



Univerza v Mariboru

Medicinska fakulteta

**RAZVOJ IN TESTIRANJE CELIČNIH LINIJ Z NAMENOM PROUČEVANJA
TROJNO NEGATIVNEGA RAKA DOJKE**

Kristijan Skok

Maribor, 2018



Univerza v Mariboru

Medicinska fakulteta

**RAZVOJ IN TESTIRANJE CELIČNIH LINIJ Z NAMENOM PROUČEVANJA TROJNO NEGATIVNEGA
RAKA DOJKE**

Kristijan Skok

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o častnih nazivih, nagradah, priznanjih in pohvalah
Medicinske fakultete Univerze v Mariboru pod mentorstvom prof. dr. Iztoka Takača, dr. med.,
svetnik ter somentorstvom doc. dr. Uroša Mavra, mag. farm.

Maribor, 2018

IZVLEČEK

NAMEN

Rak dojk je drugi najpogostejši rak na svetu in daleč najpogostejši pri ženskah, tako v razvitem svetu kot tudi v državah v razvoju. Eden izmed njegovih podtipov je trojno negativni rak dojk za katerega je značilna izjemna heterogenost in odsotnost hormonskih receptorjev za estrogene, progesteron ter odsotnost izraženosti receptorjev za človeški epidermalni rastni faktor-2. Prognoza in stopnja preživetja je pri tem podtipu raka dojk najslabša. Pomembno vlogo pri raziskovanju značilnosti tumorja igrajo celične linije. V svoji nalogi smo z namenom proučevanja trojno negativnega raka dojke želeli pripraviti prvo celično linijo trojno negativnega raka dojk na Medicinski fakulteti v Mariboru in v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor.

HIPOTEZA

Želeli smo izdelati učinkovit protokol izolacije celic iz tkiva trojno negativnega raka dojk, zastaviti načrt nadaljnje obdelave linije v fazah karakterizacije in funkcionalnih testov, celice uspešno izolirati, ustvariti čisto kulturo, ki je primerna za zamrznitev, pripraviti celično linijo za histopatološke in molekularno-genetske teste karakterizacije ter primerjavo s standardno celično linijo raka dojk.

METODE

Metode prvega dela raziskave so obsegale analizo literature in pripravo preglednega prispevka o celičnih linijah raka dojk. Istočasno se je v skladu z načeli in pravili raziskovalnega oddala prijava za etično komisijo in poiskalo primerne bolnice. Po izdelavi kvalitetnega protokola in odobritvi s strani etične komisije, je bilo operativno odstranjeno tkivo s strani patologa pregledano. Del tega tkiva se je v najkrajšem možnem času preneslo na ledu v laboratorij, kjer se je nemudoma pričelo z izolacijo celic. Kulturo celic se je nato gojilo po standardnih protokolih gojenja, dokler niso bile dovolj čiste za teste karakterizacije.

REZULTATI

V sklopu raziskave smo poleg zasnove primernega, učinkovitega, enostavnega in ponovljivega protokola za izolacijo celic trojno negativnega raka dojk iz tkivnega vzorca ter gojenje obstojne celične linije tudi uspešno, kot prvi v naši regiji, izolirali in vzgojili celično linijo raka dojk. Ob oddaji naloge smo začeli s postopki karakterizacije in sodeč po preliminarnih rezultatih, se nakazuje veliko verjetnost skladnosti s trojno negativnim rakom dojk. Prav tako smo za nadaljnje

raziskave že pripravili in zasnovali nabor testov za karakterizacijo kot tudi teste viabilnosti z uporabo citotoksičnih zdravilnih učinkovin ob sočasni komparativni analizi z drugimi celičnimi linijami raka dojk.

ZAKLJUČKI

Uspešno smo izdelali kvaliteten protokol izolacije celic iz raka dojk in pripravil prvo celično linijo raka dojk na naši fakulteti in širši okolici. Linija je primerne kvalitete za komparativno analizo s standardno linijo raka dojk. V nadaljnjih raziskavah se bo delo nadgradilo s testi karakterizacije in viabilnosti.

Ključne besede

Rak dojk, trojno negativni rak dojk, MCF-7, celične linije, *in vitro* celični testi, hormonski receptorji.

ABSTRACT

PURPOSE

Breast cancer is the second most common cancer worldwide and ranked first in incidence in women living either in developed or developing countries. One of its types is the triple negative subtype, which is known for its heterogeneity and loss of receptors for oestrogen, progesterone as well as lack of expression for human epidermal growth factor - 2. The prognosis and survival rates are for this subtype in comparison the worst. Breast cancer cell lines play a significant role in breast cancer research and analysis of different subtypes. The aim of this research was to develop and optimize the first triple negative breast cancer cell line in the Medical faculty of Maribor and University clinical centre Maribor, which would be used for the study of triple negative breast cancer.

HYPOTHESIS

We wanted to make an effective standardized isolation protocol from breast cancer tissue, develop a plan for the further qualitative tests in form of characterization and functionality, successfully isolate cancer cells from tissue, raise a pure cell culture that is of sufficient quality for freezing and prepare said culture for a comparative cytopathological and molecular characterization alongside a standardized breast cell culture.

METHODS

The methods of the research encompassed at first analysis and preparation of a review article on breast cancer cell lines. At the same time, in accordance to the rules of research work we filed an appeal to the clinical medical ethics committee and determined suitable patients. After finalising a protocol, gaining the approval from the committee and patient the removed tissue underwent histopathological analysis and was then as soon as possible delivered to the laboratory where the isolation procedure began. The cell culture was raised in accordance with standard cell culturing procedures until it achieved sufficient purity for characterization.

RESULTS

In our study we developed a suitable, efficient, simple and repeatable protocol for breast cancer cell isolation from triple negative breast cancer tissue and a protocol for culturing said breast cancer cell line. We are also the first ones in our region who successfully raised a breast cancer cell line. At the moment of submitting the research project we began the characterization phase

and judging by the preliminary results, there is a high probability of matching properties from the primary tissue and our cell line. Finally, we already prepared the next phases of our research in form of additional characterization as well as viability tests that utilize cytotoxic drugs. Tests will be carried out in a comparative fashion with other breast cancer cell lines.

CONCLUSION

We successfully developed a quality protocol for breast cancer cell isolation and prepared, to the best of our knowledge, the first breast cancer cell line in our medical faculty and region. The cell line is of sufficient quality for comparative analysis with a standardized breast cancer cell line and can in subsequent studies be upgraded with tests of characterization and viability.

