva semikvantitativnu metodu (H skor) baziranu na broju bodova za obojenost ćelija sabirajući procenat obojenosti ćelija (0: bez imunoreaktivnosti, 1: 1-10%, 2: 11-50%, 3:51-100%) i intenzitet bojenja (0:bez imunoreaktivnosti, 1:smanjen intenzitet bojenja u odnosu na normalne strukture, 2: isti intenzitet bojenja kao normalne strukture, 3: blago pojačan intenzitet bojenja, 4: umereno pojačan intenzitet bojenja, 5: jako pojačan intenzitet bojenja). Maksimalan broj bodova (skor) je 8, pri čemu je pozitivan skor ≥ 4 a negativan < 4 . Za pozitivnu kontrolu koristili smo okolno zdravo tkivo dojke (Shi et al, 2003).

3.2.2.2. Metoda određivanja ekspresije PI3K proteina

Za imunohistohemijsko određivanje ekspresije PI3K proteina korišćeni su parafinski preseći debljine 3-5 mikrona postavljeni na Super-Frost pločice (KEFO, Beograd, Srbija).

Pravljenje IHC preparata podrazumeva sledeće korake:

-sušenje u inkubatoru (DAKO, Kopenhagen, Danska) na 56 stepeni preko noći, 18 sati;

-deparafinizacija ksilolom 2x15min;

-dehidracija alkoholom 100% 2x15min, 96% 2x10min, destilovana voda 2x2min;

-demaskiranje antigena citratim puferom Target Retrieval Solution (DAKO, Kopenhagen, Danska) 10x conc. pH=6 u vodenom kupatilu na 95 stepeni, 45min;

-hlađenje u istom puferu (Target Retrieval Solution 10xconc. pufer pH=6) na sobnoj temperaturi, ispranje u destilovanoj vodi i primena TBS-a (DAKO, Kopenhagen, Danska) 2x2min;

-blokiranje endogene peroksidaze 3% vodonik peroksidom 5min zatim ispiranje destilovanom vodom i primena TBS-a 2x2min;

-dodavanje primarnog mišijeg monoklonskog antitela (Monoclonal Mouse Anti-PI3K, ab86714 Abcam, Kembridž, Engleska) sa razblaženjem u razmeri 1:100 sa razređivačem antitela koji smanjuje pozadinski signal (Antibody Diluent with Background Reducing Components, DAKO, Kopenhagen, Danska), 60min;

-primena TBS-a 2x2 min;

-bojenje uzorka sekundarnim antitelom i vizuelizacija proteinske ekspresije, tačnije primena zečijeg antimišijeg antitela za koje se vezuje polivalentno kozje antizečije antitelo uz inkubaciju 30 min i polirazacioni sistem ("ready to use" kit Dako Envision System+ HRP) u dva sledeća koraka:

1. HRP obeležen polimer sa sekundarnim antitelom LSAB+HRP Link 15-30 min zatim ponovo TBS 2x2min, LSAB +HRP streptavidin peroksidase 15-30 min, TBS 2x2min (DAKO, Kopenhagen, Danska);

2. kontrastno hematoksilinsko bojenje primenom Chromogen-Liquid DAB+ (1ml supstrata+ 1 kap hromogena), inkubacija 5-10min;

-ispiranje destilovanom vodom 2x2min, kontrastiranje Majerovim hematoksilinim 2-5min, ispiranje destilovanom vodom, i

-dehidracija (96% alkohol 2x5min, 100% alkohol 2x5min, ksilol 2x5min)

i pokrivanje pločica DPX-om. (DAKO, Kopenhagen, Danska)

Analiza PI3K imunoreaktivnosti podrazumeva semikvantitativnu metodu (Q skor) baziranu na broju bodova za obojenost ćelija pri čemu se sabiraju bodovi za procenat obojenih ćelija (0:bez imunoreaktivnosti, 1: <1%, 2: 1-10%, 3: 11-33%, 4: 34-66%, 5: 67-100%) i intenzitet obojenosti ćelija (0:bez imunoreaktivnosti, 1:slabo (vidljivo samo na najvećem uveličanju, 2: umereno: vidljivo na malom uveličanju, 3: intenzivno vidljivo na malom uveličanju). Maksimalan broj bodova je 8 pri čemu je pozitivan skor ≥ 3 a negativan < 3 . Kako nije utvrđena granična vrednost ("cutoff") za procenu PI3K iminohistohemijske ekspesije korišćena je medijana broja bodova 6 (skor) kao granična vrednost da bi se dobile vrednosti za nisku (skor ≤ 6) i visoku ekspesiju (skor > 6). Kao kontrolno tkivo koristili smo tkivo poprečno prugastog mišića.

3.2.2.3. Metoda određivanja ekspresije mTOR proteina

Za imunohistohemijsko određivanje ekspresije mTOR proteina korišćeni su parafinski preseci debljine 3-5 mikrona postavljeni na Super-Frost pločice (KEFO, Beograd, Srbija).

Priprema IHC preparata za mTOR analizu podrazumeva sledeće korake:

- sušenje u inkubatoru (DAKO, Kopenhagen, Danska) na 56 stepeni preko noći, 18 sati;
- deparafinizacija ksilolom 2x15min;
- dehidracija alkoholom 100% 2x15min, 96% 2x10min, destilovana voda 2x2min;
- demaskiranje antigena citratnim puferom Target Retrieval Solution (DAKO, Kopenhagen, Danska) 10x conc. pH=6 u vodenom kupatilu na 95 stepeni 45min;

- hlađenje u istom puferu (Target Retrieval Solution 10x conc. pufer pH=6) na sobnoj temperaturi, ispranje u destilovanoj vodi i primena TBS-a (DAKO, Kopenhagen, Danska) 2x2min;

- blokiranje endogene peroksidaze 3% vodonik peroksidom 5 min, ispiranje destilovanom vodom i primena TBS-a 2x2min;

- dodavanje primarnog mišijeg monoklonskog antitela (Monoclonal Mouse Anti-mTOR, ab25880 (Abcam, Kembridž, Engleska) sa razblaženjem u razmeri 1:100 sa razređivačem antitela koji smanjuje pozadinski signal (Antibody Diluent with Background Reducing Components, DAKO, Kopenhagen, Danska), 60min;

- primena TBS-a 2x2 min;

- bojenje uzorka sekundarnim antitelom i vizuelizacija proteinske ekspresije, tačnije primena zečijeg antimišijeg antitela za koje se vezuje polivalentno kozje antizečije antitelo uz inkubaciju 30 min i polirazacioni sistem ("ready to use" kit Dako Envision System+ HRP) u dva sledeća koraka:

1. HRP obeležen polimer sa sekundarnim antitelom LSAB+HRP Link 15-30 min zatim ponovo TBS 2x2min , LSAB +HRP streptavidin peroksidase 15-30 min, TBS 2x2min (DAKO, Kopenhagen, Danska);

2. kontrstno hematoksilinsko bojenje primenom Chromogen-Liquid DAB+ (1ml supstrata+ 1 kap hromogena), inkubacija 5-10min;

- ispiranje destilovanom vodom 2x2min, kontrastiranje Majerovim hematoksilinim 2-5min, ispiranje destilovanom vodom i

- dehidracija (96% alkohol 2x5min, 100% alkohol 2x5min, ksilol 2x5min)

- i pokrivanje pločica DPX-om. (DAKO, Kopenhagen, Danska).

Analiza mTOR proteinske imunoreaktivnosti podrazumeva semikvantitativnu metodu (Q skor) baziranu na zbiru bodova za procenat obojenosti ćelija (0: bez imunoreaktivnosti, 1: <1%, 2: 1-10%, 3: 11-33%, 4: 34-66%, 5: 67-100%) i intenzitet obojenosti ćelija (0:bez imunoreaktivnosti, 1:slabo (vidljivo samo na najvećem uveličanju, 2: umereno: vidljivo na malom uveličanju, 3:

intenzivno vidljivo na malom uvećanju). Maksimalan broj bodova je pri čemu je pozitivan skor ≥ 3 a negativan < 3 . Pošto nije utvrđena granična vrednost za procenu mTOR-a iminohistohemijske ekspresije, korišćena je medijana broja bodova 6 (skor 6) kao granična vrednost da bi se dobile vrednosti za nisku (skor ≤ 6) i visoku ekspresiju (skor > 6). Kao kontrolno tkivo koristili smo tkivo testisa.

3.2.2.4. Metoda određivanja ekspresije MDR1 proteina

Za imunohistohemijsko određivanje ekspresije MDR1 proteina korišćeni su parafinski preseci debljine 3-5 mikrona postavljeni na Super-Frost pločice (KEFO, Beograd, Srbija).

Protokol preparacije podrazumeva sledeće korake:

- sušenje u inkubatoru (DAKO, Kopenhagen, Danska) na 56 stepeni preko noći, 18 sati;
- deparafinizacija Ksilolom 2x15min;
- dehidracija alkoholom 100% 2x15min, 96% 2x10min, destilovana voda 2x2min;
- demaskiranje antigena EDTA puferom (eng. Epitop Retrieval Solution , RE71116-CE, Novocastra, Leica Biosystems, Nusloh, Nemačka)10x conc. pH=8 u vodenom kupatilu na 100 stepeni 20min;
- hlađenje u istom puferu na sobnoj temperaturi, ispranje u destilovanoj vodi i primena TBS-a 2x2min;
- blokiranje endogene peroksidaze 3% vodonik peroksidom 5min zatim ispiranje destilovanom vodom i primena TBS-a 2x2min;
- dodavanje primarnog mišijeg monoklonskog antitela (Monoclonal Mouse Anti-ABCB1, ab10333 (Abcam, Kembriđ, Engleska) sa razblaženjem u razmeri 1:100 sa razređivačem antitela koji smanjuje pozadinski signal (Antibody Diluent with Background Reducing Components, DAKO, Kopenhagen, Danska) 60min;
- primena TBS-a 2x2 min;
- bojenje uzorka sekundarnim antitelom i vizuelizacija proteinske ekspresije, tačnije primena sekundarnog zečijeg antimišijeg antitela za koje se vezuje kozje antizečije antitelo uz inkubaciju 30 min i polirazacioni sistem ("ready to use" kit Dako Envision System+ HRP) u dva sledeća koraka:
 1. HRP obeležen polimer sa sekundarnim antitelom LSAB+HRP Link 15-30 min zatim ponovo TBS 2x2min, LSAB +HRP streptavidin peroksidase 15-30 min, TBS 2x2min (DAKO, Kopenhagen, Danska);
 2. kontrastno hematoksilinsko bojenje primenom Chromogen-Liquid DAB+ (1ml supstrata+ 1 kap hromogena), inkubacija 5-10min;

-ispiranje destilovanom vodom 2x2min, kontrastiranje Majerovim hematoksilinim 2-5min, ispiranje destilovanom vodom i

-dehidracija (96% alkohol 2x5min, 100% alkohol 2x5min, ksilol 2x5min)

i pokrivanje pločica DPX-om. (DAKO, Kopenhagen, Danska).

Analiza MDR1 imunoreaktivnosti podrazumeva semikvantitativnu metodu (Q skor) baziranu na bodovanju procenta obojenih ćelija (0: bez imunoreaktivnosti, 1: <1%, 2: 1-10%, 3: 11-33%, 4: 34-66%, 5: 67-100%) i intenzitetu bojenja (0: bez imunoreaktivnosti, 1: slabo (vidljivo samo na najvećem uveličanju, 2: umereno :vidljivo na malom uveličanju, 3: intenzivno vidljivo na malom uveličanju). Bodovi se sabiraju. Maksimalan broj bodova (skor) je 8 pri čemu je pozitivan skor ≥ 4 a negativan < 4 . Kao kontrolno tkivo koristili smo tkivo posteljice.

3.2.2.5. Metoda određivanja steroidnih receptora (ER i PR)

Za imunohistohemijsko određivanje ekspresije ER i PR korišćeni su parafinski preseći debljine 3-5 mikrona postavljeni na Super-Frost pločice pločice (KEFO, Beograd, Srbija).

Priprema IHC preparata je rađena na sledeći način:

-sušenje u inkubatoru (DAKO, Kopenhagen, Danska) na 56 stepeni tokom noći, 18 sati;

-deparafinizacija ksilolom 2x15min ;

-dehidracija (alkohol 100% 2x15min, 96% 2x10min, destilovana voda 2x2min);

-demaskiranje antigena (Target Retrieval Solution 10xconc. pufer pH=9 za ER i pH= 6 za PR) u mikrotalasnoj pećnici na 800W 30min (DAKO, Kopenhagen, Danska);

-hlađenje u istom puferu na sobnoj temperaturi 20 min;

-ispiranje u destilovanoj vodi i primena TBS-a 2x2min;

-blokiranje endogene peroksidaze 3% vodonik peroksidom 5min a zatim ispiranje destilovanom vodom i primena TBS-a 2x2min;

-aplikovanje primarnog mišjeg antitela (Monoclonal Mouse Anti Human Estrogen Receptor alfa Clone i D5 i Monoclonal Mouse Anti Human Progesteron Receptor PgP 636 Clone (DAKO, Kopenhagen, Danska) sa razblaženjem u razmeri 1:50, sa razređivačem antitela koji smanjuje pozadinski signal (Antibody Diluentom with Background Reducing Components, DAKO, Kopenhagen, Danska) 30min;

-primena TBS-a 2x2 min;

-bojenje uzorka sekundarnim antitelom i vizuelizacija proteinske ekspresije, tačnije primena zečijeg antimišjeg antitela za koje se vezuje polivalentno kozije antizečije antitelo uz inkubaciju 30 min i polirazacioni sistem ("ready to use" kit Dako Envision System+ HRP) u dva sledeća koraka:

1. HRP obeležen polimer sa sekundarnim antitelom LSAB+HRP Link 15-30 min zatim ponovo TBS 2x2min, LSAB +HRP streptavidin peroksidase 15-30 min, TBS 2x2min (DAKO, Kopenhagen, Danska);

2. kontrastno hematoksilinsko bojenje primenom Chromogen-Liquid DAB+ (1ml supstrata+ 1 kap hromogena), inkubacija 5-10min;

-ispiranje destilovanom vodom 2x2min, kontrastiranje Majerovim hematoksilinim 2-5min, ispiranje destilovanom vodom i

-dehidracija (96% alcohol 2x5min, 100% alkohol 2x5min, ksilol 2x5min

i pokrivanje pločica DPX-om (DAKO, Kopenhagen, Danska).

Analiza ER i PR imunoreaktivnosti podrazumeva semikvantitativnu metodu (H skor) baziranu na bodovanju obojenosti procenta obojenih ćelija (0: bez imunoreaktivnosti, 1: 1-10%, 2: 11-50%, 3:51-100%) i intenzitetu bojenja (0:bez imunoreaktivnosti, 1: smanjen intenzitet bojenja u odnosu na normalne strukture, 2: isti intenzitet bojenja kao normalne strukture, 3: blago pojačan intenzitet bojenja, 4: umereno pojačan intenzitet bojenja, 5: jako pojačan intenzitet bojenja). Bodovi se sabiraju a maksimalan broj bodova (skor) je 8, pri čemu je pozitivan skor ≥ 4 a negativan < 4 (Leake et al., 2000).

3.2.2.6. Metoda određivanja HER2 receptorskog statusa (Human Epidermal Growth Factor Receptor)

Za imunohistohemijsko određivanje ekspresije c-ERBb2 (HER-2) proteina korišćeni su parafinski preseki debljine 3-5 mikrona postavljeni na Super-Frost pločice (KEFO, Beograd, Srbija).

Preparati za IHC analizu su pripremani na sledeći način:

-sušenje u inkubatoru (DAKO, Kopenhagen, Danska) na 56 stepeni preko noći, 18 sati;

-deparafinizacija ksilolom 2x15min;

-dehidracija (alkohol 100% 2x15min, 96% 2x10min, destilovana voda 2x2min);

-demaskiranje antigena citratnim puferom (Target Retrieval Solution 10xconc. pufer pH=6, DAKO, Kopenhagen, Danska) u mikrotalasnoj pećnici na 800W 30min;

-hlađenje na sobnoj temperaturi 20 min u istom puferu (Target Retrieval Solution 10xconc. Pufer pH=6, destilovana voda) i primena TBS-a 2x2min;

-blokiranje endogene peroksidaze 3% vodonik peroksidom 5min, zatim ispiranje destilovanom vodom i primena TBS-a 2x2min;

-aplikovanje primarnog zečijeg antitela Abcam (Polyclonal Rabitt Anti Human c-erbB-2 Oncoprotein, DAKO, Kopenhagen, Danska) sa razblaženjem 1:300, sa razređivačem antitela koji

smanjuje pozadinski signal (Antibody Diluentom with Background Reducing Components, DAKO, Kopenhagen, Danska) 30min

-primena TBS-a 2x2 min;

-bojenje uzorka sekundarnim antitelom i vizuelizacija proteinske ekspresije, tačnije primena polivalentnog kozijeg antizečijeg antitela uz inkubaciju 30 min i polirazacioni sistem ("ready to use" kit Dako Envision System+ HRP) u dva sledeća koraka:

1. HRP obeležen polimer sa sekundarnim antitelom LSAB+HRP Link 15-30 min zatim ponovo TBS 2x2min , LSAB +HRP streptavidin peroksidase 15-30 min, TBS 2x2min (DAKO, Kopenhagen, Danska);

2. kontrastno hematoksilinsko bojenje primenom Chromogen-Liquid DAB+ (1ml supstrata+ 1 kap hromogena) inkubacija 5-10min;

-ispiranje destilovanom vodom 2x2min, kontrastiranje Majerovim hematoksilinim 2-5min, ispiranje destilovanom vodom i

-dehidracija (96% alcohol 2x5min, 100% alkohol 2x5min, ksilol 2x5min

i pokrivanje pločica DPX-om (DAKO, Kopenhagen, Danska).

Analiza c-erbB-2 imunoreaktivnosti podrazumeva metodu baziranu na proceni membranskog bojenja ćelija (0:bez membranskog bojenja ili slabo bojenje u manje od 10% tumorskih ćelija ,1+: slabo diskontinuirano membransko bojenje u više od 10% tumorskih ćelija 2+: slabo do umereno kontinuirano membransko bojenje u više od 10% tumorskih ćelija, 3+: jako kontinuirano membransko bojenje u više od 10% tumorskih ćelija.

Tumori sa skorom 0 i 1+ označeni su kao HER2 negativni tumori , dok su tumori 3+ HER2 pozitivni tumori. Tumori sa 2+ skorom smatraju se slabo pozitivnim i ekspresioni status je proveravan CISH metodom (eng. *chromogenic in-situ hybridization*) (Wolff et al., 2007).

3.2.3. Metoda za detekciju gubitka heterozigotnosti (LOH) *PTEN* gena

3.2.3.1. Izolacija DNK iz parafinskih kalupa

DNK je izolovana upotrebom komercijalnog kita Kapa Biosystems Express Extract Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA). Korišćenje protokol za izolaciju preporučen od strane proizvođača. ExpressExtract Kit omogućava brzu i efikasnu izolaciju DNK. Izolacija se odvija u jednoj tubi u samo dva koraka: liza i inaktivacija enzima. Reakciona smeša od 100 µl sastoji se iz:

1. 10 µl 10X KAPA Express Extract Pufera (finalna koncentracija 1X)
2. 2 µl U/µL KAPA Express Extract Enzima (finalna koncentracija 2U)
3. 88 ml DEPC-H₂O

Za izolaciju DNK korišćena su do dva preseka debljine 10 μm po reakciji. Pre pristupanja izolaciji uklonjen je višak parafina sa preseka. Za korak lize, uzorci su inkubirani 30 minuta na 75°C , a zatim 5 minuta na 95°C kako bi se inaktivirao enzim. Na kraju su tube centrifugirane 1 minut na maksimalnoj brzini. Parafin koji pluta na površini i talog su odbačeni dok je supernatant koji sadrži DNK pažljivo prenet u drugu tubu. Korak centrifugiranja se ponavlja kako bi se potpuno uklonio zaostali parafin. Izolovana DNK je dalje prečišćena metodom etanolske precipitacije. So i etanol (EtOH) čine DNK manje hidrofилnom i omogućavaju njenu precipitaciju iz rastvora. U prvom koraku etanolske precipitacije u uzorke je dodavan 7,5 M amonijum-acetat ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$) u zapremini od 20% volumena uzorka. Zatim je dodavan apsolutni etanol na -20°C u zapremini od 2.5 zapremina uzorka. Nakon inkubacije od 2-3h na temperaturi od -20°C uzorci su centrifugirani na $13400 \times g$ 15 minuta. Nakon odbacivanja supernatanta u uzorke je dodato po 300 ml 70% etanola praćeno centrifugiranjem 20 minuta na $13400 \times g$. Supernatant je zatim pažljivo uklonjen, a talog sušen 20 min na sobnoj temperaturi. Na kraju je DNK rastvorena u TE puferu (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA).

3.2.3.2. Određivanje koncentracije i provera kvaliteta izolovane DNK

Određivanje koncentracije izolovane DNK vršeno je spektrofotometrijski. Koncentracija izolovane DNK određena je merenjem apsorbance na BioSpec-nano aparatu (Shimadzu corporation, Japan). Uzorci kod kojih je odnos $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ bio između 1.7 i 2.1 smatrani su čistim i pogodnim za dalju analizu. Izmerene koncentracije molekula DNK bile se u opsegu od 90 do 1840 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Dodatna provera kvaliteta izolovanih molekula DNK (integritet DNK) vršena je elektroforezom na 1% agaroznom gelu bojenjem etidijum-bromidom (Et-Br). Gel je arhiviran pomoću sistema za snimanje gelova GS8000 (eng. *Gel Documentation System*, UVP inc, Upland SAD).

3.2.3.3. LOH analiza *PTEN* tumor supresor gena

Analiza LOH-a *PTEN* tumor supresor gena izvršena je metodom kvantitativni PCR u realnom vremenu (eng. *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*, RT-qPCR) baziranim na TaqMan tehnologiji. Broj kopija *PTEN* gena određen je korišćenjem Hs03007912_cn eseja (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). *RNase-P* je korišćena kao referentni gen (4403326, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Kao kontrola i kalibrator korišćena je DNK izolovana iz normalnog tkiva dojke. Svaka reakcija je uključivala i dve kontrole. Svi uzorci su pripremljeni u duplikatu, a kontrole u triplikatu. Svaka reakcija je uključivala i kontrolu bez uzorka (NTC – no template control). Zapremina pojedinačne reakcione smeše iznosila je 15 μl . Reakciona smeša je sadržala 1x TaqMan Master Mix, 1x TaqMan Copy Number *PTEN* Reference Assay i 40 ng

testirane DNK finalno (**Tabela 3.1.**). Reakcija je izvedena u ABI Prism 7500 Sequence Detection System aparatu (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Temperaturni profil reakcije dat je u **Tabeli 3.2.**

Dobijeni rezultati analizirani su korišćenjem RQ Study Add ON softvera 7500v 1.3 SDS instrument sa nivoom pouzdanosti od 95% ($p < 0.05$). Srednja vrednost Ct tačke duplikata/triplikata je korišćena za izračunavanje broja kopija gena na osnovu $2^{-\Delta\Delta CT}$ metode po Livaku. Budući da su svi uzorci tumora heterogeni, tj kontaminirani delovima normalnog tkiva, LOH *PTEN* gena klasifikovan je kao hemizigotna delecija, tj delecija jednog alela (LOH) ako je prosečna vrednost delecija qPCR bila $< 0,8$ i kao homozigotna delecija, tj delecija oba alela ako je prosečna vrednost $\leq 0,4$.

Tabela 3.1. Reakciona smeša za Copy number analizu *PTEN* gena (LOH)

Komponenta	Koncentracija komponenti poreakciji
TaqMan Copy Number Assay 20x	1x
TaqMan®2xUniversal PCR Master Mix	1x
DEPC-H2O	Do 15 μ l
Uzorak 10 ng/ μ l	40 ng (4 μ l)

Tabela 3.2. Temperaturni profil PCR reakcije u realnom vremenu za Copy Number reakcije (LOH analiza) *PTEN* gena

Korak	Aktivacija enzima	PCR	
	Hold	Ciklus (40 ciklusa)	
		Denaturacija	Hibridizacija/Elongacija
Temperatura	95°C	95°C	60°C
Vreme	10 minuta	15 sekundi	60 sekundi

3.2.4 Statistička analiza rezultata

Asocijacija LOH statusa *PTEN* tumor supresor gena i ekspresije *PTEN* proteina u TNBC analizirana je Fisher-ovim testom i Kappa testom. Korelacije između ekspresije analiziranih proteina (*PTEN*, *PI3K*, *mTOR*) kod bolesnica sa TNBC ispitivane su Spirmanovim testom (eng. *Spearman's tests*). Asocijacije ekspresije proteina *PTEN*, *PI3K* i *mTOR* između grupa bolesnica sa TNBC i HR+ ispitivane su pomoću Mann-Whitney U testa. Povezanost kliničko patoloških parametara TNBC-a sa delecijama *PTEN* gena i ekspresijom *PTEN*, *PI3K* i *mTOR* proteina analizirane su

Fišerovim testom (eng. *Fisher's exact test*) sa Freeman-Haltonextensionom ili Hi-kvadrat testom (eng. *Chi-square test*) zavisno od uslova ispitivanja. Asocijacije kliničko patoloških parametara tumora i ekspresije MDR1 proteina analizirane su korišćenjem Fišerovog testa (eng. *Fisher's exact test*) ili Hi-kvadrat testa (eng. *Chi-square test*), u zavisnosti od prirode ispitivanih parametara.

Kada su uzorci na osnovu ekspresije MDR1 proteina stratifikovani u dve grupe, asocijacije sa kliničko-patološkim parametrima tumora analizirane su Fišerovim testom. Kada stratifikacija uzoraka nije bila moguća, korelacije sa kliničko-patoloških parametarima tumora analizirane su Spirmanovim testom (eng. *Spearman's tests*).

Za testiranje razlika u ukupnom preživljavanju (OS) i preživljavanju bez bolesti (DFI) korišćen je Log Rank test a za prikaz ukupnog preživljavanja korišćena je *Kaplan-Meier* product-limit metoda, a za njihov opis, medijane *Survival Analysis* i odgovarajući 95% intervali poverenja (95% CI). Interval bez bolesti (DFI) računat je od dana nakon operacije do prvog dana progresije bolesti dok je ukupno preživljenje (OS) računato od dana nakon operacije do zadnjeg kontrolnog pregleda ili smrti pacijenta. Za nivo statističke značajnosti usvojena je vrednost $p \leq 0.05$. Analiza podataka izvršena je u statističkim programima GraphPad Prism 7 i 8 (GraphPad Software, Inc. CA, SAD). Za grafički prikaz podataka korišćen je Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft Corporation, One Microsoft Way, Redmond, WA 98052-7329, SAD) i GraphPad Prism 8.

4. REZULTATI

4.1. Opis cele ispitivane grupe i karakteristike bolesti

U studiju je uključena grupa od ukupno 70 patohistoloških uzoraka bolesnica obolelih od trostruko negativnih karcinoma doke (TNBC). Kontrolnu grupu čini 46 bolesnica obolelih od hormonski zavisnih karcinoma dojke (ER+).

Prema životnoj dobi bolesnice su podeljene u dve grupe, premenopauzne, ispod 50 godina starosti i postmenopauzne, iznad 50 godina starosti. Unutar TNBC grupe analizirali smo 70 bolesnica od kojih je 27% bolesnica ispod 50 godina starosti a 73% bolesnica iznad 50 godina starosti (**Tabela 4.1.**).

Tabela 4.1. Demografski podaci bolesnica

karakteristike	N (%)
Broj bolesnica	70(100%)
Životna dob (godine)	
<50	19(27%)
≥50	51(73%)

Najveći broj pacijentkinja bio je u T2 stadijumu bolesti (61%) a najmanji broj bolesnica u T3 i T4 stadijumu bolesti (13% i 26% bolesnica). U posmatranoj TNBC grupi 58% pacijentkinja lečilo se od duktalnog karcinoma dojke, 18% od lobularnog karcinoma dojke a 24% od ostalih ređih histoloških tipova karcinoma dojke. Unutar ispitivane grupe 61% bolesnica imalo je srednje diferentovan tumor gradusa G2 a 36% bolesnica slabo diferentovan tumor histološkog gradusa G3. Od ukupno 48% bolesnicasa metastazama u regionalnim limfnim nodusima 24% bilo je u N1 stadijumu bolesti, 17% u N2 i 7% u N3 stadijumu bolesti, a 52% bolesnica nije imalo metastaze u regionalnim limfnim nodusima .Metastaze u udaljenim limfnim nodusima i organima (pluća, kosti, mozak) razvilo je 79% bolesnica a 21% pacijentkinja nije imalo metastatsku bolest. Najveći broj bolesnica bilo je u drugom (53%) i trećem stadijumu bolesti (33%). Opisane karakteristike ispitivnih tumora dojke date su u tabeli **4.2.**

Tabela 4.2. Karakteristike tumora unutar TNBC grupe

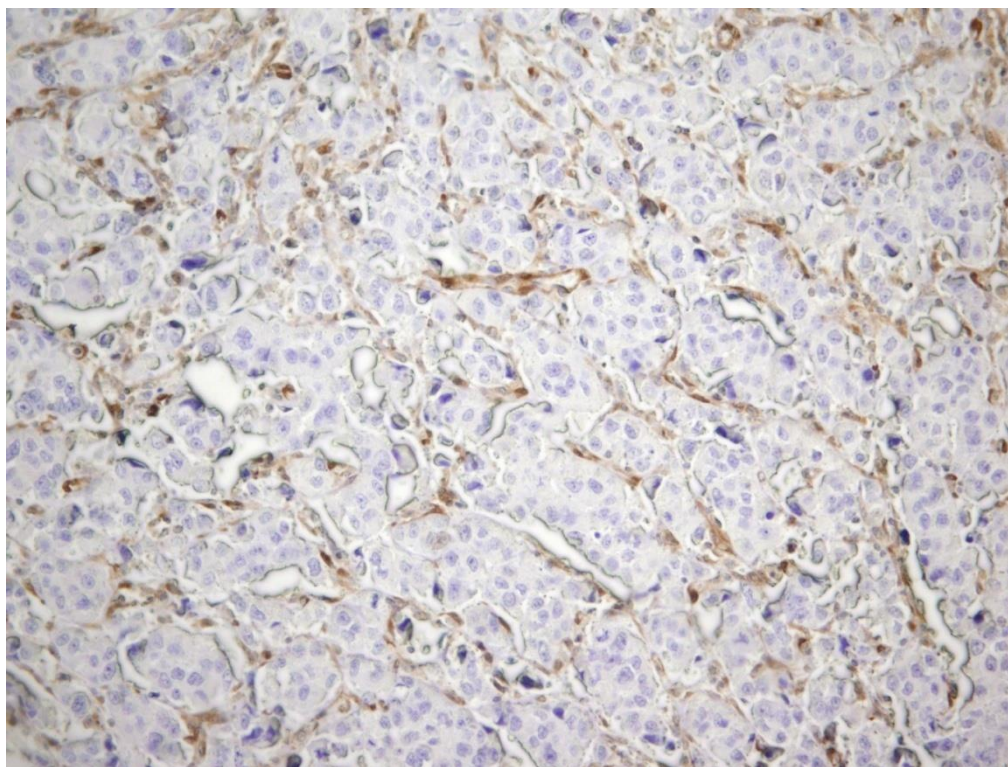
Karakteristike tumora	N (%)
Histološki tip tumora	
<i>duktalni</i>	41 (58)
<i>lobularni</i>	13 (18)
<i>ostali</i>	16 (24)
patološki prognostički stadijum	
<i>I</i>	10 (14)
<i>II</i>	37 (53)
<i>III</i>	23 (33)
pT stadijum	
<i>T1</i>	18 (26)
<i>T2</i>	43 (61)
<i>T3</i>	6 (9)
<i>T4</i>	3 (4)
pN stadijum	
<i>N0</i>	36 (52)
<i>N1</i>	17 (24)
<i>N2</i>	12 (17)
<i>N3</i>	5 (7)
Histološki gradus tumora	
<i>I</i>	2 (3)
<i>II</i>	43 (61)
<i>III</i>	25 (36)
Metastaze	
<i>M0</i>	55 (79)
<i>M1</i>	15 (21)

3.2. Imunohistohemijska analiza ekspresije PTEN, PI3K, mTOR proteina i MDR1 membranskog transportera

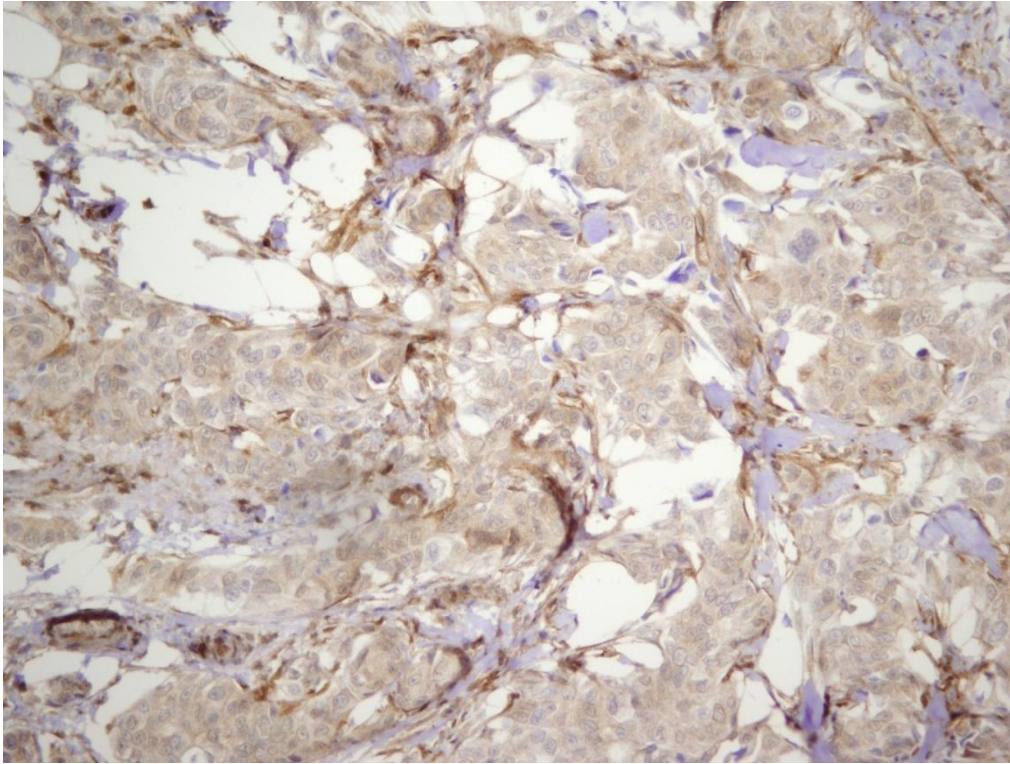
Imunohistohemijska analiza navedenih proteina je pokazala različitu distribuciju ovih proteina u ćeliji kao i vrlo heterogeni nivo ekspresije, kako od uzorka do uzorka, tako, kod nekih pacijenata, i u okviru istog uzorka (tumorska intraheterogenost). Analiza se zasnivala na određivanju procentualne zastupljenost imunoreaktivnih ćelija i intenzitetu bojenja ćelija.

Tako je, prilikom patohistološke imunohistohemijske analize PTEN proteina utvrđena imunoreaktivnost u citoplazmi ili na nivou jedra. Pri tome je u većini karcinoma bila zastupljena

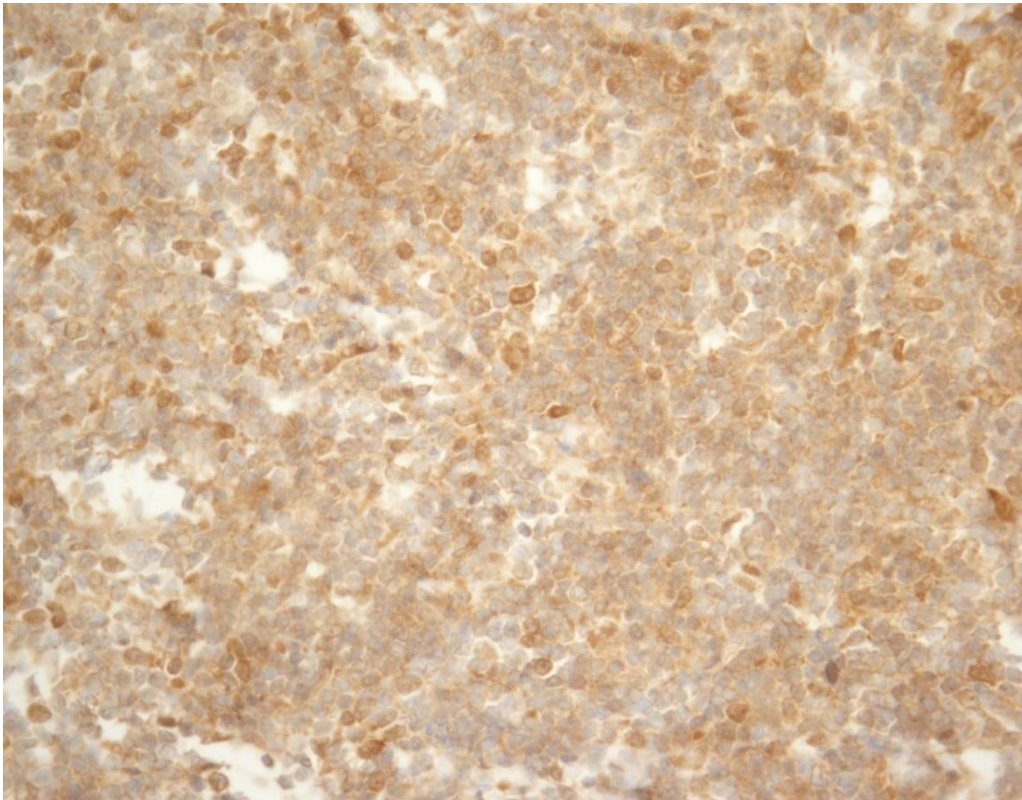
citoplazmatska a ređe jedarna ekspresija. Pozitivnu PTEN imunoreaktivnost uočili smo kod 43% (30/70) TNBC pacijentkinja (povećana ekspresija) a kod 57% (40/70) bolesnica zapaženo je odsustvo ili smanjena imunoreaktivnost (gubitak ekspresije ili smanjena ekspresija). Različita lokalizacija PTEN proteina kao i različit nivo ekspresije prikazani su na **Slikama 1-5**.



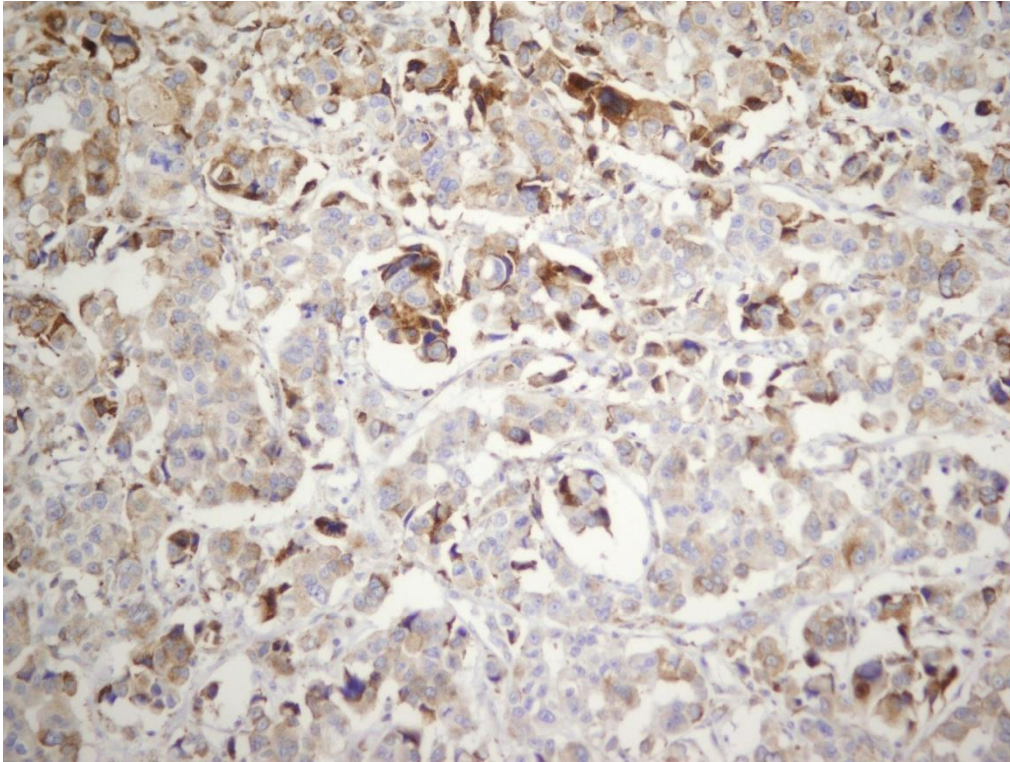
Slika 1. PTEN. Skor 0. Tumorsko tkivo bez imunoreaktivnog bojenja. Čelije endotela i fibrociti ekspimiraju PTEN bojenje (unutrašnja kontrola).



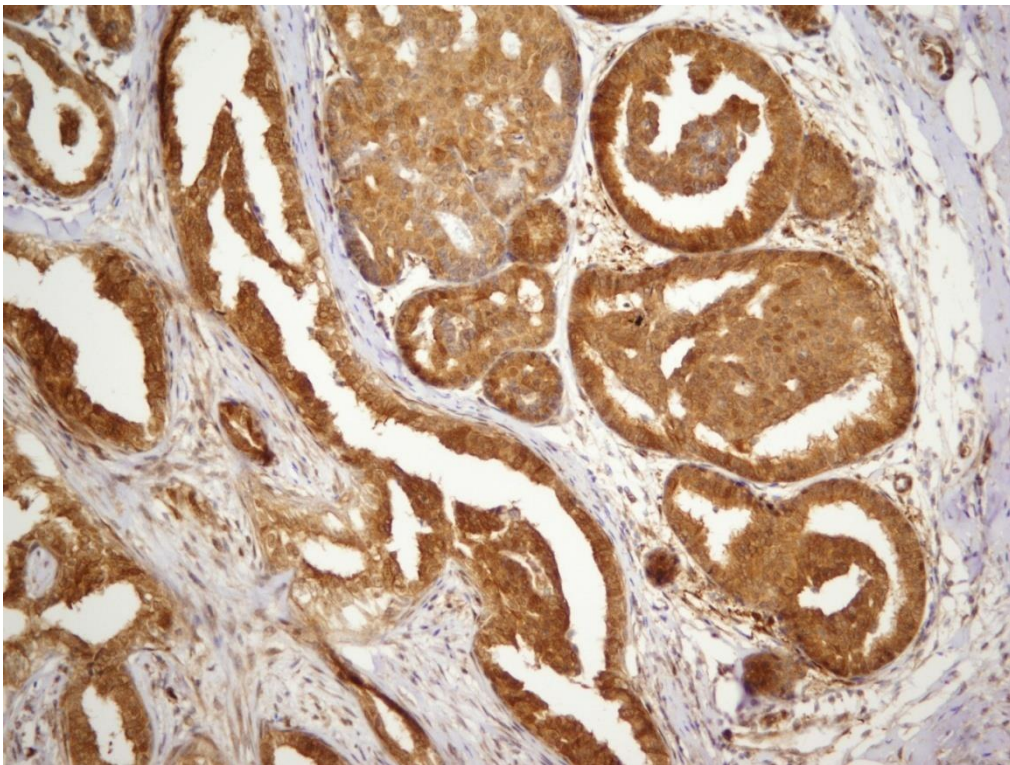
Slika 2. PTEN. Skor 3. Slabo citoplazmatsko bojenje.



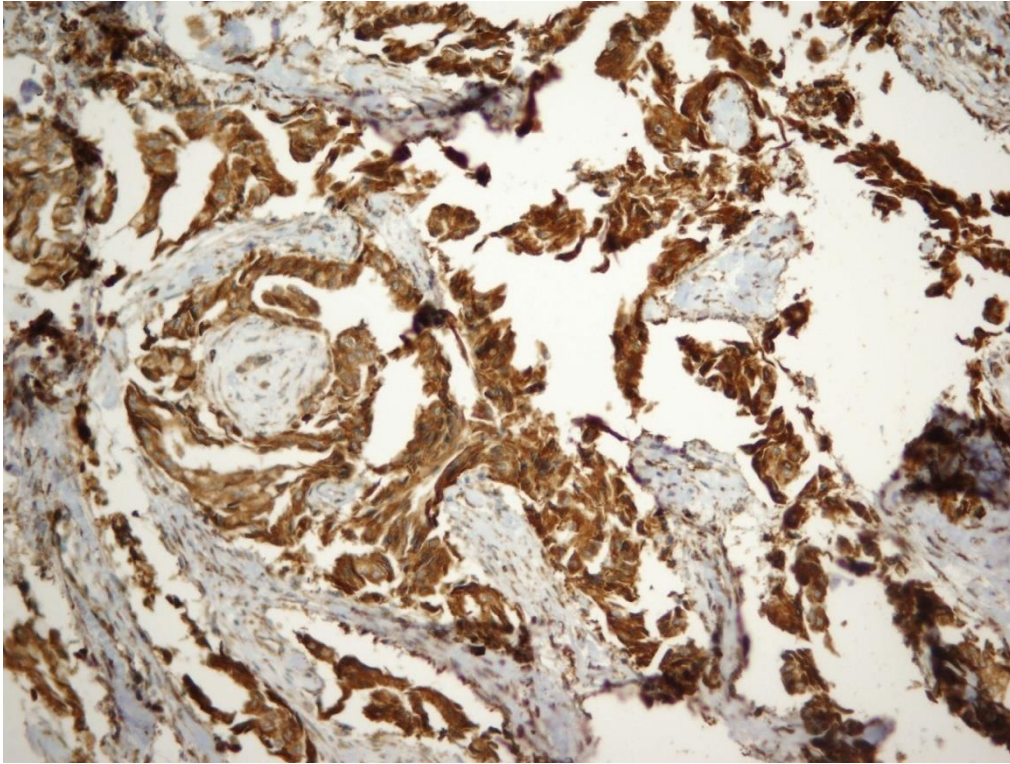
Slika 3. PTEN. Skor 5. Blago pojačan intenzitet citoplazmatskog i jedarnog bojenja.



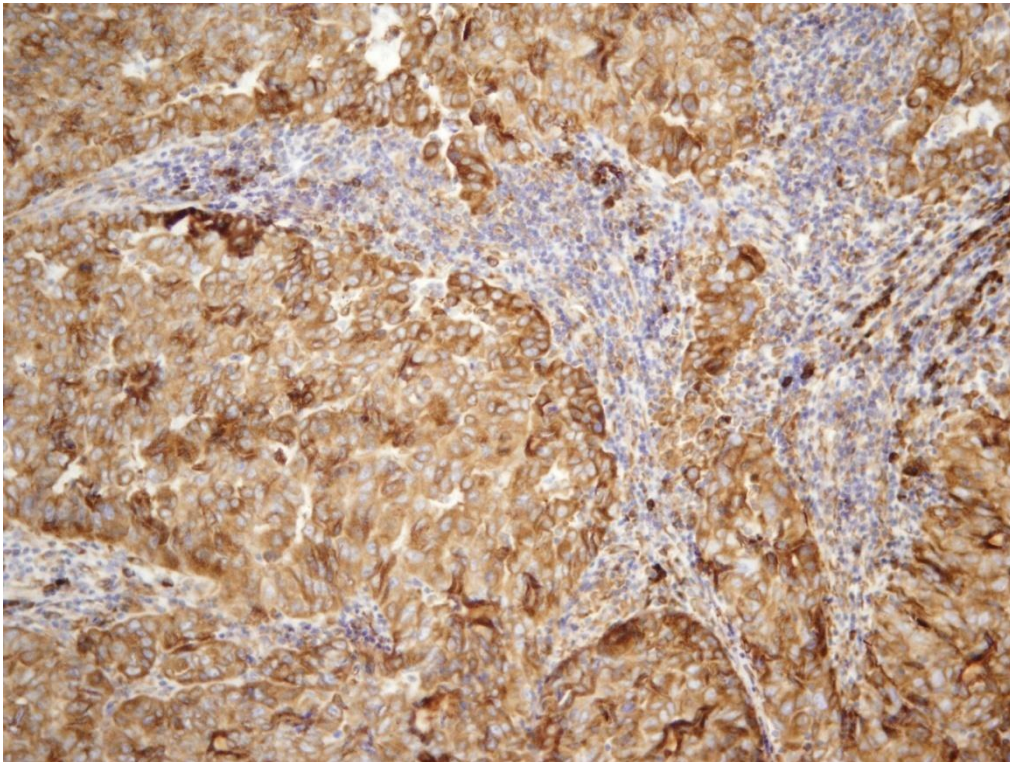
Slika 4. PTEN. Skor 6. Heterogeno citoplazmatsko i jedarno bojenje



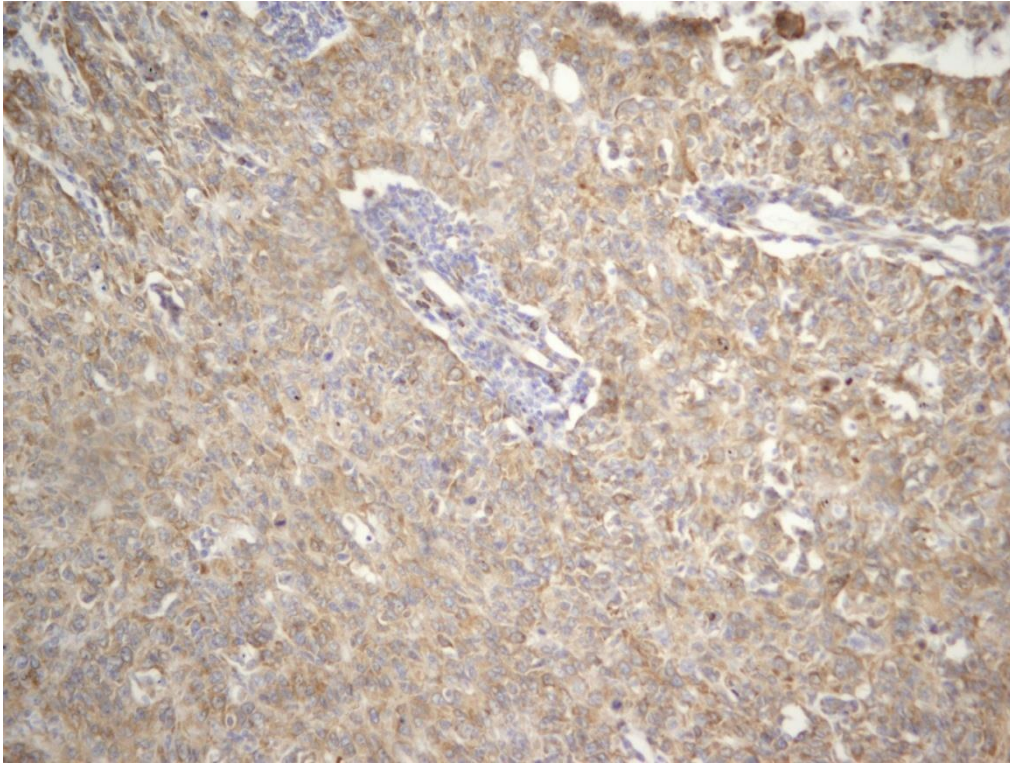
Slika 5. PTEN. Skor 8. Jako citoplazmatsko bojenje.