Keywords

Breast cancer, triple negative breast cancer, MCF-7, cell lines, *in vitro* cell testing, hormonal receptors.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
2	BOLEZENSKE SPREMEMBE DOJK.....	2
2.1	Benigne spremembe dojk	2
2.2	Maligne spremembe	4
2.2.1	Histopatološko razvrščanje	4
2.2.2	Intrinzično in molekularno razvrščanje	4
2.3	Dejavniki tveganja za rak dojk.....	6
2.4	Diagnostika.....	7
2.5	Zdravljenje boleznj dojk	8
2.5.1	Kirurško zdravljenje	8
2.5.2	Pregled in odstranjevanje bezgavk.....	9
2.5.3	Sistemsko zdravljenje	10
3	CELIČNE LINIJE	13
3.1	Nomenklatura celičnih linij in njihovo poimenovanje.....	13
3.1.1	Molekularna klasifikacija celičnih linij raka dojk	14
3.2	Gojenje celičnih linij raka dojk	21
3.2.1	Mutacije	21
3.2.2	Celično okolje	21
3.3	Omejitve in dileme uporabe in vitro CL	22
3.4	In vivo modeli CL	24
3.5	Raziskovalno delo	28
4	NAMEN DELA IN HIPOTEZE	29
4.1	Namen	29
4.2	Hipoteze	29
5	MATERIALI IN METODE	31
5.1	Materiali	31
5.1.1	Postopek izolacije	31
5.1.2	Postopek gojenja	31
5.2	Metode	31
5.2.1	Odvzem tkiva in histopatološka analiza	31
5.2.2	Postopek izolacije	32
5.2.3	Postopek gojenja	33

6	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	36
6.1	Odvzem tkiva in histopatološka analiza	36
6.2	Postopek izolacije.....	37
6.3	Postopek gojenja.....	38
7	ZAKLJUČKI.....	40
7.1	Pogled naprej	40
8	LITERATURA.....	41
8.1	Odposlani prispevki	45
8.2	Prispevki v pripravi	45
9	ZAHVALA.....	46
10	ENOTE IN OKRAJŠAVE.....	47
11	PRILOGE.....	48
	A) Odobritev etične komisije.....	48

KAZALO SLIK

Slika 1: Primerjava med trenutnimi načini kategorizacije RD in njegovimi CL.	15
Slika 2: Prikaz razvoja mišjih CL.	27
Slika 3: Flow diagram delovnega procesa.	30
Slika 4: Shematski prikaz izolacije celic.	33
Slika 5: Postopek gojenja celične linije po dnevih z enotno povečavo: 50x.	35
Slika 6: Prikaz rezultatov histopatološke analize opravljene z on-slide in notranjimi pozitivnimi kontrolami, kjer so bili PR, ER, AR, HER2 statusi negativni.	37

KAZALO TABEL

Tabela 1: Prikaz delitve RD na podskupine.	5
Tabela 2: Prikaz kontraindikacij za ohranitveno kirurgijo.	8
Tabela 3: Molekularne in morfološke značilnosti CL RD.	15
Tabela 4: Seznam celičnih linij raka dojk.	19
Tabela 5: Osem celičnih linij, ki so različno opredeljene glede receptorskega statusa.	23
Tabela 6: Primerjava med 2D in 3D celičnimi kulturami.	24
Tabela 7: Primerjava med posameznimi in vivo modeli.	26

1 UVOD

Maligne bolezni še vedno sodijo med najtežje ozdravljiva stanja v sodobni medicini ter so izziv in motivacija številnim raziskovalcem po svetu. Na področju zdravljenja teh bolezni se pojavljajo vedno novi pristopi. Rak dojk (RD) je drugi najpogostejši rak na svetu in daleč najpogostejši pri ženskah, tako v razvitem svetu (incidenca 794.000 na leto) kot tudi v državah v razvoju, kjer je njegova incidenca še nekoliko višja (883.000 na leto). Na svetovnem nivoju se RD uvršča na peto mesto po vzroku smrti zaradi raka (522.000 smrti) (1). V Sloveniji beležimo letno približno 1310 novih primerov RD in 380 smrtnih izidov letno (2). Od leta 1968 je najpogostejši rak pri ženskah (20-25 % vseh primerov rakavih bolezni) (2).

Ločimo več podtipov RD, ki jih lahko delimo na podlagi histopatološke ter molekularne delitve oz. intrinzičnih lastnosti. Eden izmed teh podtipov je trojno negativni RD (TNRD) za katerega je značilna odsotnost hormonskih receptorjev za estrogene (ER), progesteron (PR) in izraženosti receptorjev za človeški epidermalni rastni faktor-2 (HER2). Prognoza in stopnja preživetja sta v zahodnem svetu relativno dobri, vendar je pri podtipu TNRD prognoza najslabša, saj ta hitro napreduje, zaseva in je bolj agresiven (3,4). Prav zaradi tega imajo raziskave, ki želijo to vrsto raka podrobneje opredeliti, velik pomen. V sklopu teh raziskav je vedno več novih metod, ki se poslužujejo molekularnih ter drugih interdisciplinarnih pristopov. Eden izmed prospektivnih pristopov raziskovanja RD so *in vitro* ter *in vivo* modeli (5–7). V prvem delu naloge se osredotočamo na pregled tematike RD ter *in vitro* metod gojenja celičnih linij (CL) RD z namenom razumevanja razvoja CL RD za izboljšanje znanja in posledično zdravljenja na področju RD.

2 BOLEZENSKE SPREMEMBE DOJK

2.1 Benigne spremembe dojk

Bolezenske spremembe dojk lahko delimo na benigne in maligne. Benigne spremembe v dojkah predstavljajo zelo heterogeno skupino različnih motenj in bolezni. Histološko jih razvrščamo v tri skupine; neproliferativne, proliferativne spremembe brez atipije in proliferativne spremembe z atipijo (8–10).

Neproliferativne spremembe niso povezane z večjim tveganjem za nastanek raka dojk. Najpogostejše spremembe iz te skupine so ciste. To so okrogle ali ovalne strukture z epiteliziranim ovojem in napolnjene s tekočino. Najdemo jih pri tretjini žensk med 35. in 50. letom. Večina cist je majhnih in le 20-25 % je klinično tipnih. Od drugih rašč jih lahko ločimo s pomočjo ultrazvočnega pregleda (UZ). Diagnostika in zdravljenje sta potrebna samo pri kompleksnih cistah, ki imajo pregrade, zadebeljeno steno ipd. Med neproliferativne spremembe sodijo še papilarne apokrine spremembe, nekatere kalcifikacije in navadna hiperplazija (9,10).

Proliferativne spremembe brez atipije so povezane z nekoliko večjim tveganjem za razvoj malignega obolenja. V to skupino uvrščamo duktalno hiperplazijo, intraduktalne papilome, sklerozantno adenozo in fibroadenome. Tveganje za nastanek raka dojk pri ženskah s temi diagnozami je 1,5 do 2-krat večje kot pri preostali populaciji (10). Fibroadenom je dobro omejen, ovalen ali okrogel, trd pomičen, neboleč tumor. V 15-20 % se pojavi več tumorjev hkrati v eni dojki ali obeh. Najpogosteje se pojavijo v starosti 15-35 let. Na mamografskih slikah se fibroadenom kaže kot dobro omejen tumor, ima značilno UZ sliko in diagnoza se potrdi s tanko ali debeloigelnno biopsijo (TIB, DIB). Zdravljenje manjših fibroadenomov, ki ne povzročajo kliničnih težav, ni potrebno. Treba je spremljati velikost oz. rast tumorja. Kadar je tumor velik, raste ali povzroča klinične težave, ga odstranimo. Tumorje manjše kot 2 cm lahko odstranimo z vakuumsko aspiracijo, druge pa s kirurškim posegom (10).

Intraduktalni papilom zraste iz epitela mlečnega voda, najpogosteje v končnem delu izvodila v predelu kolobarja. Je majhen tumor, velik do nekaj milimetrov. Papilomi so lahko tudi multipli. Najpogosteje se pojavijo pri ženskah med 30. in 50. letom starosti. Kadar se nahaja v terminalnem delu izvodila, povzroča izcedek iz izvodila v katerem raste. Diagnozo postavimo na podlagi citološkega pregleda izcedka in s kontrastnim slikanjem izvodila (galaktografija ali duktografija). Papilom ali papilome, ki sicer ne povzročajo težav, lahko diagnosticiramo tudi po

naključju s slikovnimi preiskavami. Papilome praviloma zdravimo kirurško (odstranitev tumorja). V literaturi je navedeno, da je končni histološki izvid odstranjenih papilomov, ki so bili pred operacijo z DIB opredeljeni kot benigni, pokazal maligne spremembe v 15,7 % (9,10).

Zadnja skupina so **proliferativne spremembe z atipijo**. Le-te so povezane s pomembnim tveganjem za nastanek raka dojk, zato je bolnice s takšnimi spremembami potrebno skrbno spremljati. V to skupino sodita atipična duktalna in atipična lobularna hiperplazija. Diagnozo postavimo z DIB. Pri ženskah z atipično hiperplazijo je tveganje za nastanek RD povečano. V literaturi je govora o 3,7-5,3 relativnem tveganju. Ženske s temi diagnozami se zdravi operativno s kirurško ekscizijo lezije. Priporoča se letne mamografije in odsvetuje hormonsko nadomestno zdravljenje (HNZ) (11).

Druge benigne spremembe so:

- Lipom - večinoma leži v podkožju, zgrajen je iz zrelega maščevja, ki je inkapsulirano. Klinično je mehak in dobro omejen tumor. Diagnozo postavimo s pomočjo DIB. Zdravljenje je potrebno samo, če povzroča klinične težave ali hitro raste. Odstrani se s kirurško biopsijo.
- Maščobna nekroza – je benigno stanje, ki nastane po poškodbi ali kirurškem posegu. Na mamografskih slikah je lahko podobna malignim tumorjem. Diagnozo postavimo z DIB. Zdravljenje ob postavljeni diagnozi ni potrebno.
- Galaktokela – ali mlečna retencijska cista, ki nastane zaradi zaprtja mlečnega izvodila. Tipa se kot mehka okrogla zatrdlina v dojki. Diagnozo postavimo z UZ in citološko punkcijo. Zdravljenje ni potrebno.
- Adenom – Čisti epitelni tumor dojk, brez malignega potenciala. Odstranitev je potrebna samo, kadar je zelo velik.
- Hamartom – tumor sestavljen iz žleznega, maščobnega in vezivnega tkiva. Tipen je kot dobro omejena, neboleča struktura. Postavitev diagnoze s citološko punkcijo ali z DIB je zahtevna, kajti nima specifične diagnostične slike. Priporoča se kirurška odstranitev.
- Vnetje - vnetje dojk ali mastitis nastane najpogosteje, vendar ne izključno pri doječih ženskah. Povzročitelji so bakterije s kože. Klinični znaki so pordela koža, boleča zatrdlina, povišana telesna temperatura in splošno slabo počutje. Diagnozo postavimo na podlagi kliničnega pregleda. Zdravi se z antibiotiki. Kadar vnetje ni zdravljeno ali pride do zapore mlečnega izvodila, nastane absces. Zdravljenje abscesa je kirurško z incizijo in drenažo. Pri vnetju dojk, ki se ne odzove na antibiotično terapijo je potrebno pomisliti na vnetni rak dojk t.i. vnetni karcinom (9).

2.2 Maligne spremembe

RD lahko delimo na različne načine. V okviru standardne obravnave bolnic z RD se poleg histološke vrste tumorja določa še velikost tumorja, gradus (Elston in Ellis), prisotnost ali odsotnost limfovaskularne infiltracije, prisotnost intraepitelne komponente, mikroskopski status robov, imunohistokemična izraženost hormonskih receptorjev (ER, PR) in izraženost receptorjev za HER2. Kot napovedni dejavnik se določa še proliferacijski indeks Ki67. Določajo se lahko še proteaze in drugi dejavniki, ki so lahko v pomoč tudi pri odločanju o dodatnem, dopolnilnem zdravljenju. Le-ti so tudi pomembni pri upoštevanju gojenja CL, kajti za uspešno gojenje določene CL je potrebno natančno poznati vrsto tkiva in njegove lastnosti (gojenje, uporaba primerne medija, karakterizacija) (9,12,13).

2.2.1 Histopatološko razvrščanje

Primarni RD delimo na neinvazivne in invazivne oblike. Med neinvazivne prištevamo duktalni intraepitelni karcinom (DCIS) in lobularni intraepitelni karcinom (LCIS). Značilnost teh vrst raka je, da ne preraščajo bazalne membrane in ne zasevajo v oddaljene organe (12). Pogosteje se pojavljajo invazivne histopatološke vrste. Invazivne vrste RD so: invazivni karcinom nespecifičnega tipa (predstavlja $\frac{3}{4}$ vseh invazivnih vrst RD, pogosto je pridružen DCIS); lobularni karcinom (5–10 % invazivnih vrst RD), karcinom z medularnimi lastnostmi (ugodna prognoza, zajema okoli 5–7 % vrst RD); mucinozni karcinom (dobra prognoza, 3–5 % RD) in tubularni karcinom (1–4 % RD, zelo dobra prognoza) (9). Druge redkejše oblike RD so mikropapilarni, slinavkam podobni, kribriformni, metaplastični, karcinom z apokrino diferenciacijo ipd. (9,12,13).

2.2.2 Intrinzično in molekularno razvrščanje

Na podlagi profila genske izraženosti ločimo več podtipov RD. S pomočjo imunohistokemične analize delimo RD glede na prisotnost/odsotnost ER, PR. S pomočjo *in situ* hibridizacije pa povečano izraženost HER2 (9). Negativni receptorski status je značilen za TNRD (4).