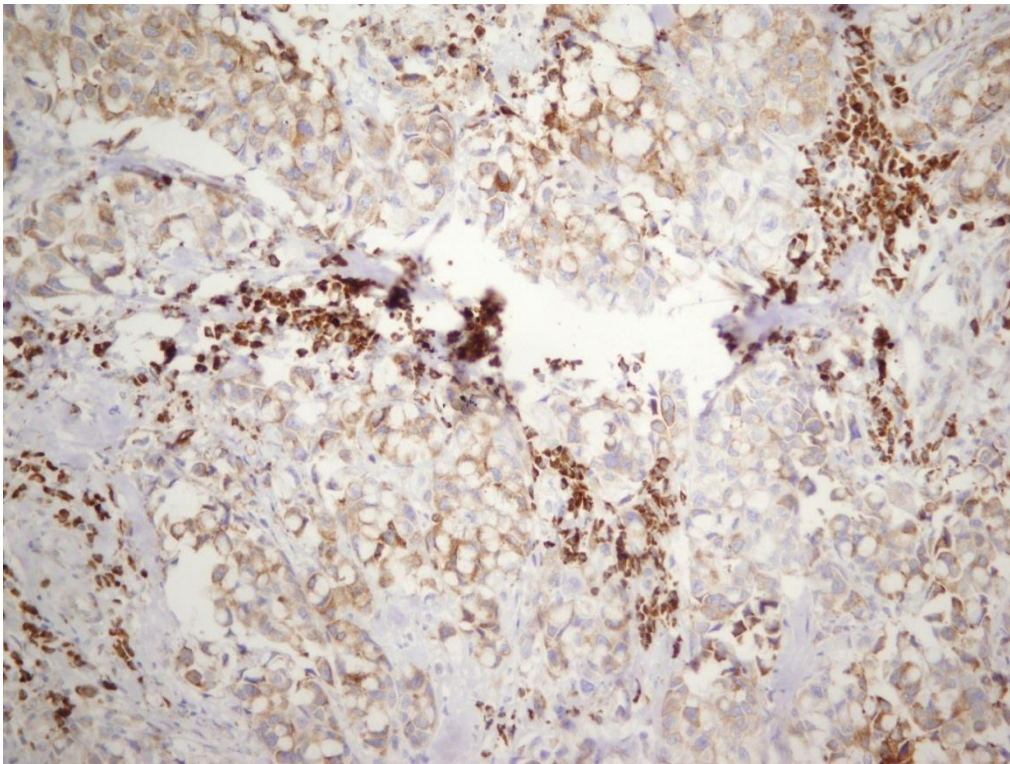
Slika 6. PI3K. Skor 8. Jako citoplazmatsko i mebransko bojenje (visoka ekspresija)



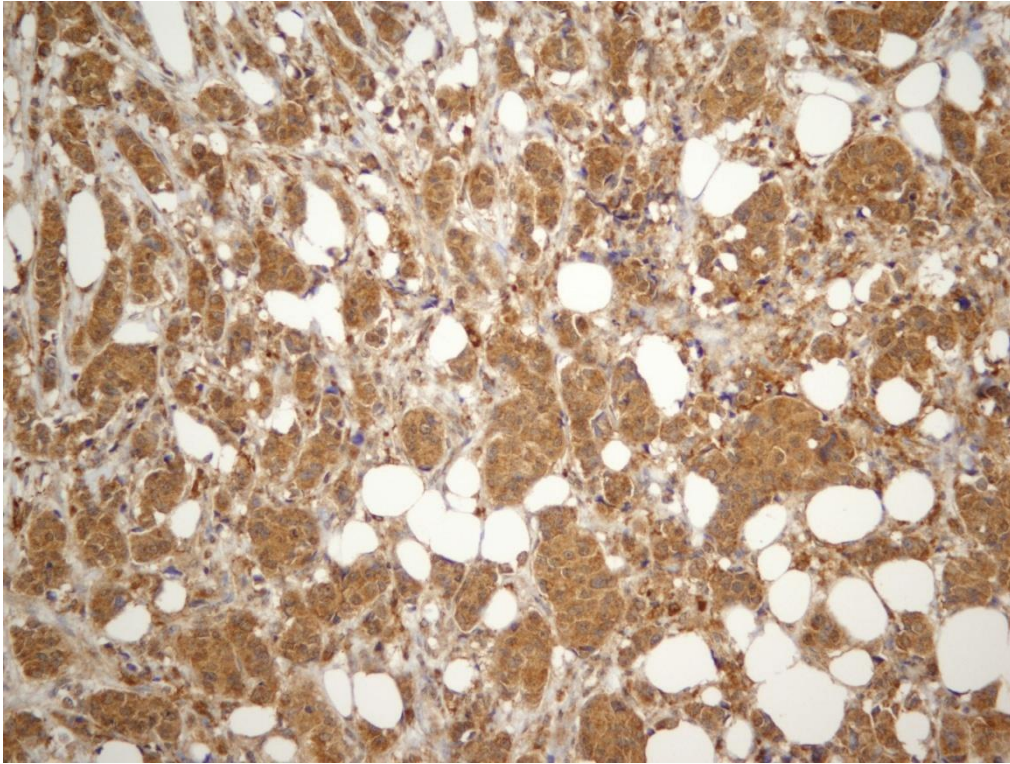
Slika 7. PI3K. Skor 7. Umereno citoplazmatsko i membransko bojenje (visoka ekspresija)



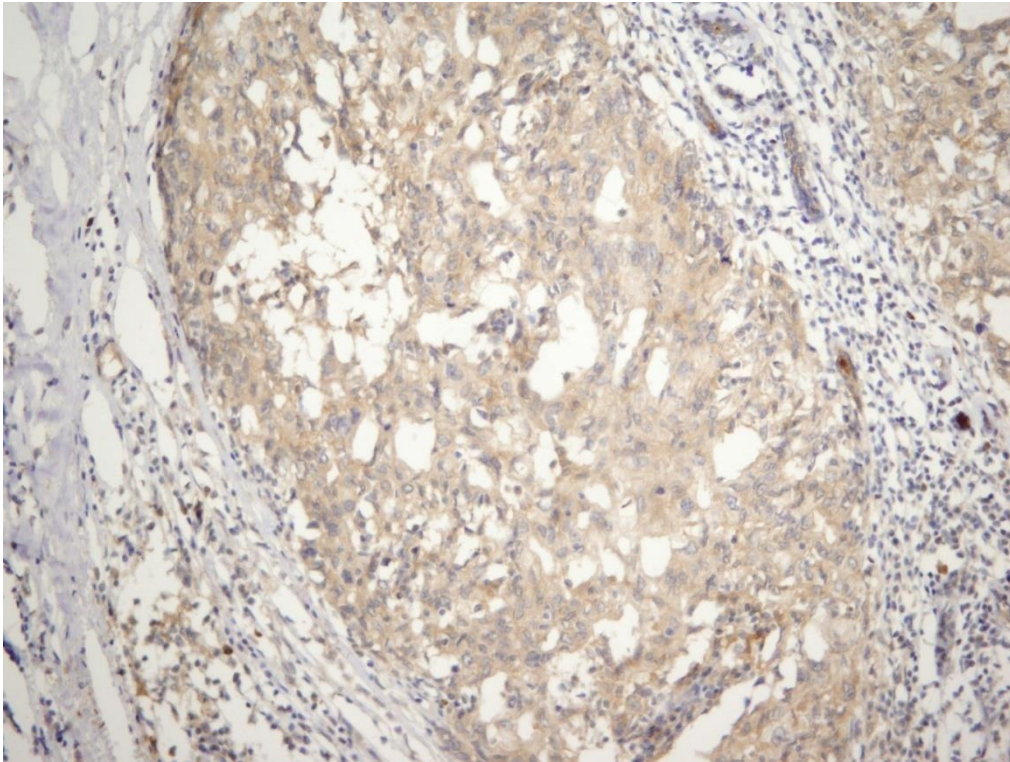
Slika 8. PI3K. Skor 5. Slabo citoplazmatsko bojenje (niska ekspresija)



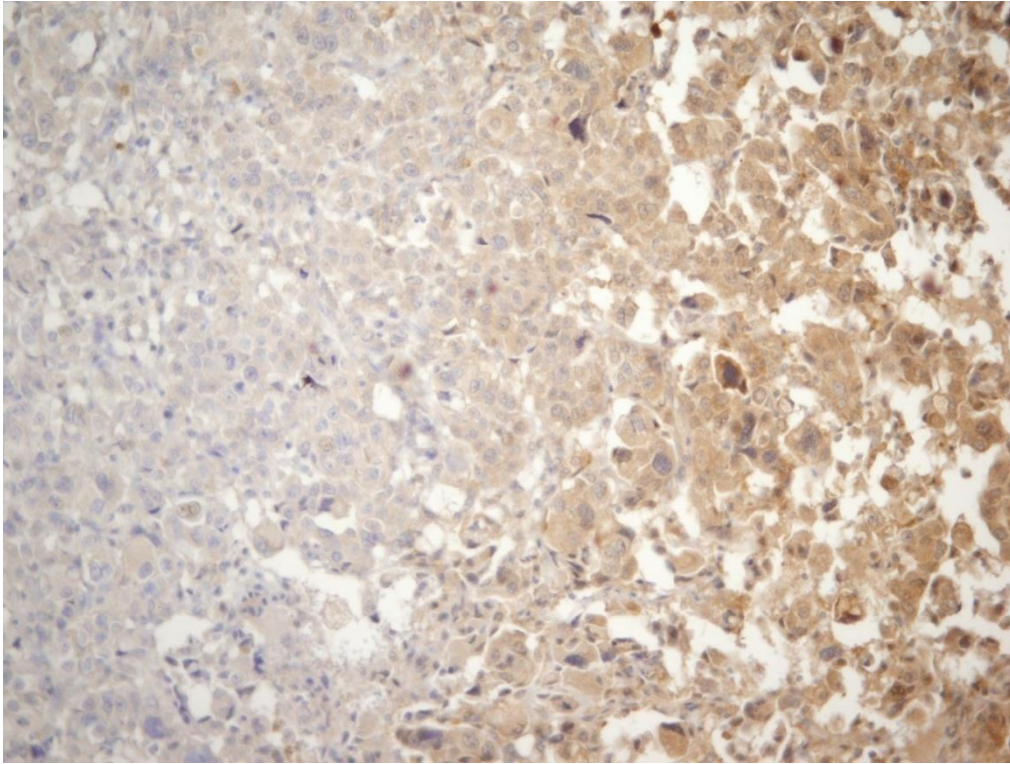
Slika 9. PI3K. Skor 3. Slabo membransko bojenje.



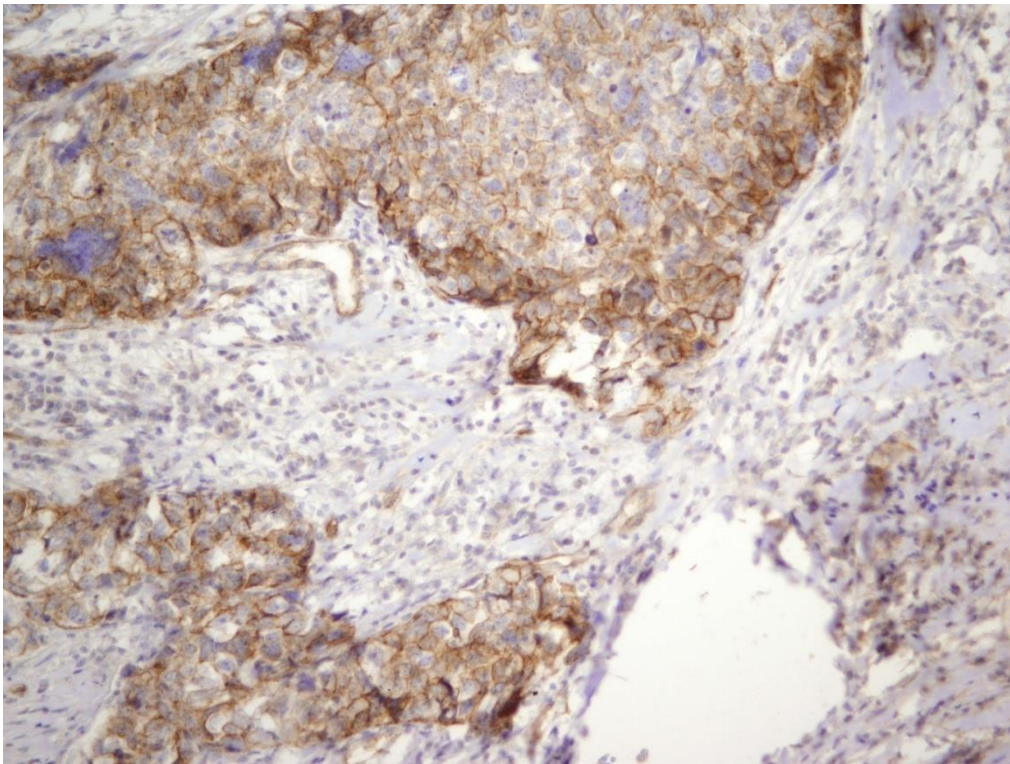
Slika 10. mTOR. Skor 8. Jako citoplazmatsko bojenje (visoka ekspresija)



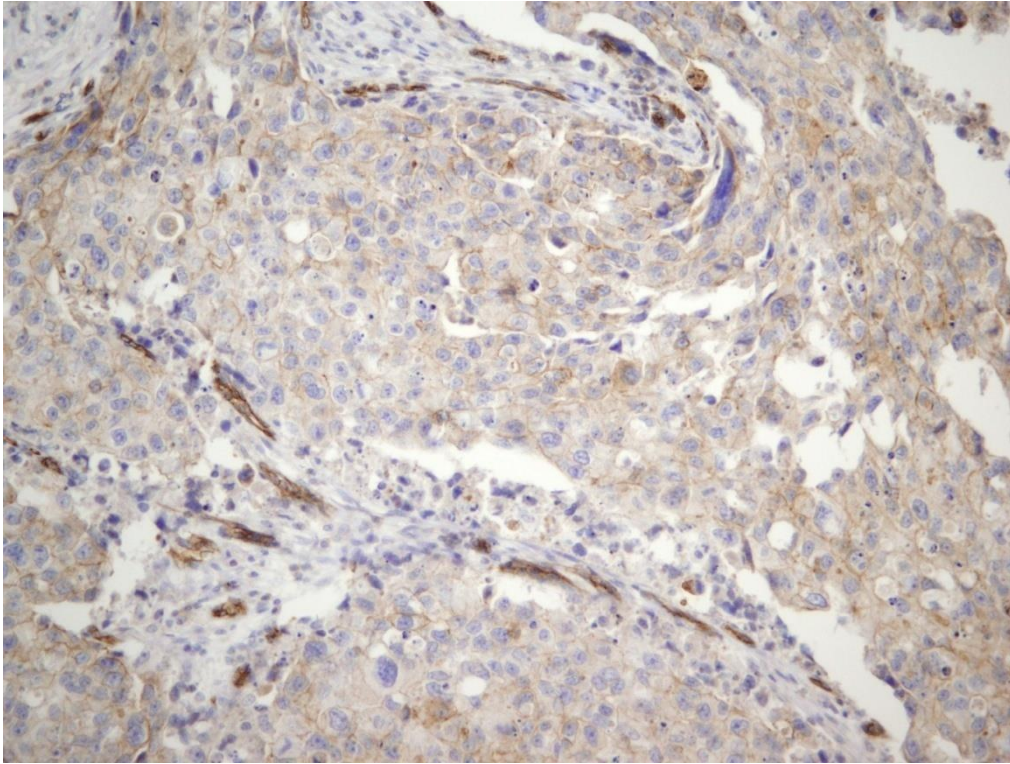
Slika 11. mTOR. Skor 4. Slabo citoplazmatsko i membransko bojenje (niska ekspresija)



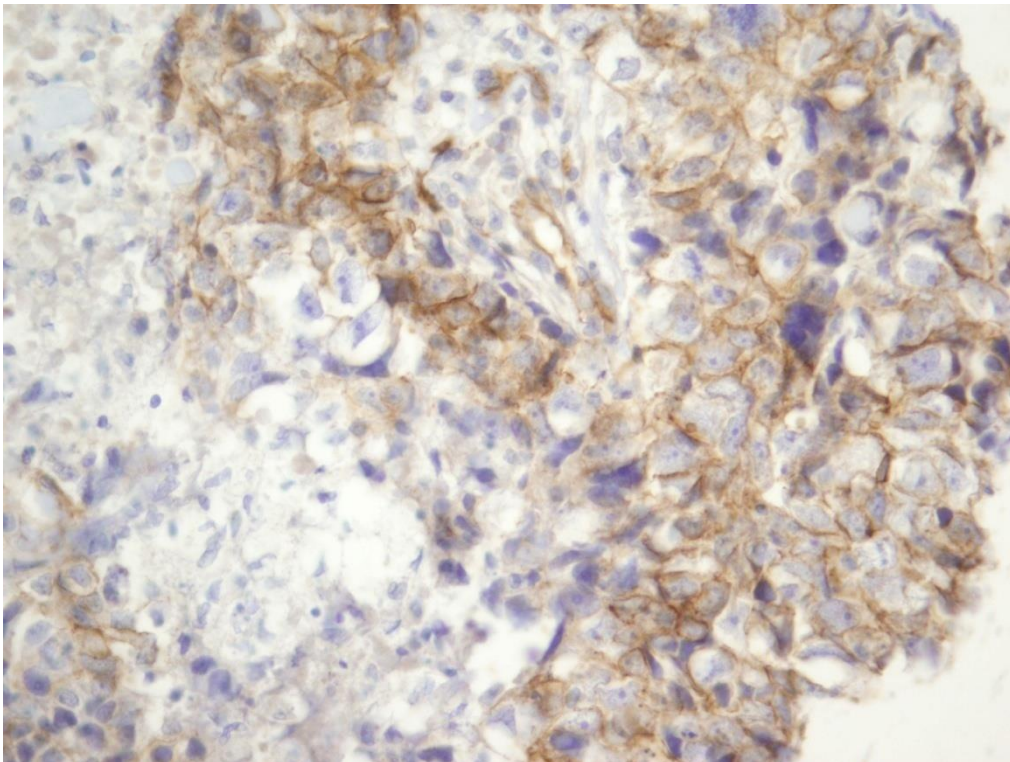
Slika 12. mTOR. Skor 4. Heterogeno citoplazmatsko bojenje.



Slika 13. MDR1. Skor 8. Jako membransko bojenje.



Slika 14. MDR1. Skor 3. Slabo membransko bojenje



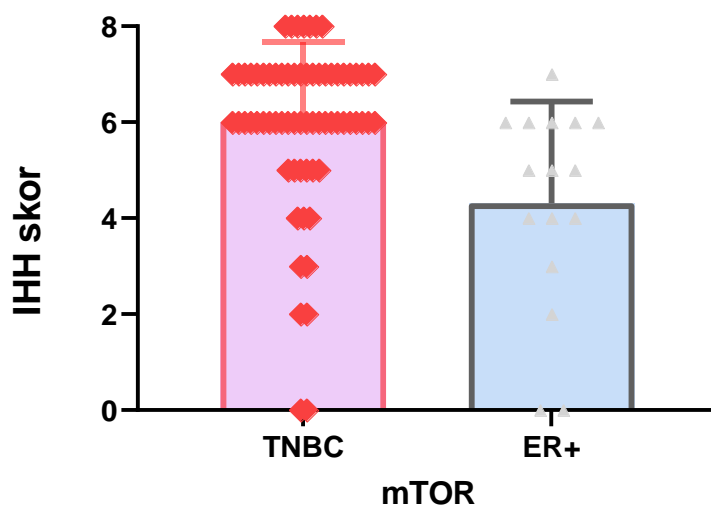
Slika 15. MDR1. Skor 6. Umereno citoplazmatsko i membransko bojenje

Analizom ekspresije PTEN proteina utvrdili smo statistički značajno smanjenje ekspresije unutar TNBCu grupe u odnosu na kontrolnu grupu hormonski zavisnih karcinoma dojke (ER+) (Mann Whitney test, $p=0,0015$), što je prikazano na **Grafikonu 4.1**.

Za razliku od PTEN proteina, imunoreaktivnost PI3K, mTOR I MDR1 proteina je pokazala njihovu delimično drugačiju lokalizaciju, na membrani u citoplazmi. Tako je analiza PI3K i mTOR ekspresije pokazala podjednaku zastupljenost imunoreaktivnog bojenja, nivoa ekspresije, na membrani i u citoplazmi. Pozitivna imunoreaktivnost PI3K proteina (**Slike 6-9**) uočena je kod 40% (28/70) bolesnica u ispitivanoj TNBC grupi a suprimirana ekspresija kod 60% pacijentkinja, što je statistički značajno povećanje ekspresije u odnosu na ER+ kontrolnu grupu (Mann Whitney test, $p=0,0594$). (**Grafikon 4.2**). Sličan rezultat je dobijen i za mTOR protein (**Slike 10-12**), visoka imunoreaktivnost je uočena kod 44% TNBC pacijentkinja a niska imunoreaktivnost kod 56% bolesnica. Dobijeni rezultati pokazali su statistički značajno veću ekspresiju mTOR proteina u odnosu na kontrolni uzorak ER+ pacijentkinja (Mann Whitney test, $p=0,003$) (**Grafikon 4.3**).

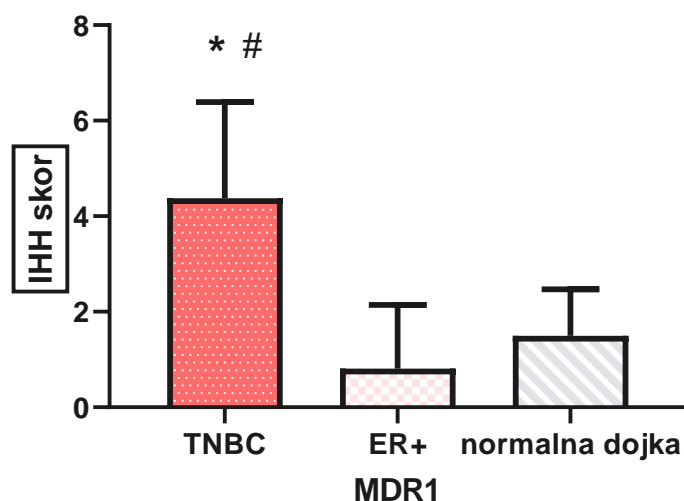
MDR1 transmembranski protein je očekivano bio uglavnom eksprimiran na ćelijskoj membrani a znatno ređe u citoplazmi (**Slike 13-15**).

Analizom imunoekspresije MDR1 proteina unutar TNBC grupe uočena je visoka ekspresija kod 11% (7/66) bolesnica, niska ekspresija kod 62% (41/66) bolesnica, a kod 27% (18/66) pacijentkinja nije uopšte detektovana ekspresija MDR1 proteina. Takođe, unutar ER+ grupe kod 6% (3/46) bolesnica zabeležena je niska ekspresija MDR1 proteina, dok je kod ostalih pacijentkinja ekspresija MDR1 proteina bila potpuno odsutna. Dakle, kod TNBC pacijentkinja je pokazana izrazito povišena, statistički izuzetno značajna, ekspresija MDR1 proteina u odnosu na kontrolnu ER+ grupu pacijentkinja (Kruskal-Wallis-ov test, $p<0,0001$) (**Grafikon 4.4**).



Grafikon 4.3. Usporedni prikaz mTOR ekspresije kod TNBC i ER+ karcinoma dojke

* tnbc vs. er+
tnbc vs normalna dojka



Grafikon 4.4. Usporedni prikaz analize ekspresije MDR1 proteina između grupa TNBC i ER+ i normalnog tkiva dojke

4.3. Povezanost PTEN ekspresije sa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC

Analizom imunoekspresije u odnosu na histološki tip karcinoma utvrđeno je da je ekspresija PTEN proteina smanjena/odsutna kod 55% bolesnica sa duktalnim TNBC dojke, 27,50% bolesnica sa lobularnim karcinomima i 17% kod bolesnica sa drugim ređim tipovima trostruko negativnih karcinoma dojke. Utvrđeno je da postoji statistički značajna korelacija između smanjene

imunoekspresije PTEN proteina u lobularnog histološkog tipa TNBC dojke (Hi kvadrat test, $p=0,0678$) (**Tabela 4.3**).

Pored toga, analizirana je povezanost ekspresije PTEN proteina sa patohistološkim parametrima tumora, odnosno veličinom tumora, histološkim gradusom, limfonodalnim statusom i pojavom metastaza.

Analizirajući asocijaciju između veličine tumora i imunoekspresije PTEN proteina, utvrđeno je da između ova dva parametra ne postoji statistički značajna razlika. (Hi kvadrat test, $p=0,6957$), što je prikazano u **Tabeli 4.3**.

Suprimirana ekspresija PTEN proteina detektovana je u 72,50% karcinoma gradusa Gr1 i 2 i u 27,50% karcinoma Gr3. Međutim, nije utvrđena statistički značajna asocijacija između nivoa imunoekspresije PTEN proteina i histoloških gradusa tumora (Fisher-ov test, $p=0,1318$). Takođe, pokazano je da ne postoji statistička značajnost između ekspresije PTEN proteina i zahvaćenosti regionalnih limfnih nodusa, (Hi-kvadrat test, $p=0,2124$) kao i pojave metastaza (Fisher-ov test, $p=0,2393$). Dobijeni rezultati prikazani su u **Tabeli 4.3**.