Z razvojem DNA mikročipov (angl. *microarrays*) se je gensko ekspresijsko profiliranje (GEP) zelo razširilo v prognozi RD. En izmed ključnih namenov je opredelitev bolnikov z dovolj dobro prognozo, ki bi omogočala opustitev kemoterapije. Pionirsko raziskavo na tem področju so naredili Sørbye in sod., ki so v svoji raziskavi ugotovili značilen molekularni profil RD s pomočjo 456cDNA fragmentov (14). Na podlagi tega je bil RD klasificiran v 5 različnih intrinzičnih podtipov

z značilnim kliničnim potekom ter izidom ((luminalni tip A, luminalni tip B, tumorji s prekomerno izraženostjo HER2, bazalni in normalnemu-podobni tumorji (angl. normal epithelial-like)) (15,16). Vsak podtip ima svojo prognozo in odgovor na zdravljenje. Luminalna A (LA) in B (LB) podtipa sta odzivna na hormonsko zdravljenje. HER2 kategorija je primerna za zdravljenje s trastuzumabom. Bazalni fenotip je opisan kot TNRD zato, ker je karakteriziran s pomanjkanjem izraženosti ER, PR in HER2. Čeprav so podobnosti med bazalnim in TNRD jih ne velja enačiti, kajti v skupino TNRD lahko prištevamo še druge podtipe (5,13).

Kljub številnim poimenovanjem in različnemu številu kategorij spada RD večinoma v **3 glavne intrinzične skupine** (npr. luminalni, HER2-pozitiven in TNRD fenotipski tumorji, ki so najbolj heterogeni in so večinoma bazalnega podtipa). Prikaz delitve tumorjev je razviden iz **tabele 1** (17–19).

Tabela 1: Prikaz delitve RD na podskupine.

Intrinzični podtip	IHC status	Gradus	Izid zdravljenja	Prevalenca	Vir
Luminalni tip A	(ER+ PR+) HER2-KI67- (<15 %)	1/2	Dober	23,7 %	(17)
Luminalni tip B	(ER+ PR+) HER2-KI67+ (>15 %)	2/3	Srednji	38,8 %	(17)
HER2	(ER+ PR+) HER2+KI67+		Slab	14 %	
HER2	(ER-PR-) HER2+	2/3	Slab	11,2 %	(17)
Bazalni	(ER-PR-) HER2-, bazalni označevalev+	3	Slab	12,3 %	(17)
Normalnemu-podoben	(ER+ PR+) HER2-KI67-	1/2/3	Srednji	7,8 %	(18)

Legenda: IHC – Imunohistokemični status, ER – estrogenski receptor, PR – progesteronski receptor. Cut-off za Ki76 je 15 %. Povzeto po Xiaofeng et al. (13,19).

2.3 Dejavniki tveganja za rak dojk

Z nastankom RD povezujejo številne dejavnike tveganja:

- Spol: ženske zbolevajo za RD 100-krat pogosteje kot moški.
- Starost: Tveganje za RD se povečuje s starostjo, tri četrtine žensk zbolijo po 50. letu starosti, največ med 50. in 70. letom starosti.
- Prejšnji rak dojk: Ženske, ki so se zdravile zaradi RD, imajo od 2 do 3-krat večje tveganje, da bodo zbolele zaradi RD na isti ali drugi dojki.
- RD v družini: pri ženskah, pri katerih je zaradi RD zbolela sorodnica prvega kolena (mama, sestra), je tveganje za RD 2- do 3-krat večje. Tveganje je višje, kadar so bile sorodnice mlade in/ali kadar so zbolele za rakom na obeh dojkah.
- Genske mutacije - Nosilci BRCA mutacije imajo 40% do 85 % doživetjsko tveganje za razvoj RD, rak ovarijev ali drugo obliko primarnega raka.
- Nekatere benigne bolezni dojk: predvsem atipična hiperplazija in v manjši meri nekatere benigne bolezni brez atipij.
- Reproductivni dejavniki: tveganje za RD večajo zgodnja menarha, pozna menopavza, nerodnost in višja starost ob prvem porodu. Vpliv splavov, spontanin in/ali induciranih na tveganje za nastanek RD ni povsem jasn, podatki v literaturi si nasprotujejo. Z daljšanjem časa dojenja se relativno tveganje za nastanek RD zmanjšuje.
- Hormonska zdravila: raziskave so pokazale, da žensk, ki so jemale oralne hormonske kontraceptive (OHKC), RD dolgoročno ne ogroža bolj od tistih, ki tovrstne kontracepcije niso uporabljale. Tveganje je neznatno večje med jemanjem OHKC in 10 let po končanem jemanju. Na podlagi do sedaj znanih podatkov kratkotrajna uporaba nadomestnega hormonskega zdravljenja (do pet let) bistveno ne zvišuje tveganja. Tveganje se večja z dolžino obdobja jemanja terapije.
- Drugi dejavniki tveganja so še: ionizirajoče sevanje, debelost, prekomerno uživanje alkohola, prehrana z dosti maščobami, premajhna telesna aktivnost (20).

Zaščitni dejavniki so:

- Uporaba estrogena po histerektomiji.
- Telesna vadba.
- Zgodnja nosečnost.
- Dojenje.
- Uporaba selektivnih modulatorjev estrogenskih receptorjev.

- Uporaba aromataznih inhibitorjev ali inaktivatorjev.
- Preventivna mastektomija.
- Preventivna odstranitev jajčnikov (20).

2.4 Diagnostika

V Sloveniji je od leta 2008 uveljavljen Državni presejalni program za odkrivanje RD, ki se imenuje Dora. V ta program so pisno vabljenke ženske, stare od 50 do 69 let. Vsako drugo leto prejmejo pisno vabilo na pregled, v katerem so določeni tudi kraj, datum in ura pregleda. Ženske med 20. in 50. letom (niso zajete v program Dora) imajo pravico do kliničnega pregleda dojk vsako tretje leto. Za iskanje RD se uporablja mamografija, slikanje dojk z rentgenskimi žarki. Pravilno izvajano mamografsko presejanje pomeni predvsem visoko kakovost slike ob nizki dozi sevanja in neoporečno tolmačenje posnetka. Presejanje pomeni iskanje predstopenj ali začetne bolezni med navidezno zdravimi ljudmi s preprostimi preiskavami, ki izločijo tiste, ki imajo morda predinvazijsko ali zgodnjo invazijsko obliko raka, zaradi česar so pri njih potrebne nadaljnje diagnostične preiskave. Presejanje lahko poteka oportunistično, po nasvetu zdravnikov ali na pobudo žensk ali pa gre za množično, organizirano presejanje, kjer vse ženske v določeni starostni skupini s pisnimi vabili povabijo na preventivni oz. presejalni pregled (21).