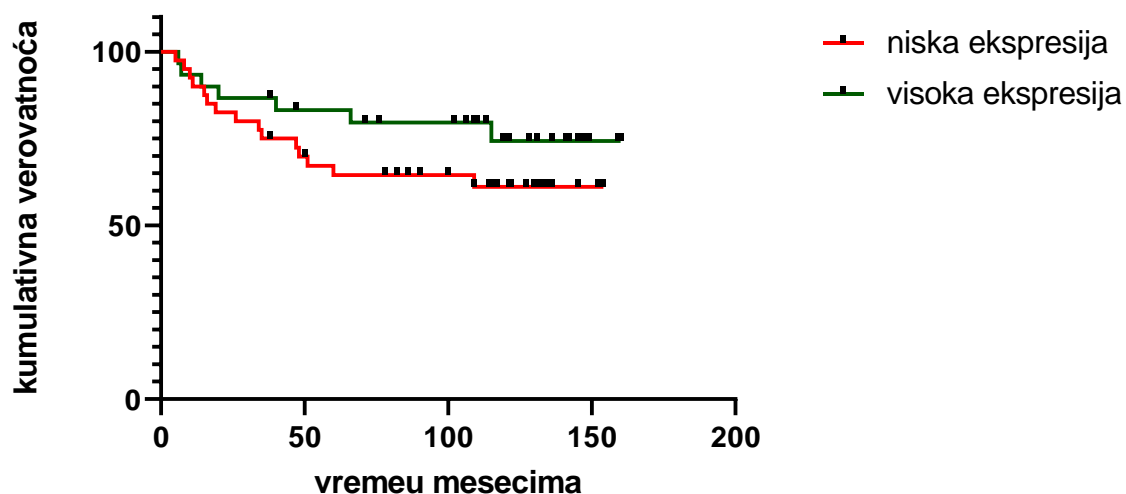
Tabela 4.3. Povezanost kliničkih i histopatoloških parametara TNBC tumora sa PTEN ekspresijom.

PTEN ekspresija	niska ekspresija br(%)	visoka ekspresija br(%)	p vrednost
klinički stadijum bolesti			
stadijum 1	4 (10,00%)	6 (20,00%)	0,4937
stadijum 2	22 (55,00%)	15 (50,00%)	
stadijum3,4	14 (35,00%)	9 (30,00%)	
histološki tip tumora			
duktalni	22 (55,00%)	19 (63,33%)	0,0678
lobularni	11 (27,50%)	2 (6,67%)	
ostali	7 (17,50%)	9 (30,00%)	
histološki gradus tumora			
gradus 1.2	29 (72,50%)	16 (53,33%)	0,1318
gradus 3	11 (27,50%)	14 (46,67%)	
veličina tumora			
T1	9 (22,50%)	9 (30,00%)	0,6957
T2	25 (62,50%)	18 (60,00%)	
T3,4	6 (15,00%)	3 (10,00%)	
nodalni status			
N0	17 (42,50%)	19 (63,33%)	0,2124
N1	12 (30,00%)	5 (16,67%)	
N2,3	11 (27,50%)	6 (20,00%)	
metastaze			
M0	29 (72,50%)	26 (86,67%)	0,2393
M1	11 (27,50%)	4 (13,33%)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi;

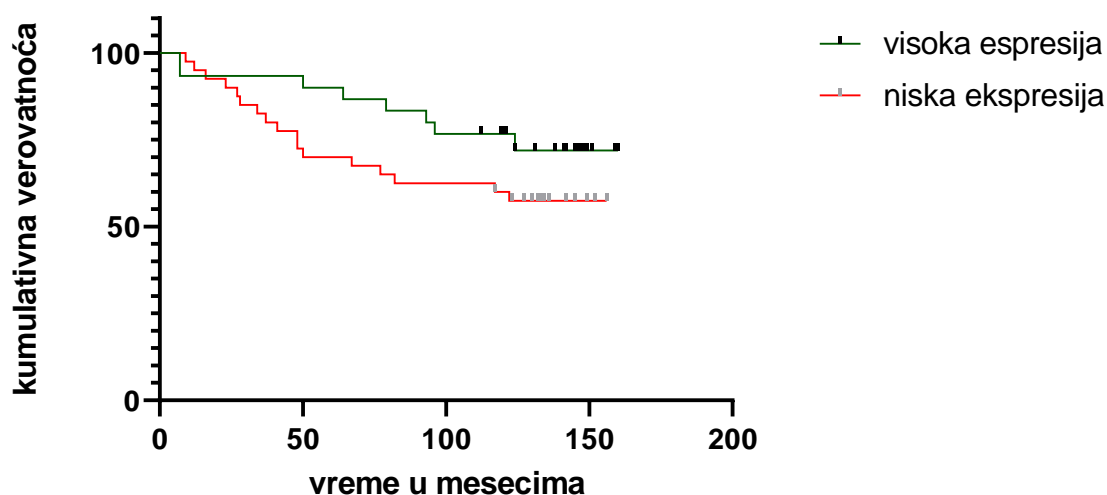
Masna slova označavaju statistički značajne vrednosti, $p < 0.05$

Preživljavanje TNBC pacijentkinja bez znakova bolesti (DFI) i ukupno preživljavanje (OS) procenjeno je Kaplan Meier krivom i log rank (Mantel-Cox) testom. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju bez relapsa bolesti između bolesnica sa niskom i visokom ekspresijom PTEN proteina. (Log –rank Mantel-Cox test, $p=0,2171$) **Grafikon 4.5.**



Grafikon 4.5. Kaplan Meier-ova kriva preživljavanja. Analiza preživljavanja bez relapse bolesti među bolesnicima sa niskom i visokom ekspresijom PTEN proteina.

Pored toga, pokazano je kraće ukupno preživljavanje bolesnica sa suprimiranom ekspresijom PTEN proteina u odnosu na bolesnice sa pozitivnom ekspresijom, mada uočena razlika nije dostigla statističku značajnost (Log-rank Mantel-Cox test, $p=0,1602$) (**Grafikon 4.5.**).



Grafikon 4.5. Kaplan Meier-ova kriva preživljavanja. Analiza ukupnog preživljavanja bolesnicasa niskom i visokom ekspresijom PTEN proteina

4.4. Povezanost PI3K ekspresije sa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC

Korelaciona analiza povezanosti nivoa PI3K imunoekspresije sa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC pokazala je da postoji statistički značajna asocijacija visoke ekspresije PI3K proteina i pojave metastaza u regionalnim limfnim nodusima (limfonodalni status) (Hi-kvadrat test,

$p=0,0374$). Opisani podaci prikazani su u **Tabeli 4.4, Grafikon 4.6**. Pored toga, utvrđeno je da postoji statistički značajna asocijacija u ekspresiji PI3K proteina i stadijuma bolesti (Hi-kvadrat test, $p=0,023$), **Tabela 4.4., Grafikon 4.7**.

Visoka ekspresija PI3K proteinabila je prisutna u 78,60% karcinoma T2 stadijuma, u 14,30% karcinoma T1 i 7,10% karcinoma T3 stadijuma. Analizom rezultata, zaključeno je da postoji statistička značajnost u ekspresiji PI3K proteina u odnosu na veličinu tumora (Hi-kvadrat test, $p=0,05$) **Tabela 4.4., Grafikon 4.8**.

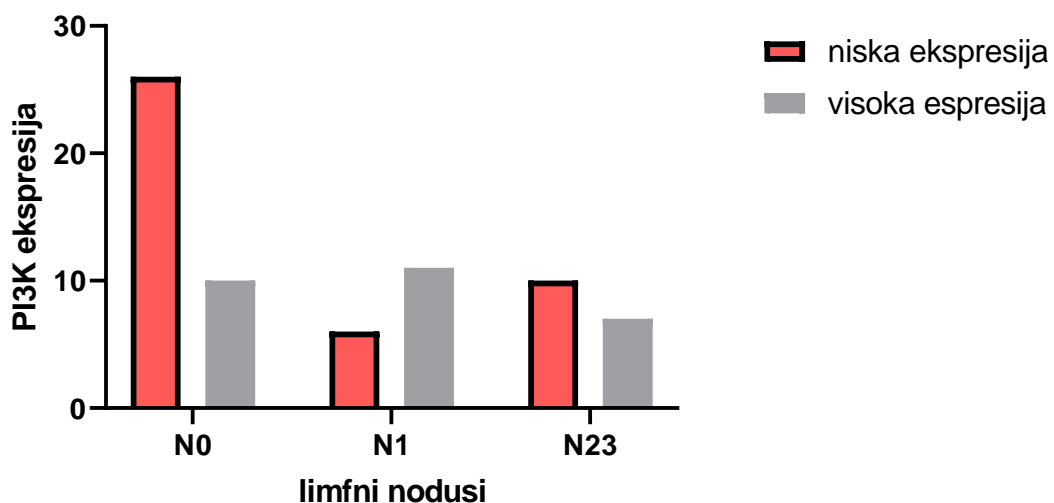
Dodatno, analizirana je imunoekspresija PI3K proteina u odnosu na druge kliničke i histopatološke parametre, kao što su starost bolesnica, tip tumora, gradus tumora i pojavu udaljenih metastaza. Rezultati istraživanja su pokazali da nema značajne asocijacije (statističke značajnosti) između niske i visoke ekspresije PI3K proteina i starosti bolesnica (Fisher-ov test, $p=0,7885$), tipa tumora (Hi kvadrat test, $p=0,4826$), gradusa tumora (Fisher-ov test, $p=0,1377$), kao i pojavi metastaza (Fisher-ov test, $p=0,1353$) **Tabela 4.4**.

Tabela 4.4. Povezanost kliničkih i histopatoloških parametara TNBC tumora sa PI3K ekspresijom.

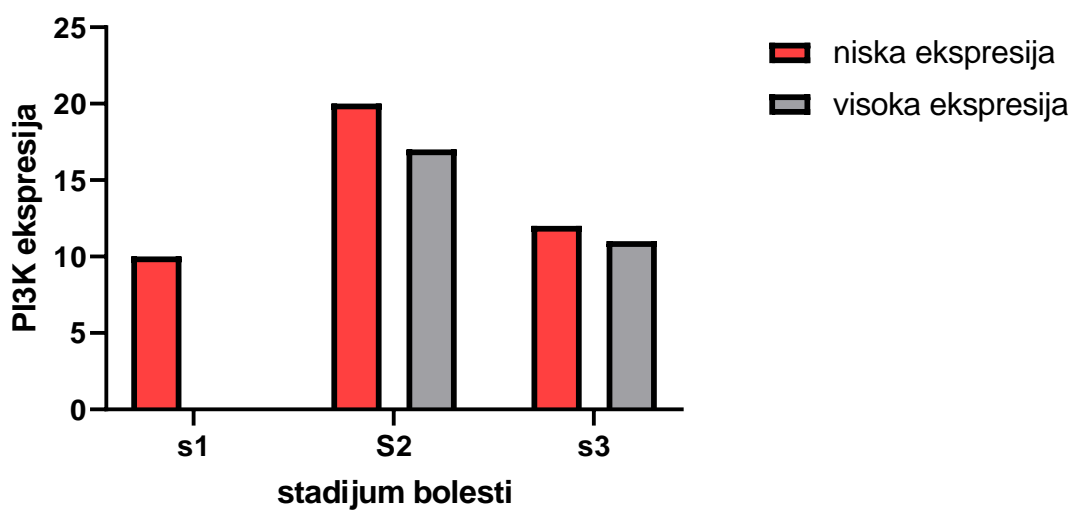
PI3K ekspresija	niska ekspresija br(%)	visoka ekspresija br(%)	p vrednost
klinički stadijum bolesti			
stadijum 1	10 (23,80%)	0 (00,00%)	0,023
stadijum 2	20 (47,60%)	17 (60,70%)	
stadijum3,4	12 (28,60%)	11(39,30%)	
histološki tip tumora			
duktalni	27 (64,29%)	14 (50,00%)	0,4826
lobularni	7 (16,67%)	6 (21,43%)	
ostali	8 (19,04%)	8 (28,57%)	
histološki gradus tumora			
gradus 1,2	30 (71,43%)	15 (53,57%)	0,1377
gradus 3	12 (28,57%)	13 (46,43%)	
veličina tumora			
T1	14(33,33%)	4 (14,30%)	0,05
T2	21 (50,00%)	22 (78,60%)	
T3,4	7 (16,67%)	2 (7,10%)	
nodalni status			
N0	26 (61,90%)	10 (23,80%)	0,0374
N1	6 (14,30%)	11(26,20%)	
N2,3	10 (23,80%)	7 (16,70%)	
metastaze			
M0	36 (85,71%)	19 (67,86%)	0,1353
M1	6 (14,29%)	9 (32,14%)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi;

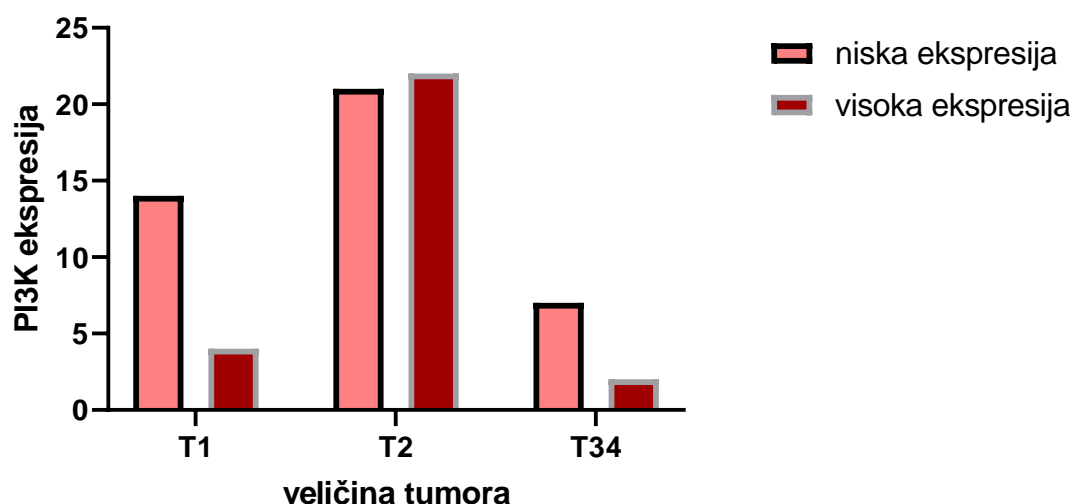
Masna slova označavaju statistički značajne vrednosti, $p < 0.05$



Grafikon 4.6. Uporedni prikaz PI3K ekspresije u odnosu na status limfnih nodusa kod TNBC



Grafikon 4.7. Uporedni prikaz PI3K ekspresije u odnosu na stadijum bolesti kod TNBC

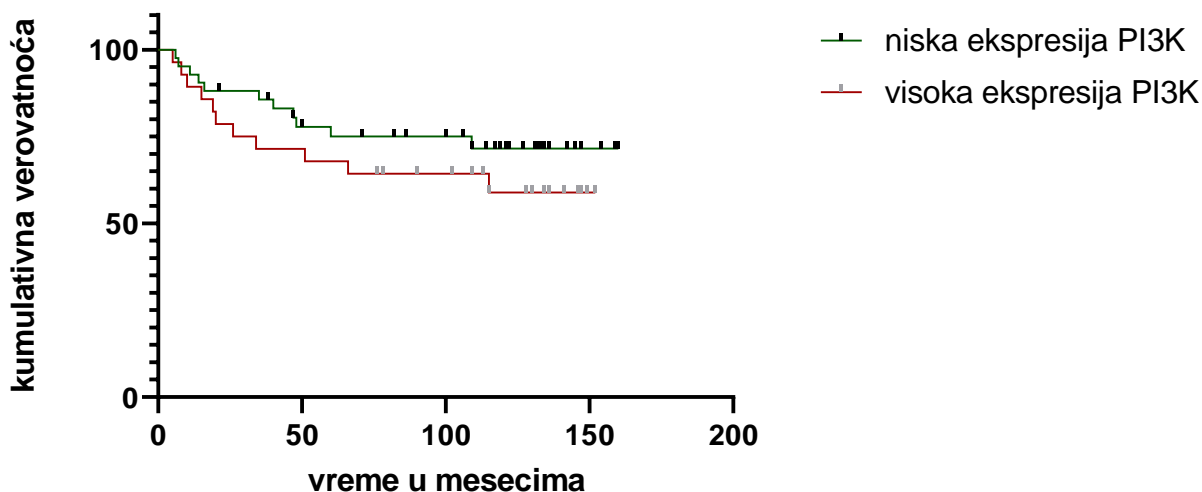


Grafikon 4.8. Uporedni prikaz PI3K ekspresije u odnosu na veličinu tumora kod TNBC

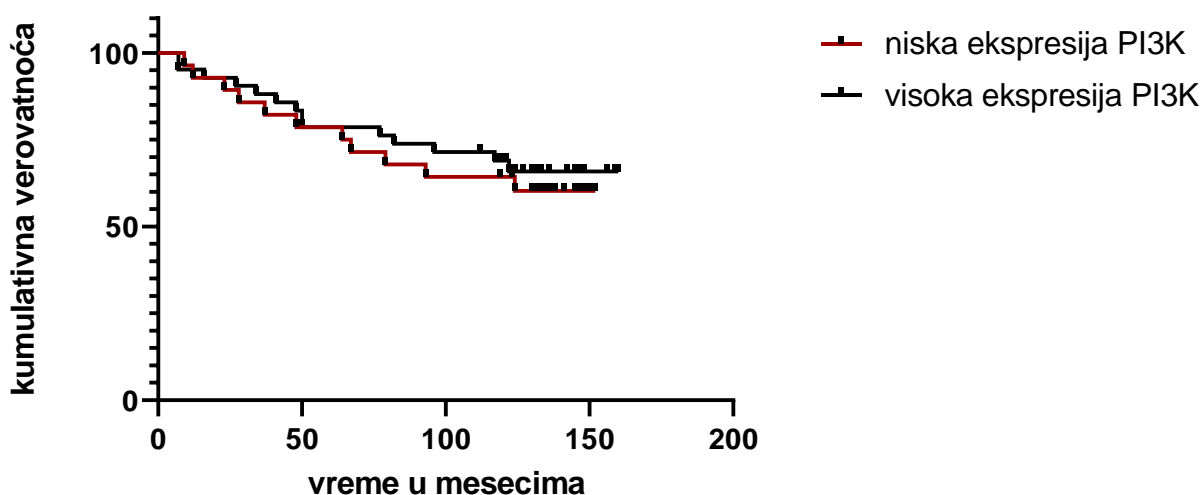
Razmatranjem vremena preživljavanja bez relapsa bolesti (DFI) zaključeno je da ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju između bolesnica sa niskom i visokom ekspresijom PI3K proteina. (Log –rank Mantel-Cox test, $p=0,2938$).

Kaplan Meierove krive kumulativnih verovatnoća vremena bez relapsa bolesti (DFI) u odnosu na grupe bolesnica sa niskom i visokom ekspresijom PI3K proteina prikazane su na **Grafikonu 4.9.**

Takođe i ukupno preživljavanje, tj vreme od radikalne operacije do smrti (OS), u podgrupama bolesnica sa visokom ekspresijom PI3K proteina nije bilo kraće u odnosu na podgrupu sa niskom ekspresijom, odnosno nije utvrđena statistički značajna veza između ove dve grupe bolesnica u odnosu smrtni ishod (Log –rank Mantel-Cox test, $p=0,6321$) Kaplan Meierove krive vremena do smrtnog ishoda prikazane su na **Grafikonu 4.10.**



Grafikon 4.9. Kaplan Meier-ova kriva preživljavanja. Analiza preživljavanja bez relapsa bolesti između bolesnika sa niskom i visokom ekspresijom PI3K proteina



Grafikon 4.10. Kaplan Meier-ova kriva preživljavanja. Analiza ukupnog preživljavanja među bolesnicima sa niskom i visokom ekspresijom PI3K proteina

4.5. Povezanost mTOR ekspresije sa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC

Dobijeni rezultati su pokazali asocijaciju visoke ekspresije mTOR proteina kod bolesnica u kasnijim pTNM stadijumima, stadijumom III i stadijumom IV (Hi-kvadrat test, $p=0,0254$). **Tabela 4.5, Grafikon 4.11.**

Takođe, rezultati istraživanja su pokazali da nema statističke značajnosti u grupama bolesnica sa niskom i visokom ekspresijom mTOR proteina u odnosu na kliničko histopatološke parametre, na starost bolesnica (Fisher-ov test, $p=0,7885$), tip tumora (Hi kvadrat test, $p=0,5381$),

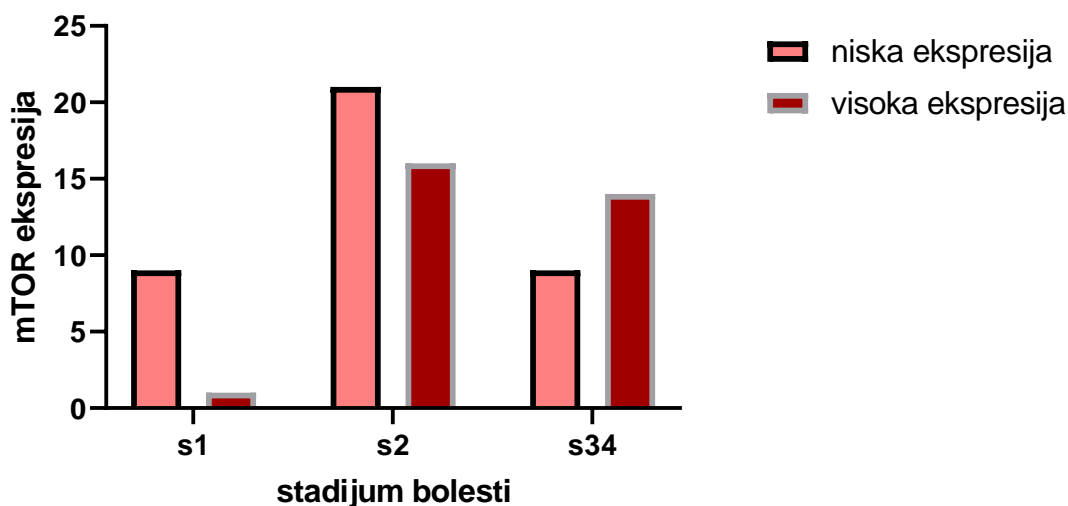
veličinu tumora (Hi-kvadrat test, $p=0,1422$), gradus tumora (Fisher-ov test, $p=0,4519$), zahvaćenost limfnih nodusa (Hi-kvadrat test, $p=0,155$) kao i pojavu metastaza (Fisher-ov test, $p=0,2416$). Dobijeni rezultati prikazani su u **Tabeli 4.5**.

Tabela 4.5. Povezanost kliničkih i histopatoloških parametara TNBC tumora sa mTOR ekspresijom.

mTOR ekspresija	niska ekspresija br(%)	visoka ekspresija br(%)	p vrednost
klinički stadijum bolesti			
stadijum 1	9 (23,10%)	1 (3,23%)	0,0254
stadijum 2	21 (53,80%)	16 (51,61%)	
stadijum 3,4	9 (23,10%)	14 (45,16%)	
histološki tip tumora			
duktalni	24 (61,54%)	17 (54,84%)	0,5381
lobularni	8 (20,51%)	5 (16,13%)	
ostali	7 (17,95%)	9 (29,03%)	
histološki gradus tumora			
gradus 1,2	27 (69,23%)	18 (58,06%)	0,4519
gradus 3	12 (30,77%)	13 (41,94%)	
veličina tumora			
T1	13 (33,33%)	5 (16,13%)	0,1422
T2	23 (58,97%)	20 (64,52%)	
T3,4	3 (7,70%)	6 (19,35%)	
nodalni status			
N0	24 (61,54%)	12 (38,71%)	0,1555
N1	7 (17,95%)	10 (32,26%)	
N2,3	8 (20,51%)	9 (29,03%)	
metastaze			
M0	33 (84,62%)	22 (70,97%)	0,2416
M1	6 (15,38%)	9 (29,03%)	

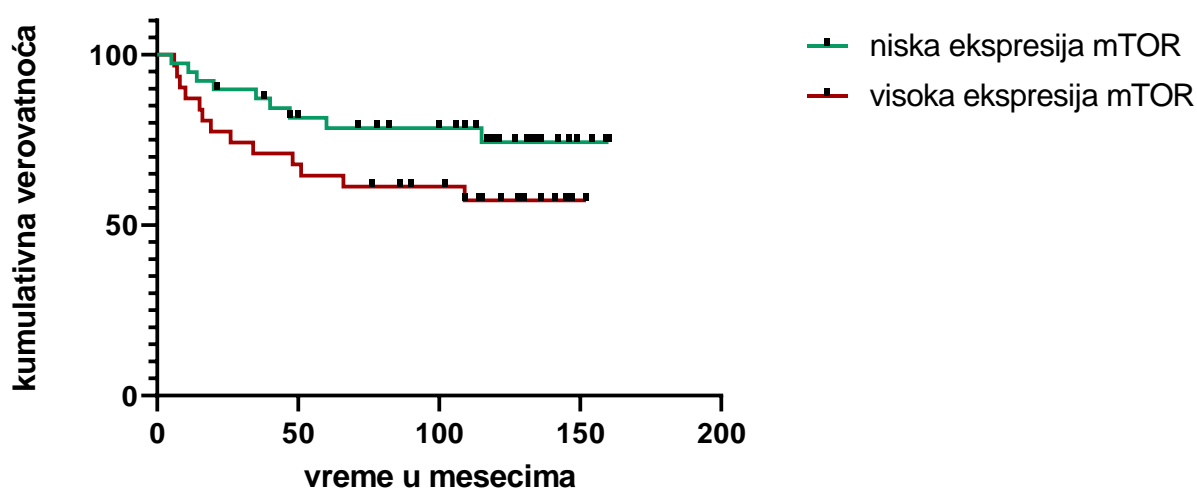
Legenda: br, broj bolesnica po grupi;

Masna slova označavaju statistički značajne vrednosti, $p < 0.05$

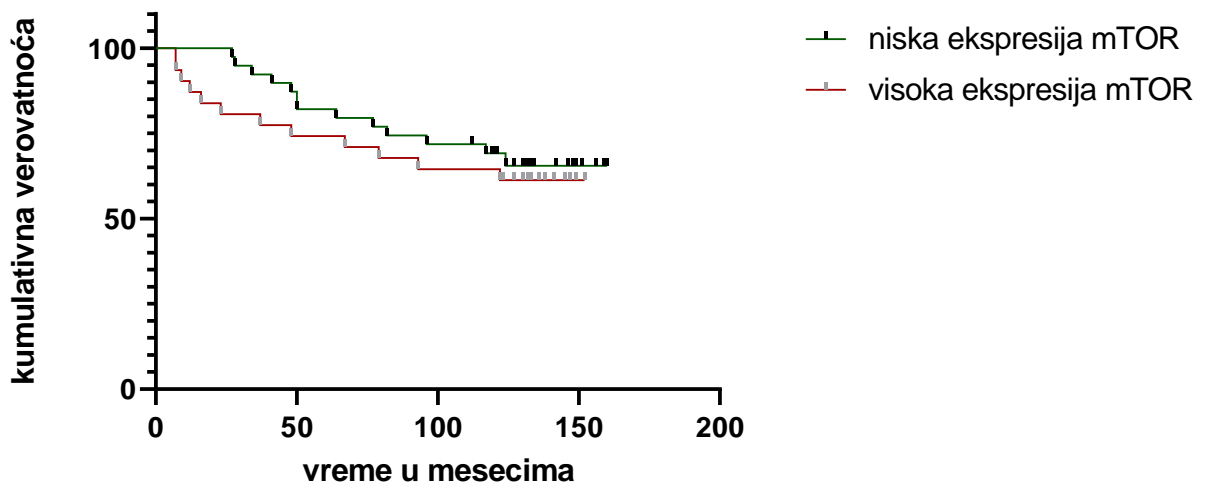


Grafikon 4.11. Uporedni prikaz mTOR ekspresije i stadijuma bolesti kod TNBC

Pored toga, utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u preživljavanju u grupi bolesnica bez relapsa bolesti sa niskom i visokom ekspresijom mTOR protein (Log –rank Mantel-Cox test, $p=0,1076$) (**Grafikon 4.12**). Takođe, nije pokazana statistička značajnost među bolesnicama sa niskom i visokom ekspresijom mTOR protein u odnosu na ukupno preživljavanje, tj vreme preživljavanja do pojave smrtnog ishoda. (Log –rank Mantel-Cox test, $p=0,5439$) (**Grafikon 4.13**).



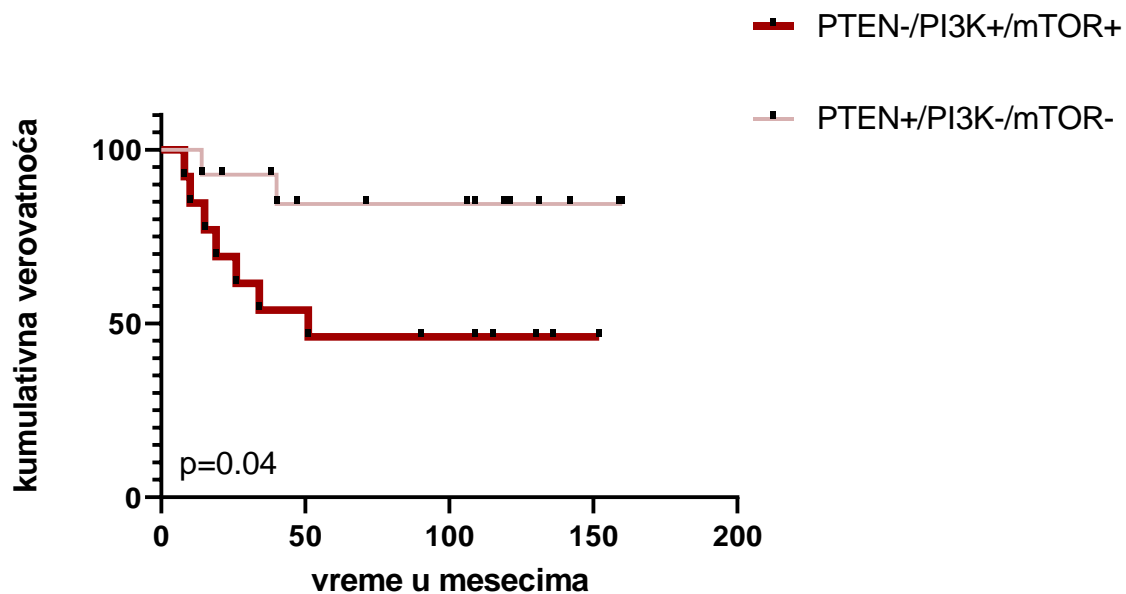
Grafikon 4.12. Kaplan Meier-ova kriva preživljavanja. Analiza preživljavanja bez relapse bolesti među bolesnicama sa niskom i visokom ekspresijom mTOR proteina



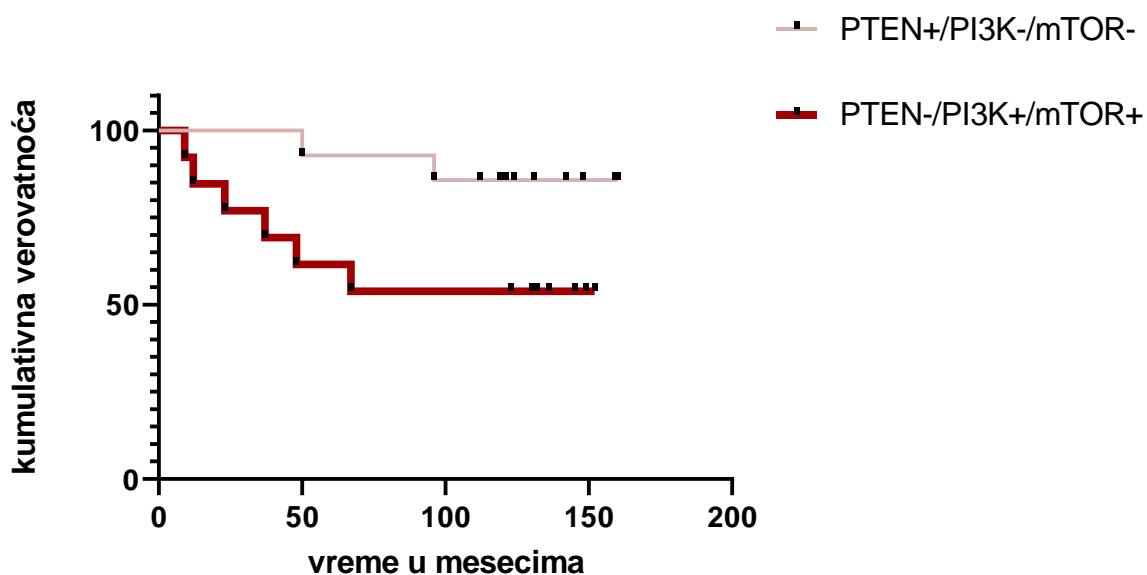
Grafikon 4.13. Kaplan Meier-ova kriva preživljavanja. Analiza ukupnog preživljavanja među bolesnicima sa niskom i visokom ekspresijom mTOR proteina.

4.6. Asocijacija imunoekspresije PTEN, PI3K i mTOR proteina sa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC tumora

Analizirajući uticaj imunoekspresije PTEN, PI3K i mTOR proteina na preživljavanje kod bolesnica u grupama sa niskom i visokom ekspresijom ovih proteina nije uočena nikakva statistička značajnost. Zbog toga je urađena analiza međuzavisnosti između dve podgrupe bolesnica, PTEN-/PI3K+/mTOR+ grupe (niska ekspresija PTEN proteina sa visokom ekspresijom PI3K i mTOR proteina) i PTEN+/PI3K-/mTOR grupe (visoka ekspresija PTEN proteina sa niskom ekspresijom PI3K i mTOR proteina) u odnosu na ishod bolesti, relaps bolesti i smrtni ishod. Dobijeni rezultati ukazuju da je kod bolesnica sa suprimiranom ekspresijom PTEN proteina i visokom ekspresijom PI3K/mTOR proteina, pojava relapsa bolesti bila značajno češća u odnosu na drugu podgrupu bolesnica sa visokom ekspresijom PTEN proteina i niskom ekspresijom PI3K/mTOR proteina. Drugim rečima, smanjena/odsutna PTEN ekspresija uz visoku ekspresiju PI3K/mTOR proteina statistički je češća kod bolesnica sa relapsom bolesti. Analiza perioda, odnosno vremena, bez relapsa bolesti (DFI) pokazala je da bolesnice sa fenotipom PTEN+/PI3K-/mTOR- imaju statistički značajno duži DFI u odnosu na bolesnice sa suprimiranom ekspresijom (Log-rank, Mantel-Cox test, $p=0.00389$) **Grafikon 4.14.** Dodatno je i ukupno preživljavanje (OS) u podgrupi bolesnica sa smanjenom ekspresijom PTEN proteina i visokom ekspresijom mTOR/PI3K proteina bilo statistički kraće u odnosu na podgrupu bolesnica sa prisutnom ekspresijom PTEN proteina i suprimiranom ekspresijom PI3K/mTOR proteina (log-rank Mantel-Cox test, $p=0.0501$). **Grafikon 4.15.**



Grafikon 4.14. Kaplan Meier-ova kriva preživljavanja. Analiza preživljavanja bez relapsa bolesti među bolesnicima sa PTEN-/PI3K+/mTOR+ i PTEN+/PI3K-/mTOR-



Grafikon 4.15. Kaplan Meier-ova kriva preživljavanja. Analiza ukupnog preživljavanja među bolesnicima sa PTEN-/PI3K+/mTOR+ i PTEN+/PI3K-/mTOR-

Od posebnog interesa je bilo i ispitati povezanost ova dva fenotipa (dve grupe pacijentkinja), PTEN-/PI3K+/mTOR+ (niska ekspresija PTEN proteina sa visokom ekspresijom PI3K i mTOR proteina) i PTEN+/PI3K-/mTOR- (visoka ekspresija PTEN proteina sa niskom ekspresijom PI3K i mTOR proteina) sa kliničko-patološkim parametrima. Svi dobijeni rezultati prikazani su u **Tabeli 4.6.**

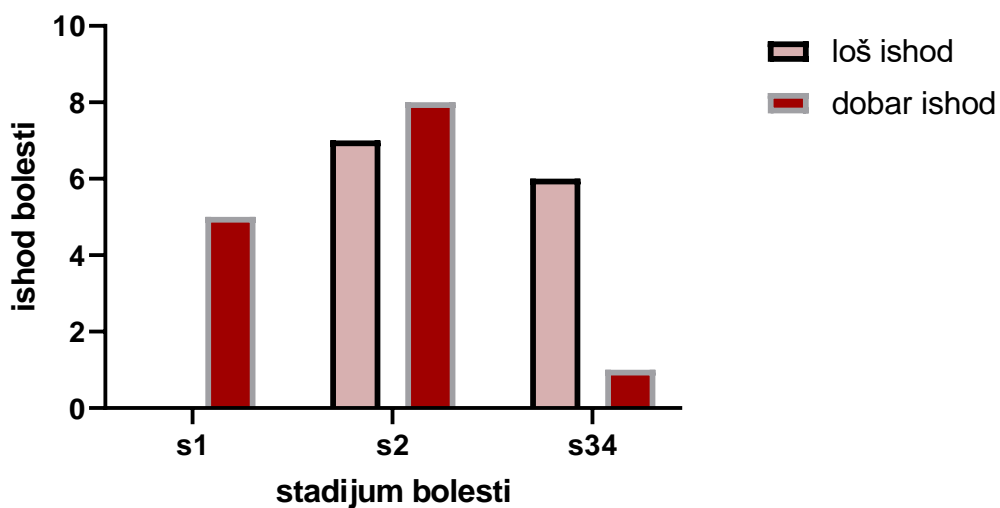
Tako je, u grupi bolesnica sa smanjenom ekspresijom PTEN proteina i visokom ekspresijom PI3K/mTOR proteina 54% je bilo u II stadijumu bolesti a 46% u III i IV stadijumu bolesti. Utvrđena je statistički značajnu razliku između grupe PTEN-/PI3K/mTOR+ bolesnica i PTEN+/PI3K-/mTOR- u odnosu na stadijum bolesti (Hi-kvadrat test, $p=0,0135$, **Grafikon 4.16**).

Takođe je uočeno da u grupi bolesnica sa smanjenom ekspresijom PTEN proteina i visokom ekspresijom PI3K/mTOR proteina 38% bolesnica ima zahvaćene regionalne limfne noduse u N1 stadijumu bolesti i 31% bolesnica u N2 i N3 stadijumu bolesti, dok je 46% bolesnica imalo udaljene metastaze (M1). Između analiziranih grupa sa suprimiranom i visokom ekspresijom PTEN proteina postoji statističku značajnost u odnosu na limfonodalni status (Hi-kvadrat test, $p=0,0147$, **Grafikon 4.17**) i metastatsku bolest (Fisher-ov test, $p=0,0329$; **Grafikon 4.18.**)

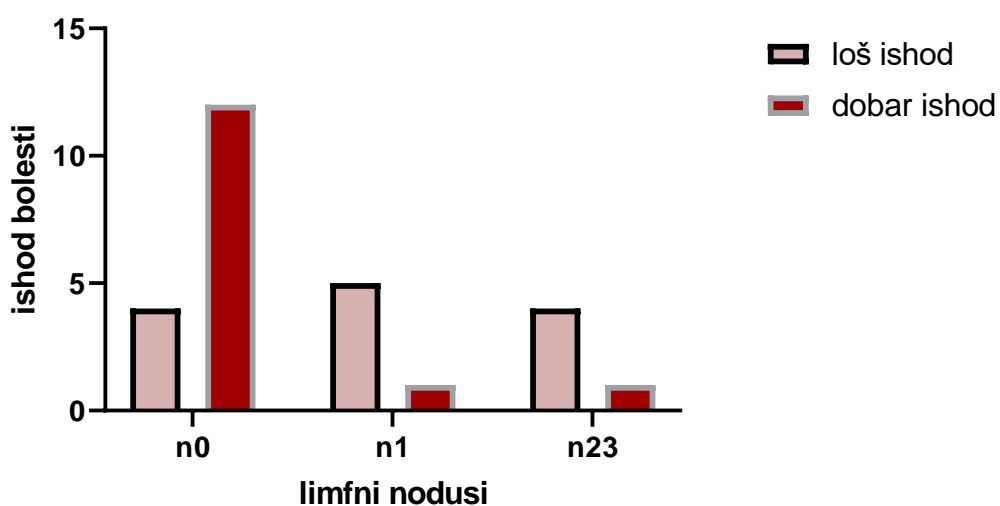
Sa druge strane, nije detektovana statistički značajna povezanost između opisanih podgrupa unutar TNBC u odnosu na starost bolesnica ($p=0,99$), tip tumora ($p=0,28$), stadijum tumora ($p=0,19$) i histološki gradus tumora ($p=0,44$). **Tabela 4.6**

Tabela 4.6. Analiza zavisnosti PTEN-/PI3K+/mTOR+ i PTEN+/PI3K-/mTOR- pacientkinja sa kliničko patološkim parametrima

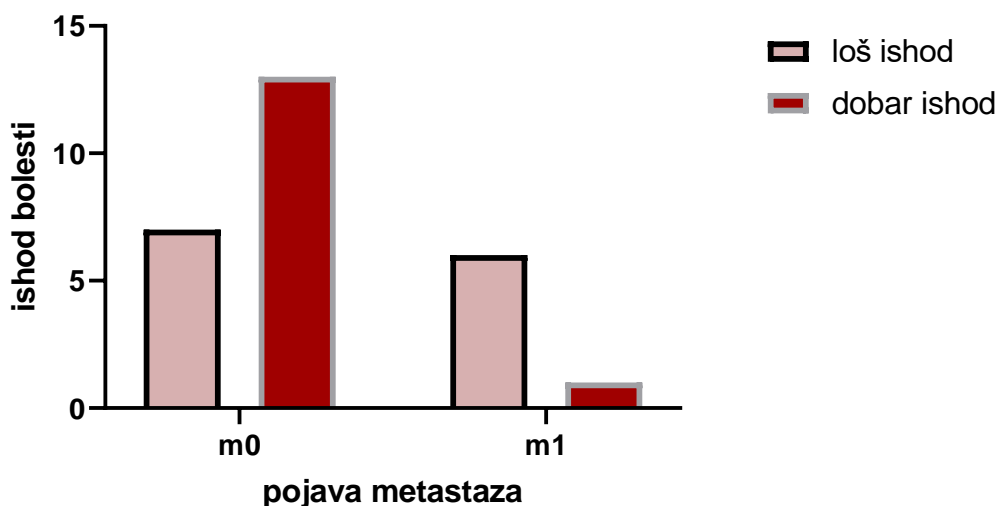
Parametri	PTEN - /PI3K+/mTOR+	PTEN +/PI3K- /mTOR-	p vrednost
	br (%)	br (%)	
Starost bolesnica			
<50	4 (31)	4 (28)	0.99
≥50	9 (69)	10 (72)	
Tip tumora			
Duktalni	5 (38)	8 (56)	0.28
Lobularni	4 (31)	1 (8)	
Ostali*	4 (31)	5 (36)	
Stadijum bolesti			
I	0 (0)	5 (36)	0.01
II	7 (54)	8 (57)	
III ,IV	6 (46)	1 (7)	
Veličina tumora			
T1	2 (15)	5 (36)	0.19
T2	9 (70)	9 (64)	
T3,T4	2 (15)	0 (0)	
Zahvaćenost nodusa			
N0	4 (31)	12 (84)	0.01
N1	5 (38)	1 (8)	
N2 , N3	4 (31)	1 (8)	
Histološki gradus			
I ,II	7 (54)	10 (72)	0.44
III	6 (46)	4 (28)	
Metastaze			
M0	7 (54)	13 (93)	0.03
M1	6 (46)	1 (7)	



Grafikon 4.16. Grafički prikaz zavisnosti PTEN-/PI3K+/mTOR+ fenotipa pacijentkinja u odnosu na stadijum TNBC bolesti



Grafikon 4.17. Grafički prikaz zavisnosti PTEN-/PI3K+/mTOR+ fenotipa TNBC pacijentkinja u odnosu na zahvaćenost limfnih nodusa



Grafikon 4.18 .Grafički prikaz zavisnosti PTEN-/PI3K+/mTOR+ TNBC pacijentkinja u odnosu na metastatsku bolest.

Sledeći korak je bio analiza nivoa ekspresije, visoka / niska, mTOR proteina sa nivoom ekspresije, visokim / niskim, PI3K proteina. Naša analiza je pokazala statistički značajnu povezanost (Fisher-ov test, $p=0,0015$) visoke ekspresije PI3K proteina sa visokom ekspresijom mTOR proteina. **Tabela 4.7**

Tabela 4.7. Međuzavisnost ekspresije PI3K i mTOR proteina kod TNBC

PI3K	niska	visoka	p vrednost
mTOR	br(%)	br(%)	
niska	30(71,43%)	9(32,14%)	
visoka	12 (28,57%)	19(67,86%)	0,0015

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

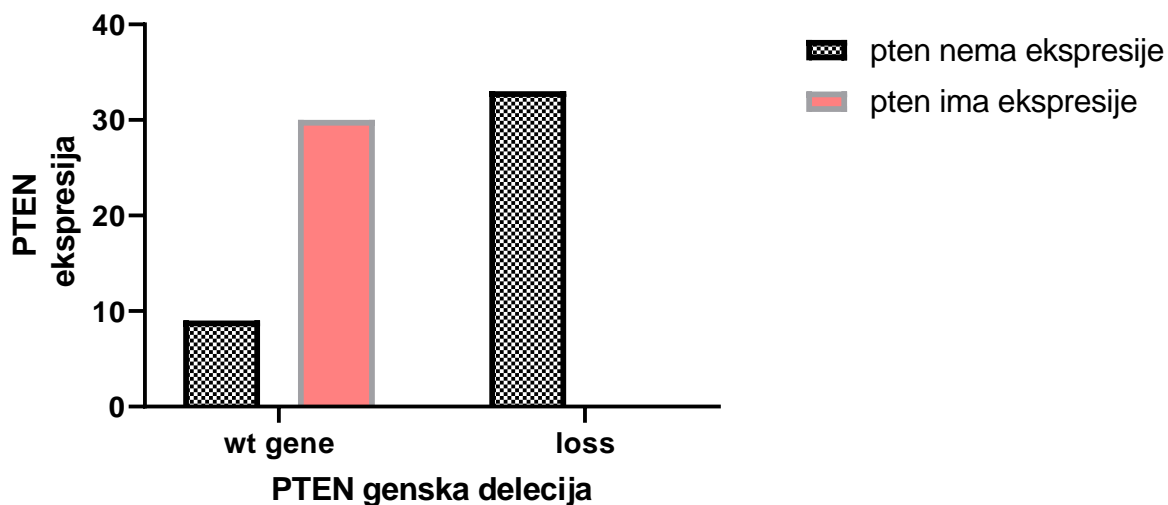
Masna slova označavaju statistički značajne vrednosti, $p < 0.05$

4.7. Povezanost *PTEN* LOH-a sa kliničkim i histopatološkim parametrima TNBC

U ovoj studiji je ispitivan najčešći mehanizam inaktivacije *PTEN* tumor supresor gena, gubitak heterozigotnosti (LOH), kod 70 pacijentkinja sa trostruko negativnim tumorima dojke i rezultati analizirani u odnosu na kliničke i histopatološke parametre tumora.

PTEN delecije su nađene u 44% (31/70) bolesnica od kojih su hemizigotne delecije detektovane kod 37% bolesnica (26/70) dok su kod 7% (5/70) detektovane homozigotne delecije. Analizirajući povezanost LOH *PTEN*-a sa ekspresijom *PTEN* proteina uočeno je da je kod 79% pacijentkinja sa delecijom *PTEN* gena (homozigotne i hemizigotne delecije) istovremeno bila

prisutna smanjena/odsutna ekspresija PTEN proteina (Fisherov test, $p < 0,0001$). Istovremeno, kod 21% bolesnicu grupi bez delecija *PTEN* gena (eng *wild type*- wt), uočena je smanjena ekspresija PTEN proteina (**Grafikon 4.19**).



Grafikon 4.19. Međuzavisnost LOH *PTEN* gena (homozigotne i/ili hemizigotne delecije) i ekspresije PTEN proteina

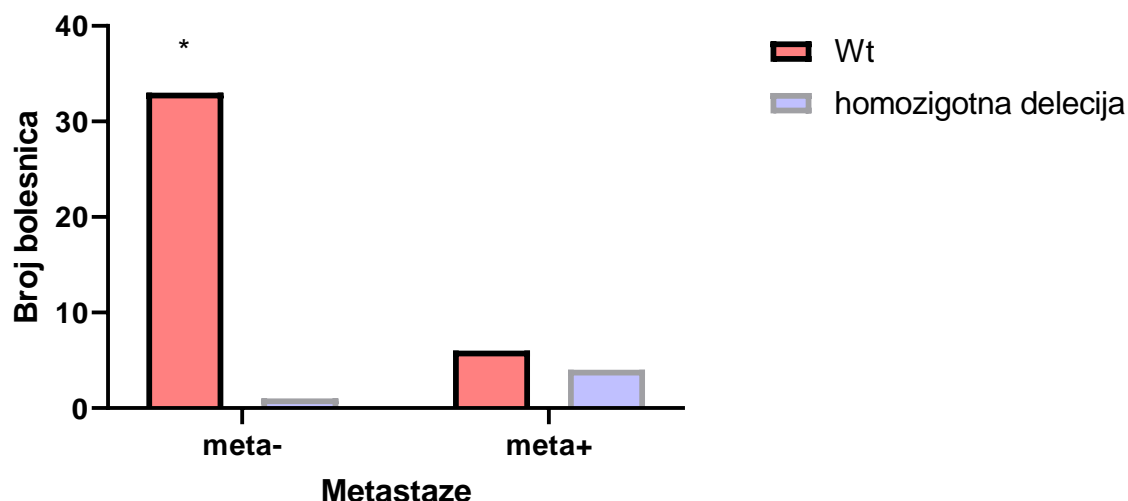
Analizirajući grupu bolesnica sa homozigotnim delecijama *PTEN* gena pojava metastaza je bilastatički značajno veću odnosu na bolesnice sa normalnim brojem kopija *PTEN* gena, “wild type”-Wt, (Fisher-ov test, $p=0,0068$) (**Tabela 4.8, Grafikon 4.20**). Nasuprot tome, nije detektovana statistički značajna povezanost između grupa bolesnica sa hemizigotnom delecijom *PTEN* gena i Wt *PTEN* gena u odnosu na pojavu metastaza. (Fisher-ov test, $p=0,7431$)

Tabela 4.8. Povezanost delecije *PTEN* genai pojave metastaza kod TNBC

ispitivani gen	ima metastaza	nema metastaza	p vrednost
pten delecija	br (%)	br(%)	
Wt	6(15,38%)	33(84,62%)	0,0068
Homozigot	4(80,00%)	1(20,00%)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Masna slova označavaju statistički značajne vrednosti, $p < 0.05$.



Grafikon 4.20. Povezanost homozigotne delecije *PTEN* gena i pojave metastaza kod TNBC

Tabela 4.9. Učestalost LOH-a u odnosu na pojavu metastaza

ispitivani gen	ima metastaza	nema metastaza	p vrednost
pten delecija	br (%)		
Wt	6(15,38%)	33(84,62%)	0,7431
Hemozigot	5(19,23%)	21(80,77%)	

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Masna slova označavaju statistički značajne vrednosti, $p < 0.05$

Uporednom analizom grupa bolesnica sa *PTEN* delecijama i bolesnica bez delecija u odnosu na stadijum bolesti, nije detektovana statistički značajna razlika u učestalosti LOH-a između bolesnica sa hemizigotnom delecijom (Hi-kvadrat, $p=0,3811$), bolesnica sa homozigotnom delecijom (Hi-kvadrat, $p=0,3005$) i bolesnica sa ukupnim delecijama *PTEN* gena (uključujući i homo i hemizigotne delecije) (Hi- kvadrat, $P=0,2357$) **Tabela 4.10.**

Tabela 4.10. Učestalost LOH-a u odnosu na stadijum bolesti

ispitivani gen	stadijum1	stadijum2	stadijum3,4	p vrednost
pten delecija				
Wt	8	8	13	
homozigotna delecija	0	2	3	0,3811
hemizigotna delecija	2	16	8	0,3005
ukupna delecija	2	8	11	0,2357

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Masna slova označava statistički značajne vrednosti, $p < 0.05$

Korelaciona analiza prisustva *PTEN* LOH-a i ostalih kliničko-histopatoloških parametara (veličina tumora, tip tumora, zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa) nije pokazala nikavu statistički značajnu povezanost između ovih parametara. Tako, nije detektovana statistička značajnost u učestalosti pojave LOH *PTEN*-a i veličine tumora (Hi kvadrat test, $p=0,7688$) (**Tabela 4.11**). Sličan rezultat je dobijen i analizom učestalosti pojave LOH *PTEN*-a u odnosu na limfonodalni status pacijentkinja (Hi kvadrat test, $p=0,1386$) (**Tabela 4.12**).