Po opravljenem kliničnem pregledu, UZ pregledu in mamografiji se ob sumljivih lezijah opravi še debeloigelnna biopsija (DIB). V kolikor se z manj invazivnimi metodami ne more določiti narave lezije se opravi kirurška biopsija. Druge indikacije so: patološki izcedek; radialna brazgotina; intraepitelni lobularni karcinom, atipična duktalna hiperplazija; atipična lobularna hiperplazija; papilarne lezije; hitrorastoči benigni tumorji (fibroadenimi, hamartomi, lipomi) (21).

Kirurška biopsija je definirana je kot kirurški postopek, pri katerem se odstranjuje določena lezija ali mikrokalcinacije v dojki z namenom postavitve diagnoze. Posledično služi tako zdravljenju kot tudi diagnostičnemu namenu. Poseg se opravi tako, da se incizija planira v smeri najmanjše tenzije in večinoma v lokalni anesteziji z 1 % lidokainom. Pri sumljivih spremembah se priporoča varnostni rob (0,5-1 cm). Lahko se napravi tudi zamrzli rez med operacijo. Po odstranitvi tumorja se preparat označi po metodi MAS (medialno, anteriorno, superiorno). Ob tem se seveda še intraoperativno preveri robove (UZ ali radiološko) in opravi hemostazo (21).

2.5 Zdravljenje boleznij dojke

Zdravljenje boleznij dojke je v primerih benigne boleznij večinoma samo konzervativno ali kirurško.

V primeru maligne boleznij je način zdravljenja odvisen od več dejavnikov:

- Stadija boleznij (TNM).
- Prizadetosti bezgavk.
- Podtipa in lastnosti tumorja (npr. status receptorjev).
- Bolnikovega splošnega stanja.

V nadaljevanju so prikazana osnovna načela zdravljenja.

2.5.1 Kirurško zdravljenje

Kirurški poseg je v večini primerov RD prvi način zdravljenja. Namen je doseči lokalni nadzor nad boleznijo, pridobiti tkivo za dokončno diagnozo boleznij in pri lokalizirani obliki doseči ozdravitev. Posege lahko delimo na ohranitvene, mastektomije, subkutane mastektomije in preventivne mastektomije (22).

Ohranitveno zdravljenje je od osemdesetih let prejšnjega stoletja del standardnega zdravljenja bolnic z začetnim RD. Cilj je lokalni nadzor nad boleznijo in dober kozmetični učinek pri ohranjeni dojki. Kirurg odstrani tumor s plaščem makroskopsko zdravega tkiva. Raziskave so pokazale, da kljub odstranitvi zdravega tkiva v 60 % najdemo maligne celice v dojki več kot 2 cm od primarnega tumorja. Ostanek dojke je potrebno obsevati. V spodnji tabeli so prikazane kontraindikacije za ohranitveni kirurški pristop (22,23).

Tabela 2: Prikaz kontraindikacij za ohranitveno kirurgijo.

Absolutne kontraindikacije	Relativne kontraindikacije
<ul style="list-style-type: none">- Prizadetost dojke ali prsne stene, ki je bila že predhodno obsevana.- Nosečnost (obsevanje).- Multifokalnost boleznij.- Difuzne maligne mikrokalcinacije.- Pozitivni robovi po dveh ekscizijah.	<ul style="list-style-type: none">- Pridružena bolezen vezivnega tkiva, ki prizadene tudi kožo.- Tumorji večji od 5 cm.- Ženske mlajše od 35 let, ki imajo mutacijo BRCA1/2 (preventivna mastektomija).

Povzeto po Fajdic et. al. (23).

Enostavna mastektomija je odstranitev dojke s pripadajočim kožnim režnjem. Modificirana radikalna mastektomija pa zajema odstranitev dojke s kožnim režnjem in izpraznitev pazdušne lože. Radikalnih mastektomij (odstranitev celotne dojke s kožo, velike in male prsne mišice ter pazdušnih bezgavk) se ne opravlja več.

Pri posegu se odstrani dojko z ovojnico, prav tako povrhnja ovojnica velike prsne mišice. Pazdušno maščevje se odstrani glede na prizadetost bezgavk. V kolikor niso prizadete se izvaja biopsija varovalne bezgavke. Če je bezgavka pozitivna se opravi odstranitev bezgavk do medialnega roba male prsne mišice (dve verigi bezgavk). V primeru večje prizadetosti se jih odstrani še do kostoklavikularne vezi (tri verige bezgavk). Po operaciji je možna takojšnja rekonstrukcija dojke (22).

Pri **subkutani mastektomiji** se lahko ohrani koža, kajti ni sestavni del žlez. Areolo in bradavico se ob tem vseeno mora odstraniti. Postopek je podoben kot pri mastektomiji, le da je reženi manjši. Ob potrebi se opravi tudi odstranitev pazdušnih bezgavk ali biopsija varovalne bezgavke (angl. sentinel node biopsy – SNB). Po odstranitvi se lahko opravi rekonstrukcija (22).

Preventivna mastektomija se opravi pri velikem tveganju za RD, kadar ima bolnica družinsko obremenjenost, pozitivno gensko testiranje ali pa je ob družinski obremenjenosti že imela rak na eni dojki. Priporoča se, da se ob odstranitvi dojke opravi tudi biopsija varovalne bezgavke, saj obstaja možnost okultnega raka. Poseg zgolj zmanjša tveganje pojavnost RD. Pri skupini z visokim tveganjem se mora opraviti 6 preventivnih mastektomij, da preprečimo en karcinom, oziroma 25 preventivnih mastektomij, da se prepreči ena smrt zaradi karcinoma dojke. Pri srednje velikem tveganju govorimo o 13 in 42 preventivnih mastektomijah.

2.5.2 Pregled in odstranjevanje bezgavk

Status pazdušnih bezgavk je eden od napovednih dejavnikov za preživetje bolnic z RD. Odstranitev je ena izmed metod določanja stadija bolezni prav tako pa tudi omogoča dobro lokalno kontrolo bolezni z nizko stopnjo lokalnih ponovitev.

SNB se izvaja pri bolnicah, ki imajo klinično in ultrazvočno negativne bezgavke. S tem posegom se želi ugotoviti ali je bolezen že napredovala in ali je potrebna dodatna odstranitev bezgavk. Varovalna bezgavka je tista bezgavka, ki prva drenira limfo iz tumorja in po vsej verjetnosti predstavlja prvo mesto zasevka. Za prepoznavanje se uporabi radioizotop (Tc99m) in/ali modrilo, ki se kopičita v prvi bezgavki. S pomočjo intraoperativnega detektorja se poišče bezgavko, odstrani in pošlje na analizo. V kolikor je intraoperativni citološki pregled bezgavke sumljiv se takoj opravi še odstranitev preostalih bezgavk.