Tabela 4.11. Učestalost LOH-a u odnosu na veličinu tumora

ispitivani gen	tumor1	tumor2	tumor3,4	p vrednost
pten delecija				
Wt	11	23	5	
Homoziĝotna delecija	0	4	1	0,3873
hemizigotna delecija	7	16	3	0,9767
ukupna delecija	7	22	4	0,7688

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Masna slova označavaju statistički značajne vrednosti, $p < 0.05$

Tabela 4.12. Učestalost gubitka heterozigotnosti u odnosu na limfonodalni status

ispitivani gen	no	n1	n2,3	p vrednost
pten delecija				
Wt	24	6	9	
Homoziĝotna delecija	1	2	2	0,1891
hemizigotna delecija	11	9	6	0,1677
ukupna delecija	12	10	8	0,1386

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Masna slova označavaju statistički značajne vrednosti, $p < 0.05$

Za razliku od prethodno pomenutih analiza, korelaciona analiza gubitka heterozigotnost *PTEN* gena LOH-a i histološkog tipa karcinoma (duktalni vs lobularni vs drugi) pokazala je statistički značajnu razliku u učestalosti pojave LOH-a kod duktalnih karcinoma u odnosu na ostale histološke tipove. (Hi kvadrat test, $p=0,0580$) (**Tabeli 4.13**).

Tabela 4.13. Učestalost LOH-a u odnosu na tip tumora

ispitivani gen	duktalni	lobularni	drugi	p vrednost
pten delecija				
Wt	23	4	12	
Homoziĝotna delecija	3	2	0	0,1100
Hemizigotna delecija	15	7	4	0,1310
ukupna delecija	18	9	4	0,0580

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Masna slova označavaju statistički značajne vrednosti, $p < 0.05$

Takođe, uočena je statistički značajna razlika u učestalosti procentualne zastupljenosti LOH-a u odnosu na histološki gradus tumora (Fisher-ov test, $p=0,0484$), što je prikazano u **Tabeli 4.14**. Delecija *PTEN* gena je detektovana kod 77,42% bolesnica sa nižim i srednjim gradusom tumora G1 i G2 i kod 22,58% pacijentkinja sa visokim gradusom tumora G3.

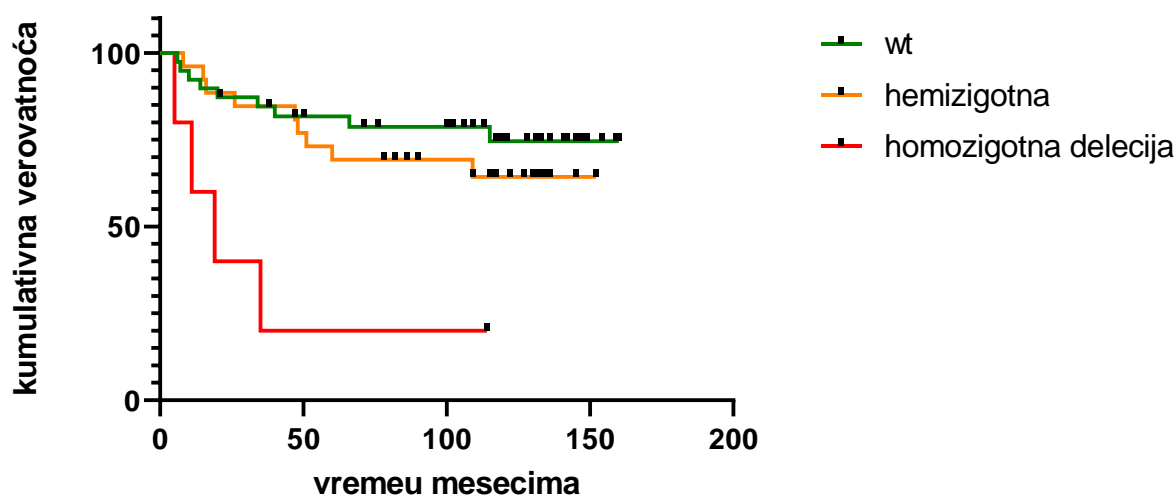
Tabela 4.14. Učestalost LOH-a u odnosu na gradus tumora

ispitivani gen	gradus1,2	gradus3	p vrednost
pten delecija	br(%)	br (%)	
Wt	21 (53,85%)	18(46,15%)	
homozigot	4(80,00%)	1(20,00%)	0,3702
Hemizigot	20(76,92%)	6(23,08%)	0,0711
ukupna delecija	24(77,42%)	7(22,58%)	0,0484

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

Masna slova označavaju statistički značajne vrednosti, $p < 0.05$

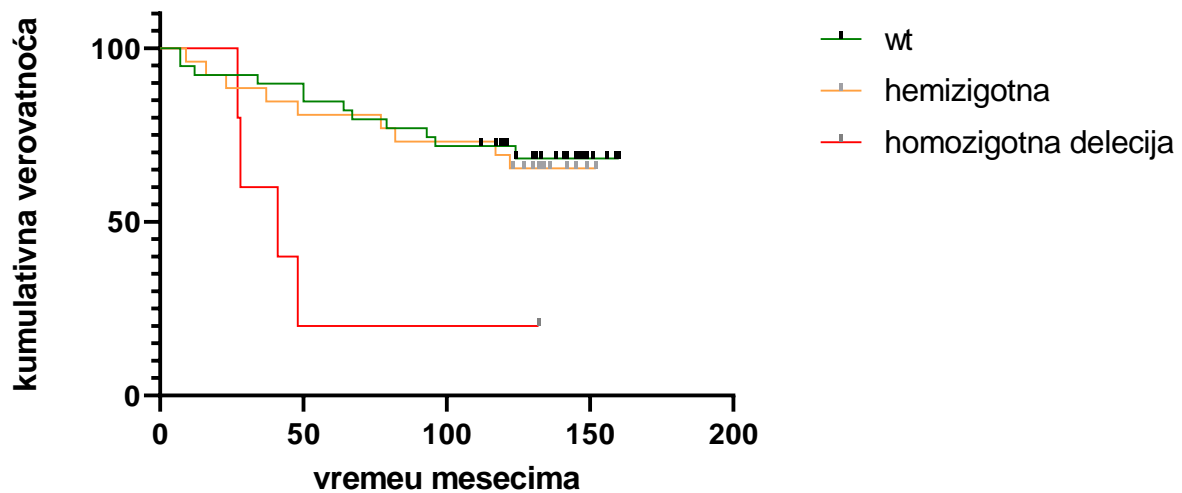
Sledeći važni parametri koji su analizirani bili su ishod bolesti (DFI i OS) u odnosu na prisustvo/odsustvo gubitka heterozigotnosti. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju bez relapsa bolesti (Log –rank Mantel-Cox test, $p=0,0017$) između podgrupa bolesnica bez delecije *PTEN* gena, bolesnica sa hemizigotnim i bolesnica sa homozigotnim delecijama. Drugim rečima, veća učestalost pojave LOH-a (homozigotne delecije) kod bolesnica sa relapsom bolesti u odnosu na bolesnice bez relapsa bolesti , što je prikazano na **Grafikonu 4.21**.



Grafikon 4.21. Kaplan Meier-ova kriva preživljavanja.DFI između grupasa *PTEN* delecijama (homozigotne i hemizigotne delecije) i grupe bez delecija (wt)

Takođe, uočena je statistički značajna povezanost prisustva LOH *PTEN-a* i ukupnog preživljavanja (OS) (Log –rank Mantel-Cox test, $p=0,0114$). Drugim rečima, bolesnice sa

homozigotnim delecijama imaju najkraći period ukupnog preživljavanja. Najduže vreme preživljavanja smo uočili u grupi bolesnica bez delecije *PTEN* gena (wt) (**Grafikon 4.22**).



Grafikon 4.22. Kaplan Meier-ova kriva preživljavanja. OS između grupa sa *PTEN* delecijama (homozigotne i hemizigotne delecije) i grupe bez delecija (wt)

4.8. Imunoekspresija ABCB1 (MDR1) transmembranskog proteina i njegova povezanost sa kliničko-histopatološkim parametrima

Rezultati istraživanja su pokazali da nema značajne asocijacije (statističke značajnosti) između niske i visoke ekspresije MDR1 proteina i starosti bolesnica (Hi-kvadrat test, $p=0,5720$), tipa tumora (Hi kvadrat test, $p= 0,2069$), gradusa tumora (Hi-kvadrat test, $p=0,7767$), stadijuma bolesti (Hi-kvadrat test, $p=0,6587$) veličini tumora (Hi-kvadrat test, $p=0,4586$), zahvaćenosti limfnih nodusa (Hi-kvadrat test, $p=0,3382$). Opisane karakteristike i značajnost sa parametrima opisani su u **Tabeli 4.15**.

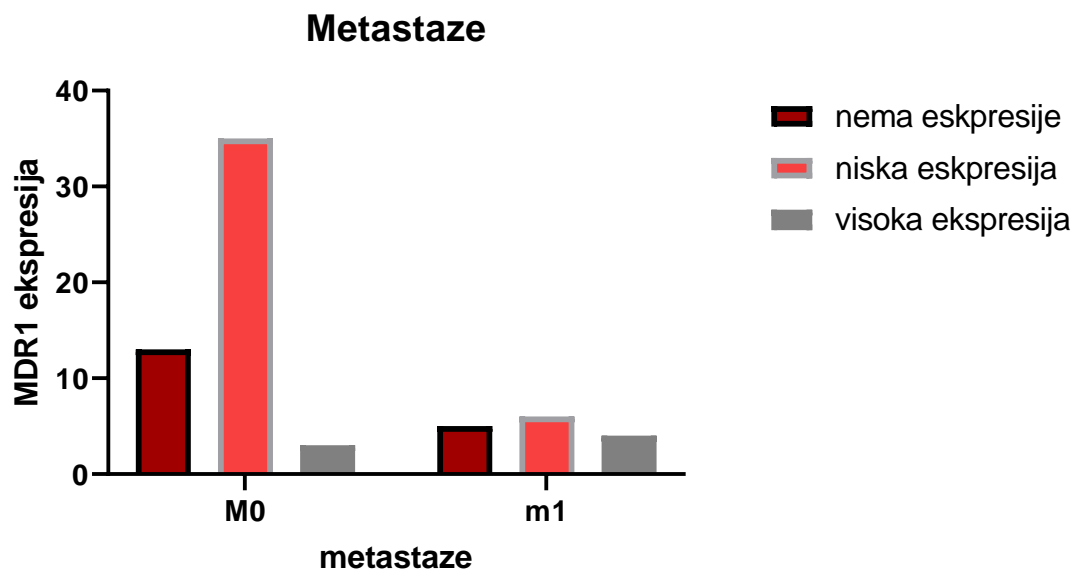
Tabela 4.15. Nivo ekspresije MDR1 proteina i karakteristike tumora

karakteristike	bez ekspresije	niska ekspresija	visoka ekspresija	N(%)	p
klinički stadijum bolesti					
stadijum 1,2	12 (15,38)	30 (38,46)	4 (5,12)		0,6587
stadijum 3,4	6 (7,69)	11 (14,10)	3 (3,84)		
histološki tip tumora					
duktalni	10 (12,82)	27 (34,62)	2 (2,56)		0,2069
lobularni	2 (2,56)	7 (8,97)	3 (3,84)		
ostali	6 (7,69)	7 (8,97)	2 (2,56)		
histološki gradus tumora					
gradus 1,2	11 (14,10)	28 (35,90)	4 (5,12)		0,7767
gradus 3	7 (8,97)	13 (16,67)	3 (3,84)		
veličina tumora					
T1,2	15 (19,23)	37 (47,44)	7 (8,97)		0,4586
T3,4	3 (3,84)	4 (5,12)	0 0		
nodalni status					
N0	7 (8,97)	24 (30,77)	3 (3,84)		0,3382
N1,2,3	11 (14,10)	17 (21,79)	4 (5,12)		
metastaze					
M0	13 (16,67)	35 (44,87)	3 (3,84)		0,0386
M1	5 (6,41)	6 (7,69)	4 (5,12)		

Legenda: br, broj bolesnica po grupi.

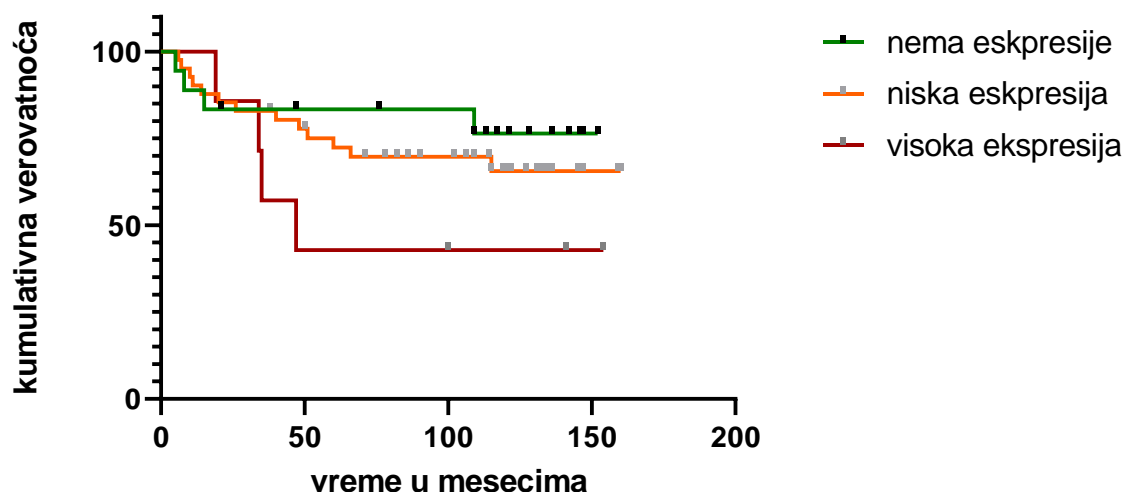
Masna slova označavaju statistički značajne vrednosti, $p < 0.05$.

Suprotno tome, pokazana je statistički značajno povećana ekspresija MDR1 proteina kod pacijentkinja sa agresivnijem ponašanjem tumora i pojavom metastaza (Hi-kvadrat test, $p=0,0386$). Drugim rečima povećana ekspresija MDR1 proteina statistički je češća kod pacijentkinja sa lošijim ishodom bolesti nego kod bolesnica bez relapsa bolesti (**Grafikon 4.24**).

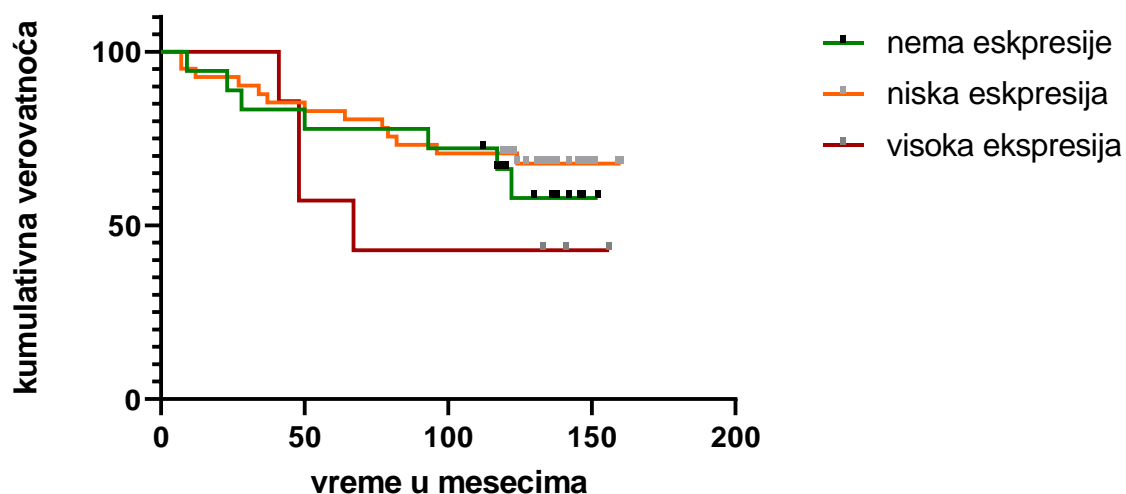


Grafikon 4.24. MDR1 ekspresija u odnosu na pojavu metastaza

Analiza preživljavanja, DFI i OS, između pacijentkinja sa niskom i visokom ekspresijom MDR1 proteina pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju bez znakova bolesti i ukupnom preživljavanju (Log –rank Mantel-Cox test, $p=0,2727$; $p=0,3918$). Na kraju, ukupno preživljavanje i preživljavanje bez znakova bolesti kod bolesnica sa visokom ekspresijom MDR1 proteina bilo je nešto lošije u poređenju sa bolesnicama sa niskom ekspresijom datog proteina, a najbolje preživljavanje uočeno je kod pacijentkinja bez ekspresije MDR1 proteina (Grafikon 4.25, 4.26).



Grafikon 4.25. Kaplan Meier-ova kriva preživljavanja. Analiza DFI među bolesnicama sa različitom ekspresijom MDR1 proteina.



Grafikon 4.26. Kaplan Meier-ova kriva preživljavanja. Analiza OS među bolesnicima sarazličitom ekspresijom MDR1 proteina

4.9 Aktivacija PAM signalnog puta i ekspresija MDR1 proteina

Aktivacija PAM signalnog puta, u osnovi je predstavljena PTEN-/PI3K+/mTOR+ ekspresionim fenotipom. Naši rezultati pokazuju da postoji korelacija između PTEN-/PI3K+/mTOR+ ekspresionog fenotipa i MDR1 proteina. Naime, 85,71% pacijentkinja koje su imale nisku ekspresiju PTEN proteina imale su i visoku ekspresiju MDR1 proteina, doduše bez statističke značajnosti (Fišerov test, $p=0,1199$). Dodatno, kod 42,86% bolesnica pokazana je visoka ekspresija PI3K i mTOR proteina uz istovremeno visoku ekspresiju MDR1 proteina ali ponovo bez statističke značajnosti (Fišerov test, $p>0,9999$).

Gledajući pojedinačno odnose molekula PAM signalnog puta i MDR1 proteina nije pokazana statistički značajna asocijacija ni u jednom slučaju: ekspresija PTEN proteina i MDR1 proteina (Spirmanov test, $p=0,2052$), ekspresija PI3K proteina i MDR1 proteina (Spirmanov test, $p=0,9097$) i ekspresija mTOR i MDR1 proteina (Spirmanov test, $p=0,4549$).

5. DISKUSIJA

PTEN/PI3K/AKT/mTOR (PAM) je jedan od najvažnijih signalnih puteva koji reguliše proliferaciju i preživljavanje ćelija i zbog toga sigurno igra važnu ulogu i u procesu kancerogeneze. Međutim, njegova uloga u promociji i progresiji humanih maligniteta, kao i u rezistenciji na terapiju je i dalje vrlo kontroverzna.

Najverovatnije ključni protein PAM signalnog puta predstavlja *PTEN* tumor supresor koji se ponaša kao negativni regulator celog signalnog puta i njegova inaktivacija dovodi do stimulacije PAM puta preživljavanja koja se ogleda, pre svega, u povećanoj ekspresiji efektornih molekula gde najvažnije mesto zauzima mTOR protein. U cilju utvrđivanja aktivacije/inaktivacije ovog signalnog puta analizirali smo ekspresiju PTEN, PI3K i mTOR proteina.

PTEN protein identifikovan je u citoplazmi i u jedru, u normalnim i tumorskim ćelijama (Bononi and Pinton, 2015). Dobro je poznata uloga PTEN-a na plazma membrani gde defosforilacijom PIP3 do PIP2 sprečava fosforilaciju i aktivaciju AKT proteina i nadalje kaskadnu aktivaciju celog PAM signalnog puta. PTEN praktično antagonizuje PAM signalni put preživljavanja. Smatra se da u citoplazmi PTEN protein interreaguje sa organelama mitohodrija i endoplazmatskog retikuluma i da je kao takav u inaktivnom stanju i ne može da deluje na plazma membranu tako da se tumor supresorski mehanizam PTEN-a na subcelularnom nivou odvija verovatno kroz manje poznate druge mehanizme (Bononi and Pinton, 2015).

Lian i saradnici smatraju da su komponente PAM signalnog puta koje uključuju PIP2, PIP3, PDK1 i AKT prisutne u jedru i da je repertoar ključnih aktivnosti u jedru upravo PIP3 fosfatazna zavisna aktivnost PTEN-a i da se tumor supresorska aktivnost upravo ispoljava u jedru (Lian and Di Cristofano, 2005) (Shi et al., 2012).

Prilikom patohistološke analize imunohistohemijske ekspresije PTEN proteina uočili smo da je u većini trostruko negativnih karcinoma dojke imunoreaktivnost izražena u citoplazmi u odnosu na jedro što bi govorilo u prilog češćoj citoplazmatskoj lokalizaciji PTEN-a. tj, njegovom inaktivnom stanju. Takođe, naši rezultati su pokazali da je kod najmanjeg broja bolesnica PTEN protein eksprimiran i u jedru i u citoplazmi.

Studija je potvrdila povećanu ekspresiju PTEN proteina kod 43% TNBC bolesnica dok je kod 57% bolesnica ona potpuno odsutno odsutna ili smanjena. Kada se tome doda i prevalentna lokalizacija PTEN proteina, jasno je da je kod TNBC pacijentkinja PTEN većinski suprimiran, odn. PAM signalni put aktiviran. Poredeći ekspresiju PTEN proteina između TNBC bolesnica i ER+

pacijentkinja uočili smo vrlo značajno smanjenje, suprimiranje ekspresije PTEN proteina kod TNBC pacijentkinja. Iznenadujuće, korelacione analize međuzavisnosti nisu pokazale nikakvu povezanost između nivoa ekspresije PTEN proteina i kliničko histopatoloških parametara, kao i ishoda bolesti.

Slično PTEN ekspresiji, imunoekspresija PI3K proteina potvrđena je u jedru i u citoplazmi i smatra se da je lokalizacija i aktivacija PIP3, PIP2 i njihovih kinaza u jedru nezavisna u odnosu na citoplazmu (Davis et al., 2015). Naši rezultati su pokazali citoplazmatsku imunoreaktivnost PI3K proteina kod najvećeg broja bolesnica u grupi TNBC.

Ito i saradnici (2019) su pokazali da u karcinomima dojke mTOR protein može biti lokalizovan kako u nukleusu tako i u citoplazmi ali ne nalaze statistički značajnu razliku u prognozi bolesti unutar TNBC grupe između bolesnica sa nuklearnim mTOR imunoreaktivnošću u odnosu na citoplazmatsko imunobojenje (Ito et al., 2019). Naša histopatološka analiza imunoekspresije mTOR proteina kod TNBC pacijentkinja pokazala je imunoreaktivnost pretežno u citoplazmi i membrani tumorskih ćelija. Takođe, zapazili smo različit intenzitet i distribuciju bojenja PTEN, PI3K i mTOR unutar jednog istog tumora, što govori u prilog izrazitoj intratumorskoj heterogenosti.

U analiziranoj grupi bolesnica sa TNBC uočili smo značajnu zavisnost visoke ekspresije PI3K (40%) i visoke ekspresije mTOR (44%). Pored toga, pokazali smo da je visoka ekspresija PI3K u asocijaciji sa veličinom tumora, limfnim metastazama i uznapredovalim stadijumu bolesti. Takođe pokazali smo značajnu povezanost visoke ekspresije mTOR proteina i uznapredovalog stadijuma bolesti, ali ne i sa ostalim analiziranim parametrima. U prilog našim rezultatima idu rezultati nekih drugih studija. Tako su Zhang and Richmond (2021) pokazali da povećana ekspresija PI3K proteina i poremećen PTEN/PI3K/AKT/mTOR signalni put u trostruko negativnim karcinomima dojke može da dovede i do rezistencije na hemioterapiju. Pored toga, druge studije govore o značaju i učestalosti povećane ekspresije mTOR proteina u TNBC i njegovoj korelaciji sa jako lošom prognozom (Davis et al., 2014; Pelicano et al., 2014). Isto tako, neke ranije studije su pokazale da ne postoji značajna veza između povećane ekspresija mTOR proteina i kliničkopatoloških parametara (Walsh et al., 2012) kod TNBC, što je u skladu i sa našim rezultatima.

Poznato je da suprimirana ekspresija PTEN-a dovodi do porasta aktivnosti PI3K koji fosforilacijom fosfoinozitida aktivira AKT koji putem nishodne komponenete mTOR proteina i aktivacije transkripcionih faktora inhibira apoptozu i stimuliše ćelijsko preživljavanje (Guimarães et al., 2015). Naša istraživanja pokazala su značajnu korelaciju u ekspresiji PI3K i mTOR proteina. 67,86% bolesnica u grupi TNBC su imale istovremeno visoku ekspresiju PI3K i mTOR proteina.

Dobijeni rezultati su pokazali asocijaciju niske ekspresije PTEN proteina sa visokom ekspresijom PI3K/mTOR proteina, lošije preživljavanje, tj kraći period preživljavanja i lošiji ishod bolesti. Suprotno, zapaženo je da PTEN pozitivna proteinska ekspresija uz smanjenu PI3K/mTOR ekspresiju dovodi do smanjenja rizika za agresivnu bolest, tj. duži period preživljavanja. Drugim rečima, suprimirana PTEN ekspresija sa pozitivnom, povišenom, ekspresijom PI3K i mTOR proteina bila je statistički značajno češća kod bolesnica sa relapsom bolesti i pojavom smrtnog ishoda, odnosno veoma loša kombinacija.

Ispitujući ekspresiju PTEN-a u odnosu na ekspresiju PI3K i mTOR proteina, uočili smo statističku značajnost između različitih fenotipa, PTEN- / PI3K+ / mTOR+ i PTEN+/ PI3K-/ mTOR- ekspresije, u odnosu na zahvaćenost limfnih čvorova, patološki prognostički stadijum, pojavu metastaza, DFI i OS. Pokazali smo da suprimirana ili odsutna PTEN ekspresija sa visokom PI3K i mTOR ekspresijom utiče na nepovoljno i agresivno ponašanje tumora i definitivno se može smatrati profilom 'visokog rizika'.

Kako je inaktivacija *PTEN* gena i smanjena ekspresija PTEN proteina očigledno bila presudna za formiranje PTEN- / PI3K+ / mTOR+ fenotipa koji ima lošiju prognozu i vodi lošem ishodu, odlučili smo da analiziramo gubitak heterozigotnosti, LOH, kao pretpostavljeni najčešći mehanizam inaktivacije *PTEN* tumor supresor gena (Leslie and Downes, 2004).

Naše je istraživanje pokazalo da je gubitak heterozigotnosti (LOH) *PTEN* tumor supresor gena značajno zastupljeniji kod bolesnica sa TNBC u odnosu na bolesnice sa ER + tumorima što implicira da bi gubitak *PTEN-a* mogao biti presudni mehanizam inaktivacije *PTEN* gena koji direktno utiče na agresivno ponašanje ovog tipa tumora.

Pored karcinoma dojke, gde se po literaturnim podacima, delecija *PTEN* tumor supresora sreće u 4% do 63% slučajeva (Khan et al., 2018).

PTEN gen je gen koji je najčešće deletiran gen kod mnogih drugih malignih tumora kao što su karcinomi kolona, želuca, nestinoćelijski karcinomi pluća, karcinomi prostate zatim difuzni krupnoćelijski limfomi pa i mezoteliomi (Khan et al., 2018, Leslie and Downes, 2004). Naše istraživanje otkrilo je delecije *PTEN* gena kod 44% TNBC bolesnica od kojih je 37% bolesnica imalo hemizigotne delecije, dok je 7% imalo homozigotne delecije, potpuni gubitak *PTEN* gena. Ovi podaci koreliraju sa literaturnim podacima. Naime, učestalost LOH-a kao mehanizam inaktivacije *PTEN-a* bila je predmet nekih prethodnih studija u kojima je gubitak ekspresije PTEN-a varirao od 31% do 47% slučajeva svih karcinoma dojke (Nick R. Leslie and Downes, 2004) i od 44% do 85% slučajeva TNBC-a (Beg et al., 2015; Khan et al., 2018). Delecije *PTEN* gena u našoj studiji nađene su kod 44% ER/PR/HER2 negativnih tumora (ER-/PR-/HER2-). Lebok i sar. koji su

analizirali veliku grupu bolesnica obolelih od karcinoma dojke utvrdili su da su delecije *PTEN* gena češće kod ER-/PR- tumora (43%ER- i 23%PR- tumora) u odnosu na ER+/PR+ tumore (11% ER+/11% PR+ tumora) što se slaže sa našim rezultatima. Takođe, uočili smo da gubitak samo oba alela *PTEN* gena (homozigotne delecije) utiče na lošiju prognozu i lošiji odgovor na terapiju kod karcinoma dojke.

Prisustvo LOH-a analizirali smo sa ekspresijom PTEN proteina. Naime, 87% bolesnica sa delecijom *PTEN* gena (homozigotne i hemizigotne delecije) je pokazalo smanjenu ekspresiju PTEN proteina, tj smanjeno ili potpuno odsustvo PTEN imunobojenja.

Stoga smo zaključili da je LOH najznačajniji molekularni mehanizam odgovoran za redukciju ili potpuni gubitak PTEN proteina kod trostruko negativnih tumora dojke.

Dalje smo analizirali prisustvo LOH-a u odnosu na kliničkopatološke parametre: veličinu tumora, histološki tip tumora, histološki gradus tumora, stadijum bolesti, zahvaćenost limfnih nodusa i pojavu metastaza. Postoje značajna neslaganja u vezi sa gubitkom *PTEN-a* na kliničko ponašanje trostruko negativnih tumora. Neke studije nisu pronašle vezu između gubitka ekspresije PTEN-a i kliničkih parametara u grupi bolesnica kod TNBC (Khan et al., 2018). Beg i sar i Inanc i sar nalaze statističku značajnost u odnosu na zahvaćenost limfnih čvorova, preživljavanje bez relapsa bolesti (DFI) i pojavu smrtnog ishoda (OS). Za razliku od ovih studija naši rezultati nisu pokazali značajnu asocijaciju LOH *PTEN* gena u odnosu na veličinu tumora, histološki tipa tumora i stadijum bolesti. Međutim, utvrdili smo da su homozigotne delecije *PTEN-a* značajno povezane sa metastatskim širenjem bolesti kod TNBC, sugerišući da su tumori sa potpunim gubitkom *PTEN-a* mnogo agresivniji. U prilog ovom zaključku govori i studija da suprimiran PTEN gen uzrokuje metastatsku diseminaciju kod karcinoma dojke i prostate (Bandyopadhyay et al., 2004). Utvrdili smo da su delecije *PTEN* gena češće kod bolesnica sa dobro i srednje diferentovanim gradusom tumora što ukazuje na to da agresivnost tumora u pravcu metastatske bolesti u ovom slučaju ne zavisi toliko od stepena diferentovanosti tumora. Štoviše, pokazali smo da su homozigotne delecije *PTEN* gena povezane sa značajno kraćim DFI-om i OS-om TNBC pacijentkinja. Sve to govori u prilog tome da LOH kao mehanizam inaktivacije *PTEN* gena, posebno homozigotne delecije tj potpuni gubitak gena, utiče na agresivnije ponašanje tumora, pojavu metastaza, kraće preživljavanje i lošiju prognozu.

Uz to, prema našim rezultatima, čini se da hemizigotni gubitak *PTEN-a* nije dovoljan da aktivira PAM put. Međutim dobijene rezultate smo prihvatili sa rezervom s obzirom da Lebok i sar. dokazuju značajnu povezanost između hemizigotnih delecija *PTEN-a* i nepovoljnog ishoda bolesti kod karcinoma dojke (Lebok et al., 2015). Međutim naši podaci odgovaraju podacima koje iznose Ahearn i sar. i Jones i sar. (Ahearn et al., 2016; Jones et al., 2013).

Li i sar. su pokazali da je aktivacija PAM signalnog puta vrlo važan mehanizam sticanja rezistencije karcinoma dojke na hemioterapiju ali da u sticanju rezistencije bitnu ulogu igra i povećana ekspresija MDR1 transportera (Li et al., 2018). Zbog toga smo odlučili da u daljem procesu studije analiziramo ekspresiju MDR1 proteina i ispitamo značaj povezanost imunoekspresije ovog proteina sa kliničko-histopatološkim parametarima ishodom bolesti kod pacijentkinja sa TNBC.

In vitro studije pokazale su da je ABCB1 (MDR1) transporter odgovoran za eksport širokog spektra hemoterapeutika i samim tim odgovoran za hemorezistenciju kod karcinoma dojke. (Sissung et al., 2010). Ekspresija ovog transportera i njegova povezanost sa kliničkim karakteristikama, kliničkim ponašanjem i prognozom kod karcinoma dojke do danas je ispitana u nekoliko studija sa različitim, neuverljivim rezultatima (Faneyte et al., 2001).

U našoj studiji MDR1 protein je bio ekspirimiran u više od 2/3 (73%) ispitanih slučajeva TNBC, ali samo 11% imalo je visoku ekspresiju. Dosadašnji literaturni podaci ukazuju na izuzetnu heterogenost u ekspresiji MDR1 proteina u rasponu od 6% do 50% (Dexter et al., 1998; Leonessa and Clarke, 2003). Mehrotre i sar. su uočili značajno višu ekspresiju MDR1 proteina kod TNBC u odnosu na non-TNBC tumore (Luminal A i Luminal B) (Mehrotra et al., 2018).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da nema značajne asocijacije između nivoa ekspresije MDR1 proteina histološkog tipa tumora, veličine tumora, histološkog gradusa, stadijuma bolesti i zahvaćenosti limfnih nodusa.

Sa druge strane, razne studije sugerišu da je ekspresija MDR-a povezana s metastatskim karcinomom dojke i lošim ishodom, kraćim preživljavanjem i lokalnom invazijom (Lu et al., 2012; Surowiak et al., 2005). Naši rezultati su ukazali na statističku značajnost visoke ekspresije MDR1 proteina i pojavu metastaza kao i agresivnije ponašanje tumora. Drugim rečima visoka ekspresija MDR1 proteina statistički je češća kod uznapredovale metastatske bolesti. Takođe, naši podaci pokazuju značajno povećanu ekspresiju MDR 1 proteina kod bolesnica u grupi TNBC u u odnosu na grupu bolesnica sa ER+ tumorima. Vrlo važan nalaz je da MDR1 protein nije detektovan u zdravom tkivu dojke. Takođe, u grupi hormon pozitivnih pacijentkinja (ER+/PR+) kod 6% je nađena niska ekspresija MDR1 proteina dok je kod ostalih bolesnica ekspresija MDR1 proteina bila potpuno odsutna.

Na kraju, naši rezultati pokazuju da su TNBC pacijentkinje sa visokom ekspresijom MDR1 sklonije dobijanju udaljenih metastaza, što bi moglo da ukaže da kvantifikacija ekspresije MDR1 proteina, određivanje nivoa ekspresije, može pomoći u identifikaciji bolesnica sa većim rizikom od razvoja metastatske bolesti.

Ono što sigurno znamo nakon naše studije je, da su i aktivacija PAM signalnog puta i overekspresija MDR1 važni faktori za progresiju trostrukonegativnih karcinoma dojke i lošu prognozu.

Brojne studije pokazuju da PAM signalni put direktno utiče na povećanu ekspresiju MDR1 proteina povećavajući efluks hemioterapeutika iz tumorskih ćelija doprinoseći hemorezistenciji karcinoma dojke (Dong et al., 2021; Begicevic and Falasca, 2017). Zbog toga smo, na kraju, analizirali međuzavisnost ključnih molekula PAM signalnog puta i MDR1 proteina.

Rezultati istraživanja su pokazali da ekspresija PTEN, PI3K i mTOR proteina nije u korelaciji sa ekspresijom MDR1 proteina.

6. ZAKLJUČCI

- Imunohistochemijskom analizom ekspresije ključnih molekula PAM signalnog puta kod pacijentkinja sa TNBC definisali smo dva ključna fenotipa PTEN-/PI3K+/mTOR+ i PTEN+/PI3K-/mTOR-. Pacijentkinje sa smanjenom/odsutnom imunoekspresijom PTEN proteina i, istovremeno, povećanom ekspresijom PI3K i mTOR proteina (PTEN-/PI3K+/mTOR+ fenotip) imaju značajno kraće vreme preživljavanja i pokazuju statistički značajnu sklonost ka pojavi regionalnih i udaljenih metastaza.

- Pojedinačna analiza imunoekspresije proteina PAM signalnog puta pokazala je sledeće:

(i) detektovali smo smanjenu/odsutnu ekspresiju PTEN proteina kod 57% TNBC pacijentkinja, što je značajno više u odnosu na grupu ER+ bolesnica. Nismo ustanovili povezanost između nivoa ekspresije PTEN proteina i kliničko patoloških parametara (histološki tip, veličina tumora, histološki gradus tumora, regionalne i udaljene metastaze) kao ni vezu sa preživljavanjem bez znakova bolesti (DFI) i ukupnim preživljavanjem (OS). Uprkos tome bolesnice sa suprimiranom ekspresijom PTEN-a imale su kraća vremena preživljavanja;

(ii) utvrdili smo povećanu ekspresiju PI3K proteina (40%) u grupi bolesnica sa TNBC. Takođe, ustanovili smo da postoji statistički značajna korelacija između visoke ekspresije PI3K proteina i veličine tumora, kao i zahvaćenosti limfnih nodusa;

(iii) pokazali smo povećanu ekspresiju mTOR proteina (44%) u grupi TNBC pacijentkinja. Visok nivo ekspresije mTOR proteina je značajno korelisao sa uznapredovalim stadijumom bolesti.

- Analizirajući gubitak heterozigotnosti (LOH), kao potencijalno najvažniji mehanizam inaktivacije PTEN tumor supresor gena, potvrdili smo značajan broj bolesnica sa delecijama *PTEN* gena (44%) od kojih je 7% imalo homozigotne delecije - gubitak celog *PTEN* gena. Utvrdili smo da su homozigotne delecije u značajnoj korelaciji sa metastastkom bolešću.

- Veoma važan zaključak je da smo utvrdili statistički značajnu asocijaciju između pojave LOH-a i smanjene ili odsutne PTEN ekspresije (79 % bolesnica). Drugim rečima, potvrdili smo da je gubitak heterozigotnosti ključni mehanizam za inaktivaciju PTEN tumor supresora kod TNBC.

- Ekspresiju MDR1 proteina detektovali smo kod 73% bolesnica dok je visoka ekspresija detektovana kod 11%. Visoka ekspresija MDR1 proteina u grupi bolesnica TNBC korelirala sa pojavom metastaza i sa agresivnijim ponašanjem tumora. MDR1 protein nije bio eksprimiran u normalnom tkivu TNBC pacijentkinja koje smo amnalizirali a kod ER+ pacijentkinja je zabeležena samo sporadična i veoma niska ekspresija.

- Ekspresija MDR1 proteina nije u korelaciji sa ekspresijom PTEN, PI3K i mTOR proteina

Sumarno, naša analiza ukazuje da su gubitak *PTEN* tumor supresora i visoka ekspresija PI3K i mTOR proteina povezani sa lošim ishodom bolesti kod bolesnica sa trostruko negativnim karcinomom dojke (TNBC). Homozigotne delecije *PTEN*-a su potencijalni molekularni markeri metastatske bolesti i dobar indikator (pokazatelj) prognoze kod TNBC. Potencijalni marker diseminacije bolesti je visoka ekspresija MDR1 proteina.

7. LITERATURA

- Abd El-Aziz, Y.S., Spillane, A.J., Jansson, P.J., Sahni, S. (2021): Role of ABCB1 in mediating chemoresistance of triple-negative breast cancers *Biosci. Rep.*, 41(2):BSR20204092 [.https://doi.org/10.1042/BSR20204092](https://doi.org/10.1042/BSR20204092)
- Adebamowo, C.A., Famooto, A., Ogundiran, T.O., Aniagwu, T., Nkwodimmah, C., Akang, E.E. (2008): Immunohistochemical and molecular subtypes of breast cancer in Nigeria. *Breast Cancer Res. Treat.*, 110 (1):183–188.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F. (2003): Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100 (7): 3983–3988.
- André, F., O'Regan, R., Ozguroglu, M., Toi, M., Xu, B., Jerusalem, G., Masuda, N., Wilks, S., Arena, F., Isaacs, C., Yap, Y.S., Papai, Z., Lang, I., Armstrong, A., Lerzo, G., White, M., Shen, K., Litton, J., Chen, D., Zhang, Y., Ali, S., Taran, T., Gianni, L. (2014): Everolimus for women with trastuzumab-resistant, HER2-positive, advanced breast cancer (BOLERO-3): A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol.*, 15 (6): 580–591.
- Arora, S., Singh, S., Piazza, G.A., Contreras, C.M., Panyam, J., Singh, A.P. (2012): Honokiol: a novel natural agent for cancer prevention and therapy. *Curr. Mol. Med.*, 12 (10):1244–1252.
- Baker, S.J. (2007): PTEN enters the nuclear age. *Cell*, 128 (1): 25–28.
- Ball, S., Arolker, M., Purushotham, A.D. (2001): Breast cancer, Cowden disease and PTEN-MATCHS syndrome. *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO*, 27:604–606.
- Bandyopadhyay, S., Pai, S.K., Hirota, S., Hosobe, S., Tsukada, T., Miura, K., Takano, Y., Saito, K., Commes, T., Piquemal, D., Watabe, M., Gross, S., Wang, Y., Huggenvik, J., Watabe, K. (2004): PTEN Up-Regulates the Tumor Metastasis Suppressor Gene Drg-1 in Prostate and Breast Cancer. *Cancer Res.*, 64 (21):7655–7660.
- Banin Hirata, B.K., Oda, J.M.M., Losi Guembarovski, R., Ariza, C.B., Oliveira, C.E.C. de, Watanabe, M.A.E. (2014). Molecular Markers for Breast Cancer: Prediction on Tumor Behavior. *Dis. Markers* 2014, e513158. <https://doi.org/10.1155/2014/513158>
- Baselga, J., Campone, M., Piccart, M., Burris, H.A., Rugo, H.S., Sahmoud, T., Noguchi, S., Gnant, M., Pritchard, K.I., Lebrun, F., Beck, J.T., Ito, Y., Yardley, D., Deleu, I., Perez, A., Bachelot, T., Vittori, L., Xu, Z., Mukhopadhyay, P., Lebwohl, D., Hortobagyi, G.N. (2012): Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 366 (6): 520–529.

- Beg, S., Siraj, A.K., Prabhakaran, S., Jehan, Z., Ajarim, D., Al-Dayel, F., Tulbah, A., Al-Kuraya, K.S. (2015): Loss of PTEN expression is associated with aggressive behavior and poor prognosis in Middle Eastern triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat*, 151(3): 541–553.
- Begicevic, R.-R., Falasca, M. (2017): ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *Int. J. Mol. Sci*, 18 (11):2362.
- Bishop, J.A. (2013): Unmasking MASC: bringing to light the unique morphologic, immunohistochemical and genetic features of the newly recognized mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands. *Head Neck Pathol*, 7 (1): 35–39.
- Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Leal, J.F.M., Carnero, A. (2007): PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis*, 28(7): 1379–1386.
- Bononi, A., Pinton, P. (2015): Study of PTEN subcellular localization. *Methods*, 77–78: 92–103.
- Bosch, A., Eroles, P., Zaragoza, R., Viña, J.R., Lluch, A. (2010): Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat. Rev*, 36 (3): 206–215.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A. (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin*, 68 (6): 394–424.
- Brayboy, L.M., Oulhen, N., Long, S., Voigt, N., Raker, C., Wessel, G.M. (2017): Multidrug resistance transporter-1 and breast cancer resistance protein protect against ovarian toxicity, and are essential in ovarian physiology. *Reprod. Toxicol*, 69: 121–131.
- Campbell, L.L., Polyak, K. (2007): Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution. *Cell cycle*, 6 (19): 2332–2338.
- Cancer Genome Atlas Network, (2012): Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490 (7418): 61–70.
- Cargnello, M., Tcherkezian, J., Roux, P.P. (2015): The expanding role of mTOR in cancer cell growth and proliferation. *Mutagenesis*, 30 (2): 169–176.
- Chalhoub, N., Baker, S.J. (2009): PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. *Annu. Rev. Pathol*, 4: 127–150.
- Chan, J.J., Tan, T.J.Y., Dent, R.A. (2019): Novel therapeutic avenues in triple-negative breast cancer: PI3K/AKT inhibition, androgen receptor blockade, and beyond. *Ther. Adv. Med. Oncol*, 11,:1758835919880429. <https://doi.org/10.1177/1758835919880429>
- Chen, M., Nowak, D.G., Trotman, L.C. (2014): Molecular Pathways: PI3K Pathway Phosphatases as Biomarkers for Cancer Prognosis and Therapy. *Clin. Cancer Res*, 20 (12): 3057–3063.

- Choi, Y.H., Yu, A.-M. (2014): ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. *Curr. Pharm. Des*, 20 (5): 793–807.
- Choudhuri, S., Klaassen, C.D. (2006): Structure, Function, Expression, Genomic Organization, and Single Nucleotide Polymorphisms of Human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) Efflux Transporters. *Int. J. Toxicol*, 25 (4): 231–259.
- Ciuffreda, L., Falcone, I., Cesta Incani, U., Del Curatolo, A., Conciatori, F., Matteoni, S., Vari, S., Vaccaro, V., Cognetti, F., Milella, M. (2014). PTEN expression and function in adult cancer stem cells and prospects for therapeutic targeting. *Adv. Biol. Regul., Targeting Signaling Pathways in Stem Cells. Adv Biol Regular*, 56: 66–80.
- Cleator, S., Heller, W., Coombes, R.C. (2007): Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol*, 8 (3): 235–244.
- Costa, R.L.B., Han, H.S., Gradishar, W.J. (2018): Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review. *Breast Cancer Res. Treat*, 169 (3): 397–406.
- Cretella, D., Ravelli, A., Fumarola, C., La Monica, S., Digiacomo, G., Cavazzoni, A., Alfieri, R., Biondi, A., Generali, D., Bonelli, M., Petronini, P.G. (2018): The anti-tumor efficacy of CDK4/6 inhibition is enhanced by the combination with PI3K/AKT/mTOR inhibitors through impairment of glucose metabolism in TNBC cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res*, 37:72.
- Cristofano, A.D., Pandolfi, P.P. (2000): The Multiple Roles of PTEN in Tumor Suppression. *Cell*, 100 (4): 387–390.
- Dalerba, P., Cho, R.W., Clarke, M.F. (2007): Cancer Stem Cells: Models and Concepts. *Annu. Rev. Med*, 58: 267–284.
- Davis, N.M., Sokolosky, M., Stadelman, K., Abrams, S.L., Libra, M., Candido, S., Nicoletti, F., Polesel, J., Maestro, R., D'Assoro, A., Drobot, L., Rakus, D., Gizak, A., Laidler, P., Dulińska-Litewka, J., Basecke, J., Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Montalto, G., Cervello, M., Fitzgerald, T.L., Demidenko, Z.N., Martelli, A.M., Cocco, L., Steelman, L.S., McCubrey, J.A. (2014): Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. *Oncotarget*, 5 (13): 4603–4650.
- Davis, W.J., Lehmann, P.Z., Li, W. (2015): Nuclear PI3K signaling in cell growth and tumorigenesis. *Front. Cell Dev. Biol*, 3: 24.
- Dean, M., Fojo, T., Bates, S. (2005): Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer*, 5(4): 275–284.
- Denisov, E.V., Litviakov, N.V., Zavyalova, M.V., Perelmuter, V.M., Vtorushin, S.V., Tsyganov, M.M., Gerashchenko, T.S., Garbukov, E.Yu., Slonimskaya, E.M., Cherdyntseva, N.V. (2014): Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer: neoadjuvant chemotherapy efficiency and multidrug resistance gene expression. *Sci. Rep*, 4: 4709.

- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P., Narod, S.A. (2007): Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*, 13 (15): 4429–4434.
- Dexter, D.W., Reddy, R.K., Geles, K.G., Bansal, S., Myint, M.A., Rogakto, A., Leighton, J.C., Goldstein, L.J. (1998): Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction measured expression of MDR1 and MRP in primary breast carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*, 4 (6): 1533–1542.
- Dias, K., Dvorkin-Gheva, A., Hallett, R.M., Wu, Y., Hassell, J., Pond, G.R., Levine, M., Whelan, T., Bane, A.L. (2017): Claudin-Low Breast Cancer; Clinical & Pathological Characteristics. *PloS One*, 12: e0168669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168669>
- Dong, C., Wu, J., Chen, Y., Nie, J., Chen, C. (2021): Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway Causes Drug Resistance in Breast Cancer. *Front. Pharmacol*, 12:143. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.628690>
- Dowling, R.J.O., Topisirovic, I., Fonseca, B.D., Sonenberg, N. (2010): Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*, 1804: 433–439
- Engelman, J.A. (2009): Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer*, 9 (8): 550–562.
- Faneyte, I.F., Kristel, P.M., van de Vijver, M.J. (2001): Determining MDR1/P-glycoprotein expression in breast cancer. *Int. J. Cancer*, 93 (1): 114–122.
- Fang, W.-L., Huang, K.-H., Lan, Y.-T., Lin, C.-H., Chang, S.-C., Chen, M.-H., Chao, Y., Lin, W.-C., Lo, S.-S., Li, A.F.-Y., Wu, C.-W., Chiou, S.-H., Shyr, Y.-M. (2015): Mutations in PI3K/AKT pathway genes and amplifications of PIK3CA are associated with patterns of recurrence in gastric cancers. *Oncotarget*, 7: 6201–6220.
- Feilotter, H.E., Coulon, V., McVeigh, J.L., Boag, A.H., Dorion-Bonnet, F., Duboué, B., Latham, W.C., Eng, C., Mulligan, L.M., Longy, M. (1999): Analysis of the 10q23 chromosomal region and the PTEN gene in human sporadic breast carcinoma. *Br. J. Cancer*, 79 (5-6):718–723.
- FoundationOne CDx | Foundation Medicine [WWW Document], n.d. URL <https://www.foundationmedicine.com/test/foundationone-cdx> .
- Franke, T.F., Hornik, C.P., Segev, L., Shostak, G.A., Sugimoto, C. (2003): PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*, 22 (56): 8983–8998.
- Fry, M.J. (2001): Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? *Breast Cancer Res*, 3 (5): 304–312.