Odstranitev pazdušnih bezgavk (tri verige) se opravi če je: prisoten citološko pozitiven klinični zasevek v pazdušni bezgavki; invazivni karcinom večji od 3 cm; multifokalni ali multicentrični karcinom; zasevek v varovalni pazdušni bezgavki; pri zasevkih večjih od 2 mm. Najpogostejši pozni zaplet je limfedem roke (20).

2.5.3 Sistemsko zdravljenje

Sistemsko zdravljenje raka dojke delimo na hormonsko terapijo, kemoterapijo, tarčno zdravljenje in podporno zdravljenje z bifosfonati. Zdravljenje je lahko neoadjuvantno ali adjuvantno.

Hormonska terapija

S hormonsko terapijo (HT) zdravimo hormonsko odvisne tumorje. Učinkovitost HT je odvisna od hormonske odvisnosti tumorja, katere merilo je navzočnost hormonskih receptorjev v tumorju. Prisotnost le-teh se natančno določi ob imunohistokemični analizi tumorja. Hormonsko odvisni so tumorji, pri katerih je vsaj 1 % tumorskih celic pozitivnih na prisotnost ER in/ali PR receptorjev. Neoadjuvantno HT se uporablja pri starejših bolnicah s hormonsko odvisnim rakom in/ali kontraindikacijami za KT.

Poznamo več vrst HT:

- Zavora delovanja jajčnikov – delovanje jajčnikov lahko zavremo s kirurško ablacijo jajčnikov, z njihovim obsevanjem (izjemoma) ali medikamentozno z GnRH/LHRH (angl. luteinizing hormone-releasing hormone) agonisti (povzročimo reverzibilno kastracijo). LHRH agonisti se običajno uporabljajo kot adjuvantno zdravljenje pri predmenopavzalnih bolnicah, običajno v kombinaciji z drugo HT (npr. tamoksifen) ali če je prisoten metastatski rak dojke pri predmenopavzalnih bolnicah.
- Tamoksifen ([®]Nolvadex) – se uporablja kot adjuvantno zdravljenje pri pred in pomenopavzalnih bolnicah ter pri metastatskem RD (pred in pomenopavzalne) 1 ali 2. red HT.
- Zaviralci aromataze – poznamo jih več vrst. Delimo jih lahko na nesteroidne (anastrozol, letrozol) in steroidne (ekzemestan). Uporabljamo jih kot adjuvantno zdravljenje pri pomenopavzalnih bolnicah kot prva HT ali kot nadaljevanje HT po zdravljenju s tamoksifonom in pri metastatskem RD (pomenopavzalne) 1. ali 2. red.
- Steroidni zaviralec aromataze + everolimus – se uporablja pri metastatskem RD (pomenopavzalne) po predhodnem zdravljenju z nesteroidnim zaviralcem aromataze.

- Fulvestrant – se uporablja pri zdravljenju metastatskega RD (postmenopavzalne) 2. ali 3. red HT.
- Progestini – predstavnik te skupine je megestrol acetat. Uporablja se predvsem pri metastatskem RD (pred in pomenopavzalno) kot HT \geq 3. reda (20).

Kemoterapija

Rak dojk je občutljiv na zdravljenje s številnimi citostatiki. Največkrat zdravimo s kombinacijo citostatikov, nekatere citostatike pa uporabljamo tudi kot monoterapijo.

Poznamo več vrst citostatikov:

- Antraciklini – doksorubicin, epidoksorubicin, liposomalni doksorubicin, mitoksantron.
- Taksani – docetaksel, paklitaksel, nab-paklitaksel.
- Drugi – ciklofosamid, metotreksat, 5-fluorouracil, kapecitabin, vinorelbin, etopozid, cisplatin, karboplatin, gemcitabin, eribulin ipd.

Citostatiki se uporabljajo kot adjuvantno ali neadjuvantno zdravljenje ter pri metastatskem RD. Akutni reverzibilni neželeni učinki so alopecija, slabost, bruhanje, utrujenost in mielosupresija, kronični nereverzibilni pa kardiomiopatija, akutna levkemija in nevropatija.

Neoadjuvantna KT

Indikacije za neoadjuvantno KT so T4 tumorji, T3 tumorji ali manjši z namenom doseči ohranitveno operacijo namesto mastektomije, nižji stadiji T ob N1 in N2 z agresivnim biološkim potencialom. Obvezna je histološka biopsija tumorja za določitev napovednih dejavnikov poteka bolezni in odgovora na zdravljenje, ocena razširjenosti bolezni, vstavev označevalnega klipa v tumor pred začetkom neadjuvantne KT in MR dojke pred in po neadjuvantni KT. Zdravljenje poteka s sistemsko polikemoterapijo: antraciklini +/- taksani, pri HER2 pozitivnih bolnicah tudi trastuzumab (20).

Zdravljenje s tarčnimi zdravili

Vrste tarčnih zdravil:

- Monoklonsko protitelo trastuzumab – indicirano je samo za zdravljenje tumorjev s prekomerno izraženim receptorjem HER2 ali pomnoženim genom za HER2, kot dopolnilno zdravljenje ali pri metastatskem RD. Uporabljamo ga v kombinaciji s taksani in drugimi

nekardiotoksičnimi citostatiki, s HT ali kot vzdrževalno zdravljenje (po zaključenem citostatskem zdravljenju).

- Mala molekula lapatinib – indiciran je pri metastatskem RD s prekomerno izraženim receptorjem HER2 ali pomnoženim genom za HER2 po/ob zdravljenju s trastuzumabom. Uporablja se lahko v kombinaciji s kapecitabinom, letrozolom ali trastuzumabom (20).

Podporno zdravljenje

Indicirano je ob HT ali KT, kadar so pretežno osteolitični zasevki v kosteh in/ali hiperkalcemija.

Vrste zdravljenja so:

- Denosumab podkožno na 4 tedne.
- Parenteralna aplikacija aminobisfosfona na 3-4 tedne.
- bisfosfonat vsakodnevno v obliki tablet (klodronat, ibandronat) pri zelo izbranih bolnicah, kjer gre za počasno rast tumorja, majhen obseg zasevkov, dobro splošno stanje zmogljivosti in so brez hiperkalcemije.

Radioterapija

Namen obsevanja RD po operaciji je uničiti morebitne preostale maligne celice v dojki oz. obolelem predelu in preprečiti lokalni recidiv. Pri inopreabilnem raku se s radioterapijo poskuša zmanjšati ali popolnoma uničiti tumorsko maso. Pri metastaski bolezni je radioterapija del simptomatske terapije. Radioterapevtske doze za lokalno ali/in regionalno adjuvantno obsevanje so 45-50 Gy razdeljenih na 25-28 frakcij po 1,8-2 Gy dnevno z dodatnimi 10-16 Gy za ležišče tumorja (frakcije po 2 Gy).