- Ghoncheh, M., Mohammadian-Hafshejani, A., Salehiniya, H. (2015): Incidence and Mortality of Breast Cancer and their Relationship to Development in Asia. *Asian Pac. J. Cancer Prev*, 16 (14): 6081–6087.
- Ghoncheh, M., Pournamdar, Z., Salehiniya, H. (2016): Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pac. J. Cancer Prev*, 17 (3): 43–46.
- Guerrero-Zotano, A., Mayer, I.A., Arteaga, C.L. (2016): PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment. *Cancer Metastasis Rev*, 35 (4):515–524.
- Guimarães, I.S., Tessarollo, N.G., Lyra-Júnior, P.C.M., Santos, D.Z. dos, Zampier, R.C., Oliveira, L.F.R.L. de, Siqueira, K.V., Silva, I.V., Rangel, L.B.A. (2015). Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Cancer Cells, *Updates on Cancer Treatment*. IntechOpen, <https://doi.org/10.5772/61676>
- Hare, S.H., Harvey, A.J. (2017): mTOR function and therapeutic targeting in breast cancer. *Am. J. Cancer Res*, 7 (3): 383–404.
- Hasanabady, M.H., Kalalinia, F. (2016): ABCG2 inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer. *J. Biosci*, 41 (2): 313–324.
- Hashimoto, K., Tsuda, H., Koizumi, F., Shimizu, C., Yonemori, K., Ando, M., Kodaira, M., Yunokawa, M., Fujiwara, Y., Tamura, K. (2014): Activated PI3K/AKT and MAPK pathways are potential good prognostic markers in node-positive, triple-negative breast cancer. *Ann. Oncol*, 25(10): 1973–1979.
- He, J., Fortunati, E., Liu, D.-X., Li, Y. (2021): Pleiotropic Roles of ABC Transporters in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci*, 22 (6): 3199.
- Huober, J., Gelber, S., Goldhirsch, A., Coates, A.S., Viale, G., Öhlschlegel, C., Price, K.N., Gelber, R.D., Regan, M.M., Thürlimann, B. (2012): Prognosis of medullary breast cancer: analysis of 13 International Breast Cancer Study Group (IBCSG) trials. *Ann. Oncol*, 23 (11): 2843–2851.
- Hutchinson, J., Jin, J., Cardiff, R.D., Woodgett, J.R., Muller, W.J. (2001): Activation of Akt (Protein Kinase B) in Mammary Epithelium Provides a Critical Cell Survival Signal Required for Tumor Progression. *Mol. Cell. Biol*, 21 (6): 2203–2212.
- Imran, A., Qamar, H.Y., Ali, Q., Naeem, H., Riaz, M., Amin, S., Kanwal, N., Ali, F., Sabar, M.F., Nasir, I.A. (2017): Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article. *Iran. J. Public Health*, 46 (11):1475–1485.
- Ito, K., Ogata, H., Honma, N., Shibuya, K., Mikami, T. (2019): Expression of mTOR Signaling Pathway Molecules in Triple-Negative Breast Cancer. *Pathobiology*, 86 (5-6): 315–321.

- Jaramillo, A.C., Saig, F.A., Cloos, J., Jansen, G., Peters, G.J. (2018): How to overcome ATP-binding cassette drug efflux transporter-mediated drug resistance? *Cancer Drug Resist*, 1: 6–29.
- Kawano, O., Sasaki, H., Okuda, K., Yukiue, H., Yokoyama, T., Yano, M., Fujii, Y. (2007): PIK3CA gene amplification in Japanese non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 58 (1): 159–160.
- Kechagioglou, P., Papi, R.M., Provatopoulou, X., Kalogera, E., Papadimitriou, E., Grigoropoulos, P., Nonni, A., Zografos, G., Kyriakidis, D.A., Gounaris, A. (2014): Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression. *Anticancer Res*, 34 (3):1387–1400.
- Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., Cheang, M.C.U., Voduc, D., Speers, C.H., Nielsen, T.O., Gelmon, K. (2010): Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J. Clin. Onc*, 28 (20): 3271–3277.
- Khan, F., Esnakula, A., Ricks-Santi, L.J., Zafar, R., Kanaan, Y., Naab, T. (2018): Loss of PTEN in high grade advanced stage triple negative breast ductal cancers in African American women. *Pathol. Res. Pract*, 214 (5): 673–678.
- Khan, K.H., Yap, T.A., Yan, L., Cunningham, D. (2013): Targeting the PI3K-AKT-mTOR signaling network in cancer. *Chin. J. Cancer* , 32 (5): 253–265.
- Khan, M.A., Jain, V.K., Rizwanullah, M., Ahmad, J., Jain, K. (2019): PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in triple-negative breast cancer: a review on drug discovery and future challenges. *Drug Discov. Today*, 24 (11): 2181–2191.
- Kovalev, A.A., Tsvetaeva, D.A., Grudinskaja, T.V. (2013): Role of ABC-cassette transporters (MDR1, MRP1, BCRP) in the development of primary and acquired multiple drug resistance in patients with early and metastatic breast cancer. *Exp. Oncol*, 35 (4): 287–290.
- Krstic, M., Stojnev, S. (2014): Cancer stem cells: Current concepts, therapeutic implications and challenges. *Mater. Medica* ,30: 1140–1146.
- Kumar, V., Abbas, AK., Aster, JC. (2014). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease - 9th Edition*, Elsevier.
- Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ (2012). *WHO Classification of Tumours of the Breast*, 4th Edition, WHO.
- Leake, R., Barnes, D., Pinder, S., Ellis, I., Anderson, L., Anderson, T., Adamson, R., Rhodes, T., Miller, K., Walker, R. (2000): Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. UK Receptor Group, UK NEQAS, The Scottish Breast Cancer Pathology Group, and The Receptor and Biomarker Study Group of the EORTC. *J. Clin. Pathol*, 53 (8): 634–635.

- Lebok, P., Kopperschmidt, V., Kluth, M., Hube-Magg, C., Özden, C., B, T., Hussein, K., Mittenzwei, A., Lebeau, A., Witzel, I., Wölber, L., Mahner, S., Jänicke, F., Geist, S., Paluchowski, P., Wilke, C., Heilenkötter, U., Simon, R., Sauter, G., Terracciano, L., Krech, R., von d Assen, A., Müller, V., Burandt, E. (2015): Partial PTEN deletion is linked to poor prognosis in breast cancer. *BMC Cancer*, 15: 963.
- Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y., Pietenpol, J.A. (2011): Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest*, 121 (7): 2750–2767.
- Lengyel, C.G., Altuna, S.C., Habeeb, B.S., Trapani, D., Khan, S.Z. (2020): The Potential of PI3K/AKT/mTOR Signaling as a Druggable Target for Endometrial and Ovarian Carcinomas. *Curr. Drug Targets*, 21(10): 946–961.
- Leonessa, F., Clarke, R. (2003): ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 10 (1): 43–73.
- Leslie, Nick R., Downes, C.P. (2004): PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem. J*, 382 (pt1): 1–11.
- Li, G., Guo, J., Shen, B.-Q., Yadav, D.B., Sliwkowski, M.X., Crocker, L.M., Lacap, J.A., Phillips, G.D.L. (2018): Mechanisms of Acquired Resistance to Trastuzumab Emtansine in Breast Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther*, 17 (7): 1441–1453.
- Li, G., Robinson, G.W., Lesche, R., Martinez-Diaz, H., Jiang, Z., Rozengurt, N., Wagner, K.-U., Wu, D.-C., Lane, T.F., Liu, X., Hennighausen, L., Wu, H. (2002): Conditional loss of PTEN leads to precocious development and neoplasia in the mammary gland. *Dev. Camb. Engl*, 129: 4159–4170.
- Li, W., Zhang, H., Assaraf, Y.G., Zhao, K., Xu, X., Xie, J., Yang, D.-H., Chen, Z.-S. (2016): Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother*, 27:14–29.
- Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.-F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., Wong, H., Rosen, J., Chang, J.C. (2008): Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst*, 100 (9): 672–679.
- Li, Z., Zou, W., Zhang, J., Zhang, Y., Xu, Q., Li, S., Chen, C. (2020): Mechanisms of CDK4/6 Inhibitor Resistance in Luminal Breast Cancer. *Front. Pharmacol*, 11:580251.
doi: 10.3389/fphar.2020.580251
- Lian, Z., Di Cristofano, A. (2005): Class reunion: PTEN joins the nuclear crew. *Oncogene*, 24: 7394–7400.

- Lim, W., Mayer, B., Pawson, T. (2015). *Cell signaling: principles and mechanisms*. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.
- Linton, K.J. (2007): Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology*, 22: 122–130.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., Zhao, J.J. (2009): Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov*, 8 (8): 627–644.
- Liu, R., Chen, Y., Liu, G., Li, C., Song, Y., Cao, Z., Li, W., Hu, J., Lu, C., Liu, Y. (2020): PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. *Cell Death Dis*, 11: 797.
- Liu, T., Wang, Yiwei, Wang, Yubing, Chan, A.M. (2019): Multifaceted Regulation of PTEN Subcellular Distributions and Biological Functions. *Cancers*, 11 (9):1247.
- Lobo, N.A., Shimono, Y., Qian, D., Clarke, M.F. (2007): The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 23: 675–699.
- Lu, L.S., Chen, L., Ding, W.X., Li, K., Wu, J.J. (2012): Elevated expression of both MDR1 and MMP-2 genes in metastasized lymph node of invasive ductal breast cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*, 16 (15): 2037–2043.
- Luo, S., Chen, J., Mo, X. (2016). The association of PTEN hypermethylation and breast cancer: a meta-analysis. *OncoTargets Ther*, 9: 5643–5650.
- Maehama, T., Dixon, J.E. (1998): The Tumor Suppressor, PTEN/MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *J. Biol. Chem*, 273: 13375–13378.
- Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., Band, V. (2010): Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther*, 10 (10): 955–960.
- Matić, S. (2010): Cancer stem cells: A myth or real target. *Serbian J. Exp. Clin. Res*. 11 (4): 163–170.
- Mehrotra, M., Anand, A., Singh, K.R., Kumar, S., Husain, N., Sonkar, A.A. (2018): P-Glycoprotein Expression in Indian Breast Cancer Patients with Reference to Molecular Subtypes and Response to Anthracycline-Based Chemotherapy—a Prospective Clinical Study from a Developing Country. *Indian J. Surg. Oncol*, 9 (4): 524–529.
- Minaguchi, T., Waite, K.A., Eng, C. (2006): Nuclear Localization of PTEN Is Regulated by Ca²⁺ through a Tyrosyl Phosphorylation–Independent Conformational Modification in Major Vault Protein. *Cancer Res*, 66 (24): 11677–11682.
- Miricescu, D., Totan, A., Stanescu-Spinu, I.-I., Badoiu, S.C., Stefani, C., Greabu, M. (2020): PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. *Int. J. Mol. Sci*, 22 (1): 173.

- Murugan, A.K. (2019): mTOR: Role in cancer, metastasis and drug resistance. PI3K/AKT signaling in human cancer & New insights in melanoma biology: running fast towards precision medicine. *Sem Cancer Biol*, 59: 92–111.
- Mylavarapu, S., Das, A., Roy, M. (2018): Role of BRCA Mutations in the Modulation of Response to Platinum Therapy. *Front. Oncol*, 8: 16.
- Niero, E.L., Rocha-Sales, B., Lauand, C., Cortez, B.A., de Souza, M.M., Rezende-Teixeira, P., Urabayashi, M.S., Martens, A.A., Neves, J.H., Machado-Santelli, G.M. (2014): The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. *J. Exp. Clin. Cancer Res*, 33 (1): 37.
- O’Flaherty, J.D., Barr, M., Fennell, D., Richard, D., Reynolds, J., O’Leary, J., O’Byrne, K. (2012): The Cancer Stem-Cell Hypothesis: Its Emerging Role in Lung Cancer Biology and Its Relevance for Future Therapy. *J. Thorac. Oncol*, 7 (12):1880–1890.
- Owonikoko, T.K., Khuri, F.R. (2013): Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway: Biomarkers of Success and Tribulation. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book ASCO Am. Soc. Clin. Oncol. Meet*, 10.1200/EdBook_AM.2013.33.e395.
https://doi.org/10.1200/EdBook_AM.2013.33.e395
- Pantziarka, P., Bryan, B.A., Crispino, S., Dickerson, E.B. (2018). Propranolol and breast cancer—a work in progress. *ecancermedicalsecience* 12, ed82.
<https://doi.org/10.3332/ecancer.2018.ed82>
- Pareja, F., Geyer, F.C., Marchiò, C., Burke, K.A., Weigelt, B., Reis-Filho, J.S. (2016). Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *NPJ Breast Cancer*, 2: 16036.
- Parsons, R. (2004). Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway. Signalling Downstream of Phosphoinositide 3-kinase and Ubiquitin -Like Proteins Meet the Family. *Semin. Cell Dev. Biol*, 15: 171–176.
- Pascual, J., Turner, N.C. (2019): Targeting the PI3-kinase pathway in triple-negative breast cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol*, 30 (7): 1051–1060.
- Pennington, K.P., Walsh, T., Harrell, M.I., Lee, M.K., Pennil, C.C., Rendi, M.H., Thornton, A., Norquist, B.M., Casadei, S., Nord, A.S., Agnew, K.J., Pritchard, C.C., Scroggins, S., Garcia, R.L., King, M.-C., Swisher, E.M. (2014): Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin. Cancer Res*, 20 (3): 764–775.
- Petrocelli, T., Slingerland, J.M. (2001): PTEN deficiency: a role in mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Res*, 3 (6):356–360.

- Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., Perou, C.M. (2010): Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 12 (5): R68.
- Prat, A., Perou, C.M. (2011): Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol*, 5 (1): 5–23.
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., Muñoz, M. (2015): Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast*, 24 (2): S26–S35.
- Rascio, F., Spadaccino, F., Rocchetti, M.T., Castellano, G., Stallone, G., Netti, G.S., Ranieri, E. (2021): The Pathogenic Role of PI3K/AKT Pathway in Cancer Onset and Drug Resistance: An Updated Review. *Cancers*, 13 (16): 3949.
- Robey, R.W., Pluchino, K.M., Hall, M.D., Fojo, A.T., Bates, S.E., Gottesman, M.M. (2018): Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 18 (7): 452–464.
- Romano, M., De Francesco, F., Pirozzi, G., Gringeri, E., Boetto, R., Di Domenico, M., Zavan, B., Ferraro, G.A., Cillo, U. (2015): Expression of cancer stem cell biomarkers as a tool for a correct therapeutic approach to hepatocellular carcinoma. *Oncoscience*, 2 (5): 443–456.
- Sakai, A., Thieblemont, C., Wellmann, A., Jaffe, E.S., Raffeld, M. (1998): PTEN Gene Alterations in Lymphoid Neoplasms. *Blood*, 92 (9): 3410–3415.
- Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G., Váradi, A. (2006): Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol. Rev*, 86 (4): 1179–1236.
- Schettini, F., Buono, G., Trivedi, M.V., Placido, S.D., Arpino, G., Giuliano, M. (2017): PI3K/mTOR Inhibitors in the Treatment of Luminal Breast Cancer. Why, When and to Whom. *Breast Care*, 12:290–294.
- Schneider, E., Hunke, S. (1998): ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* 22 (1): 1–20.
- Shah, M., Allegrucci, C. (2012): Keeping an open mind: highlights and controversies of the breast cancer stem cell theory. *Breast Cancer Targets Ther*, 4:155–166.
- Shah, R., Rosso, K., Nathanson, S.D. (2014): Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J. Clin. Oncol*, 5 (3): 283–298.
- Shah, S.P., Roth, A., Goya, R., Oloumi, A., Ha, G., Zhao, Y., Turashvili, G., Ding, J., Tse, K., Haffari, G., Bashashati, A., Prentice, L.M., Khattra, J., Burleigh, A., Yap, D., Bernard, V., McPherson, A., Shumansky, K., Crisan, A., Giuliany, R., Heravi-Moussavi, A., Rosner, J.,

- Lai, D., Birol, I., Varhol, R., Tam, A., Dhalla, N., Zeng, T., Ma, K., Chan, S.K., Griffith, M., Moradian, A., Cheng, S.-W.G., Morin, G.B., Watson, P., Gelmon, K., Chia, S., Chin, S.-F., Curtis, C., Rueda, O.M., Pharoah, P.D., Damaraju, S., Mackey, J., Hoon, K., Harkins, T., Tadigotla, V., Sigaroudinia, M., Gascard, P., Tlsty, T., Costello, J.F., Meyer, I.M., Eaves, C.J., Wasserman, W.W., Jones, S., Huntsman, D., Hirst, M., Caldas, C., Marra, M.A., Aparicio, S. (2012): The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*, 486 (4073): 395–399.
- Sharom, F.J. (2008): ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*, 9 (1):105–127.
- Shi, Y., Paluch, B.E., Wang, X., Jiang, X. (2012): PTEN at a glance. *J. Cell Sci*, 125 (20): 4687–4692.
- Shi, W, Zhang X, Pitilie M et al. Dysregulated PTEN-PKB and negative receptor status in human breast cancer. (2003):*Int J Cancer*,104(2):195-203.
- Simpson, L., Parsons, R. (2001): PTEN: Life as a Tumor Suppressor. *Exp. Cell Res*, 264 (1): 29–41.
- Sissung, T.M., Baum, C.E., Kirkland, C.T., Gao, R., Gardner, E.R., Figg, W.D. (2010): Pharmacogenetics of membrane transporters: an update on current approaches. *Mol. Biotechnol*, 44 (2): 152–167.
- Song, M.S., Salmena, L., Pandolfi, P.P., 2012: The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 13 (5): 283–296.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C.M., Lønning, P.E., Brown, P.O., Børresen-Dale, A.-L., Botstein, D. (2003): Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 100 (14): 8418–8423.
- Sporikova, Z., Koudelakova, V., Trojanec, R., Hajduch, M. (2018): Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer*, 18 (5): e841–e850.
- Steinbach, D., Legrand, O. (2007):ABC transporters and drug resistance in leukemia: was P-gp nothing but the first head of the Hydra? *Leukemia*, 21 (6): 1172–1176.
- Stemke-Hale, K., Gonzalez-Angulo, A.M., Lluch, A., Neve, R.M., Kuo, W.-L., Davies, M., Carey, M., Hu, Z., Guan, Y., Sahin, A., Symmans, W.F., Pusztai, L., Nolden, L.K., Horlings, H., Berns, K., Hung, M.-C., van de Vijver, M.J., Valero, V., Gray, J.W., Bernard, R., Mills, G.B., Hennessy, B.T. (2008): An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res*, 68 (15): 6084–6091.

- Stingl, J., Caldas, C. (2007): Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat. Rev. Cancer*, 7 (10):791–799.
- Sulis, M.L., Parsons, R. (2003):PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol*, 13 (9): 478–483.
- Surowiak, P., Materna, V., Matkowski, R., Szczuraszek, K., Kornafel, J., Wojnar, A., Pudelko, M., Dietel, M., Denkert, C., Zabel, M., Lage, H. (2005): Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast Cancer Res*, 7 (5): R862-870.
- Tian, T., Li, X., Zhang, J. (2019): mTOR Signaling in Cancer and mTOR Inhibitors in Solid Tumor Targeting Therapy. *Int. J. Mol. Sci*, 20 (3): 755.
- Torres, J., Pulido, R. (2001): The Tumor Suppressor PTEN Is Phosphorylated by the Protein Kinase CK2 at Its C Terminus. *J. Biol. Chem*, 276 (2): 993–998.
- Tsuruo, T., Naito, M., Tomida, A., Fujita, N., Mashima, T., Sakamoto, H., Haga, N. (2003): Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci*, 94 (1): 15–21.
- Turashvili, G., Brogi, E. (2017): Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Front. Med*, 4: 227.
- Turner, N.C., Reis-Filho, J.S. (2013): Tackling the Diversity of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin. Cancer Res*, 19 (23): 6380–6388.
- Ullah, M.F. (2008): Cancer multidrug resistance (MDR): a major impediment to effective chemotherapy. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP*, 9 (1):1–6.
- Van Niekerk, G., Davids, L.M., Hattingh, S.M., Engelbrecht, A.-M., 2017: Cancer stem cells: A product of clonal evolution? *Int. J. Cancer*, 140 (5) 993–999.
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., Nebert, D.W. (2009): Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum. Genomics*, 3 (3): 281–290.
- Vazquez, F., Ramaswamy, S., Nakamura, N., Sellers, W.R. (2000): Phosphorylation of the PTEN Tail Regulates Protein Stability and Function. *Mol. Cell. Biol*, 20 (14): 5010–5018.
- Verret, B., Cortes, J., Bachelot, T., Andre, F., Arnedos, M. (2019): Efficacy of PI3K inhibitors in advanced breast cancer. *Ann. Oncol*, 30, x12–x20.
- Visvader, J.E., Lindeman, G.J. (2012): Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*, 10 (6): 717–728.
- Wahba, H.A., El-Hadaad, H.A. (2015): Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol. Med*, 12 (2):106–116.
- Walker, S.M., Leslie, N.R., Perera, N.M., Batty, I.H., Downes, C.P. (2004): The tumour-suppressor function of PTEN requires an N-terminal lipid-binding motif. *Biochem. J*, 379 (Pt2): 301–307.

- Walsh, S., Flanagan, L., Quinn, C., Evoy, D., McDermott, E.W., Pierce, A., Duffy, M.J. (2012): mTOR in breast cancer: differential expression in triple-negative and non-triple-negative tumors. *Breast Edinb. Scotl*, 21 (2): 178–182.
- Wang, X., Trotman, L.C., Koppie, T., Alimonti, A., Chen, Z., Gao, Z., Wang, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P., Jiang, X. (2007): NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell*, 128 (1): 129–139.
- Weigelt, B., Kreike, B., Reis-Filho, J.S. (2009): Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. *Breast Cancer Res. Treat*, 117 (2): 273–280.
- Weigelt, B., Ng, C.K., Shen, R., Popova, T., Schizas, M., Natrajan, R., Mariani, O., Stern, M.-H., Norton, L., Vincent-Salomon, A., Reis-Filho, J.S. (2015): Metastatic breast carcinomas display genomic and transcriptomic heterogeneity. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc*, 28 (3): 340–351.
- Whiteman, D.C., Zhou, X.-P., Cummings, M.C., Pavey, S., Hayward, N.K., Eng, C. (2002): Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer*, 99 (1): 63–67.
- Wolff, A.C., Hammond, M.E.H., Schwartz, J.N., Hagerty, K.L., Allred, D.C., Cote, R.J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P.L., Hanna, W.M., Langer, A., McShane, L.M., Paik, S., Pegram, M.D., Perez, E.A., Press, M.F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S.E., Tubbs, R., Vance, G.H., van de Vijver, M., Wheeler, T.M., Hayes, D.F., American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists. (2007): American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol*, 25:118–145.
- Wu, C.-P., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V. (2008): Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. *Curr. Mol. Pharmacol*, 1(2): 93–105.
- Wu, C.-P., Murakami, M., Hsiao, S.-H., Liu, T.-C., Yeh, N., Li, Y.-Q., Hung, T.-H., Wu, Y.-S., Ambudkar, S.V. (2018): SIS3, a specific inhibitor of Smad3 reverses ABCB1- and ABCG2-mediated multidrug resistance in cancer cell lines. *Cancer Lett*, 433: 259–272.
- Wu, G., Xing, M., Mambo, E., Huang, X., Liu, J., Guo, Z., Chatterjee, A., Goldenberg, D., Gollin, S.M., Sukumar, S., Trink, B., Sidransky, D. (2005): Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res*, 7 (5): R609–R616.
- Wymann, M.P., Pirola, L. (1998): Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, 1436: 127–150.
- Xia, H., Hui, K.M. (2014): Mechanism of cancer drug resistance and the involvement of noncoding RNAs. *Curr. Med. Chem*, 21 (26): 3029–3041.

- Yehia, L., Eng, C. (1993): PTEN Hamartoma Tumor Syndrome, in: Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Mirzaa, G., Amemiya, A. (Eds.), GeneReviews®. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Yehia, L., Keel, E., Eng, C. (2020): The Clinical Spectrum of PTEN Mutations. *Annu. Rev. Med.*, 71: 103–116.
- Yu, K.-D., Zhu, R., Zhan, M., Rodriguez, A.A., Yang, W., Wong, S., Makris, A., Lehmann, B.D., Chen, X., Mayer, I., Pietenpol, J.A., Shao, Z.-M., Symmans, W.F., Chang, J.C. (2013): Identification of prognosis-relevant subgroups in patients with chemoresistant triple-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*, 19 (10): 2723–2733.
- Zhang, Z., Richmond, A.(2021). The Role of PI3K Inhibition in the Treatment of Breast Cancer, Alone or Combined With Immune Checkpoint Inhibitors. *Front. Mol. Biosci.* 8:648663 <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.648663>

BIOGRAFIJA AUTORA

Mirjana Z. Prvanović (rođeno Škodrić) rođena je 03.maja 1980. godine. Nakon završene Gimnazije Sveti Sava u Beogradu, upisala je Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu 1999. Zvanje doktora medicine stekla je 2005.godine u maju, kada je diplomirala na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 9,03. Kliničko iskustvo stekla je volontirajući na KBC Bežanijska Kosa od 2005 do 2008 na odeljenju hematologije. Novembra 2008. zaposlena je kao klinički lekar, a od 2015. godine kao specijalista patologije pri odeljenju za patohistološku dijagnostiku Insituta za onkologiju i radiologiju Srbije. Od decembra 2016. godine zaposlena je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Insitutu za patologiju kao saradnik u nastavi a potom u zvanju asistenta, gde obavlja nastavnu, naučnu i zdravstvenu delatnost. U novembru 2019.godine upisala je užu specijalizaciju iz medicinske citologije. Doktorske studije upisala je 2011.godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na modulu biologija eukariota. U toku svog stručnog rada učestvovala je u dva istraživačka projekta i učestvovala u više nacionalnih i internacionalnih kongresa, takođe pohađala je više kurseva iz različitih oblasti patologije i edukacije. Objavila je jedan rad kao prvi autor u vrhunskom međunarodnom časopisu sa JCR liste M21 kategorije. Takođe, bila je autor u još pet radova sa JCR liste. Kumulativni IF radova koje je kandidatknja objavila je 15,141.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Мирјана З. Првановић

број индекса М3001/2019

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога PTEN/PI3K/MTOR сигналног пута и ABC транспортера код троструко негативних карцинома дојке и њихова повезаност са хистопатолошким и клиничким параметрима.

- 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.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мирјана З. Првановић

Број индекса М3011/2019

Студијски програм Молекуларна биологија еукариота

Наслов рада Улога PTEN/PI3K/MTOR сигналног пута и ABC транспортера код троструко негативних карцинома дојке и њихова повезаност са хистопатолошким и клиничким параметрима.

Ментор Др Никола Танић, научни саветник

Потписани/а Мирјана З. Првановић

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.

Потписдокторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Улога PTEN/PI3K/MTOR сигналног пута и ABC транспортера код троструко негативних карцинома дојке и њихова повезаност са хистопатолошким и клиничким параметрима.

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

2. 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).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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.