3 CELIČNE LINIJE

Pomemben delež novih dognanj o RD je rezultat *in vitro* in *in vivo* raziskav na CL (6,7,24,25). Najpogosteje uporabljene CL so MCF7, T47D in MDAMB231 (26). Njihove značilnosti so: MCF-7 – CL RD tipa LA je bila izolirana leta 1970 od 69-letne belke; T47D CL tipa LA je bila izolirana iz plevralnega izliva duktalnega karcinoma dojke 54-letne ženske; MDAMB231 CL RD tipa TNRD bazalni podtip B (TNRD-B) je bila izolirana iz adenokarcinoma 51-letne ženske; BT-20 CL RD tipa TNRD bazalni podtip A (TNRD-A) pa je bila izolirana iz RD 74-letne ženske leta 1958.

3.1 Nomenklatura celičnih linij in njihovo poimenovanje

Prvo humano CL je ustvaril George Gey pred petdesetimi leti v laboratoriju v Baltimoru. Poimenovana je bila po bolnici, katere tkivo raka materničnega vratu so uporabili. Bolnici je bilo ime Henrietta Lacks in CL je bila poimenovana HeLa (27).

Prva CL RD je bila ustvarjena leta 1958 in poimenovana BT-20 (28). Po dvajsetih letih je prišlo do naslednjega preboja in CL so postale bolj dostopne (29,30). Izšla je serija CL MDA (M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute). Leta 1973 so v Michigan Cancer Foundation ustvarili linijo MCF-7, ki je še dandanes ena izmed najpogosteje uporabljenih na svetu. Za njo je značilna velika senzitivnost ER, kar omogoča raziskave in modele za raziskovanje hormonske odzivnosti (31). Poimenovanje CL večinoma ni vezano na fenotipske značilnosti, ampak kako in kje so bile ustvarjene (laboratorij, bolnik, izolacije iz subkulture ipd.). Nekaj primerov takšnega poimenovanja so: HCC serija, ki je bila izolirana v Hamon Cancer Centre; MDA serija, poimenovana po M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute; MHT serija je znana po številnih subkultivacijah pod različnimi pogoji (npr. P53 mutacije, MYC pomnožitev, EGF-neodvisnost ipd.) itd. (5). Do pred kratkim za poimenovanje CL še ni bilo posebnih priporočil in so se lahko poimenovali tudi po znanstveniku, ki jih je ustvaril. Z novimi priporočili se bo temu lahko izogniti in zagotoviti lažje razumevanje in raziskovanje na tem področju (32).

V nadaljevanju povzemamo in navajamo nekatere pomembnejše točke in usmeritve pri poimenovanju CL iz trenutno aktualnih priporočil (32). Poimenovanje s kratkim imenom ali zgolj eno črko je neprimerno in onemogoča iskanje in razpoznavnost na spletu. Glavna priporočila so: i) ne sme se uporabiti ime donorja ali drugih osebnih podatkov (npr. letnica rojstva), ki bi ogrozili anonimnost bolnika; ii) ime CL mora vsebovati vsaj 6 znakov, vendar ne splošno uporabljenega termina (npr. glioma); iii) znaki zapisa morajo biti takšni, da ne povzročajo težav pri indeksiranju

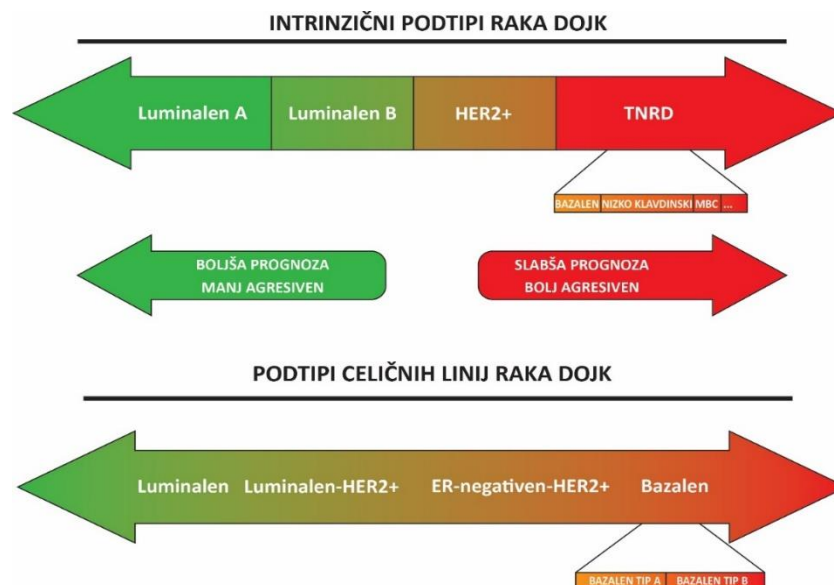
ali računalniškem iskanju (npr. posebni znaki, pismenke ipd.). Znaki so lahko napisani z veliko ali malo. Arabske številke, pomišljaji in podčrtaji so primerni; iv) ne sme se uporabiti presledkov, zvezdic, nadpisanih ali podpisanih znakov, poševnic, vprašajev, klicajev, presledkov, vejic, podpičij, grških črk ali drugih simbolov, v) podano ime mora biti edinstveno. Preverba se opravi s pomočjo iskanja po spletu (Google, PubMed, ipd.) ter spletne strani Cellosaurus (web.expasy.org/cellosaurus). Pri iskanju se mora preveriti tudi različice imena (npr. T406, T 406, T-406) in potencialno skrajšane oblike (npr. NCI-H420 ali H420) (32).

Za embrionalne matične celice in inducirane pluripotentne matične celice je že uveljavljena standardizirana nomenklatura. Priporočen stil poimenovanja za druge linije je sledeči: i) priporoča se uporaba določilnika izvora (angl. Origin identifier), ki se nanaša na inštitut ali laboratorij, kjer je bila CL vzgojena (npr. SK-Sloan Kettering, WI za Wistar Institute, FMUM-Faculty of Medicine, University of Maribor); ii) uporaba označevalca za serijo ali tkivo (npr. Glioma, Lu-Lung, Br-breast); iii) uporaba številke za identifikacijo specifične CL (npr. številka, odčitana iz posode, v kateri se je nahajalo tkivo); iv) dodatna številka, večinoma alfanumerična kombinacija dveh znakov, bi določila podvrsto, klon ali transformirane kulture (32).

3.1.1 Molekularna klasifikacija celičnih linij raka dojke

Profiliranje genskega izražanja je bilo v zadnjem času pogosto uporabljeno za katalogiziranje CL RD. Xiaofeng in sod. so v svojem prispevku analizirali 84 CL na podlagi statusa ER, PR in HER2 ter jih razdelili ob upoštevanju klasifikacije LA, LB, HER2+ in TNRD (A in B podtipa) (5).

CL TNRD se v literaturi opredelijo kot bazalni tip A ali B. TNRD-A je bolj podoben angl. *luminal-like* podtipu in tip TNRD-B angl. *basal-like*. Zaradi podobnosti med tipoma prihaja tudi do zmede v sami klasifikaciji. Primer tega je CL MDAMB468, ki je ponekod klasificirana kot bazalni tip A, v drugih prispevkih pa kot šibko luminalna vrsta. CL Hs578T in MDAMB231 sta ponekod opisani kot bazalni tip B in v drugih kot nizko klavdinski ali celo mezenhimskim podobne. Prikaz intrinzičnih podtipov raka in CL je viden na **sliki 1** in v **tabeli 3**. V **tabeli 4** je naveden seznam bolj znanih CL.



Slika 1: Primerjava med trenutnimi načini kategorizacije RD in njegovimi CL. Glede na status hormonskih receptorjev in HER2 se RD deli na Luminalni tip A in B, HER2+ ter TNRD, ki ga lahko delimo na bazalni, nizko klavdinski, metaplastični in z interferonom bogat RD.

Tabela 3: Molekularne in morfološke značilnosti CL RD.

PODTIP CL	mRNA	miRNA	PROT EIN	MORFOLOGIJA
Luminal	ER, GATA3, KRT19/KRT8/KRT18, XBP1, PBX1, ZNF278, SPDEF, CRABP2, MUC1, FOXA1, MYB, RET, EGR3, TFF1, HER3, TOB1, TFF3	hsa-miR-501-5p, hsa-miR-202, hsa-miR-760, hsa-miR-626	ER, GATA3, KRT19	Bolj diferenciran; več medceličnih tesnih stikov.
HER2+	HER2, GRB7, PERLD1, STARD3, C17ORF37 hsa-let-7b	hsa-miR-640, hsa-miR-200c, hsa-miR-378, hsa-miR-141, hsa-miR-196a, hsa-miR-29c, hsa-miR-18a*	HER2	Razpad medceličnih tesnih stikov.
TNRD	Trojno negativen A (Bazalni tip A)	KRT4/5/6A/6B/13/14/15/16/17, ITGA6, ITGB4/6, LAMB3, LAMC2, TRIM29, S100A2, SLPI, LYN, ANXA8, COL17A1, BNC1, MET, CD133, GABRK, VTCN1, BST2, FABP7, CD10/14/58/59.	EGFR, CAV1/2, MSN, ETS1, KRT5/6, CD10, MET	Angl. <i>core basal-like</i> .
TNRD	Trojno negativen B (Bazalni tip B)	VIM, SPARC, FN1, FBN1, HSA2, PRG1, COL3A1, COL6A1/2/3, COL8A1, MMP2/14, TIMP1, CTSC, PLAUR, AXL, PLAT, CD24(-), CD44, TGFB2, SERPINE1/2, TGFB1	CD44	Najslabše diferenciran in največ podobnosti z matičnimi celicami; bolj mezenhimskim podoben izgled in zelo invaziven.

Legenda: CL – celične linije, TNRD – trojno negativen RD.
Povzeto po Xiaofeng (5).

Celične linije luminalnega raka dojk

Za luminalni tip RD je značilna izraženost ER+ in/ali PR +. V literaturi je opisana sistematska raziskava profiliranja mikro RNA (miRNA) izraženosti, ki je pokazala specifično povečano izraženost hsa-miR-501-5p, hsa-miR-202, hsa-miR-760 in hsa-miR-626 v luminalnih celičnih linijah (LCL), ki so edinstvene za LCL brez ERBB2 izraženosti (HER2-) in posledično v pomoč pri specifikaciji posameznega podtipa CL. Prav tako so te miRNA povezane z E-kadherin (supresivni učinek na rast) genskimi mutacijami oz. njegovo izgubo. Posledično so LCL bolj diferencirane in so manj nagnjene k migraciji zaradi tesnih celičnih stikov (33).

Čeprav se v literaturi pogosto LCL ne deli na A in B podtipe glede na njihov status HER2, je takšen način kategorizacije pomemben za enotno nomenklaturu, lažje modeliranje in pri načrtovanju odgovora na poskuse zdravljenja. LCL tipa B so pogosto bolj invazivne in bolj agresivne kot LCL tipa A. V literaturi je opisano, da povečana izraženost HER2 pogosto korelira z zmanjšano izraženostjo ER oz. z zniževanjem ravni izražanja ER (5).

Celične linije HER2+ raka dojk

HER2+ CL (ER- in HER2+) imajo pogosto značilne spremembe v kromosomski regiji 17q12, ki vključuje gene HER2, GRB7 (na rastni faktor vezani protein 7), PERLD1, STARD3 in C17ORF37 (34). Povečana izraženost teh genov igra pomembno vlogo v onkogenezi RD in primernemu načinu zdravljenja. Prav tako je povečana izraženost miRNA hsa-let-7b, hsa-miR-640, hsa-miR-200c, hsa-miR-378, hsa-miR-141, hsa-miR-196a, hsa-miR-29c in hsa-miR-18a, ki so značilne za CL s povečano izraženostjo ERBB2 (33).

HER2+ CL predstavljajo zaradi svojih lastnosti vmesno postajo med LCL in BCL. Izkazujejo tako lastnosti luminalnih kot tudi bazalnih CL. Na podlagi izraženosti luminalnih in bazalnih označevalcev, razen ER in HER2, jih lahko delimo še na luminalne-ERBB2+ in ER-negative-ERBB2+ (33). V skladu z njihovimi molekularnimi lastnostmi so celice tega podtipa bolj agresivne v primerjavi z LCL, saj je povečana izraženost HER2 povezana z razgradnjo celičnih stikov in ob tem bolj odzivna na določene zdravilne učinkovine. Posledično predstavlja dober model za testiranje odzivnosti na učinkovino trastuzumab (33). Povečana izraženost proteinov estrogenski receptor 1 (ESR1), mitogen-aktivirana proteinska kinaza 1 (MAPK1/3), kinaza z mitogenom aktivirane protein kinaze (MEK ali MAPKK), tirozin kinaza 2 (TYK2), sintaza maščobnih kislin (FASN) in na rastni faktor vezani protein 7 (GRB7) je povezana z večjo občutljivostjo na zdravila (35). Povečana

izraženost na rastni faktor vezanega proteina 2 (GRB2), retinoblastomskega proteina (RB1) in filamina alfa (FLNA) pa je povezana z večjo odpornostjo na zdravila. Prav tako lahko na odpornost trastuzumab nakazujejo mitogen-aktivirana proteinska kinaza (MAPK), tarčno mesto sesalcev za rapamicin (mTOR) in *Toll-like* receptorske signalne poti kot tudi N-glikan biosinteza ter inozitol-fosfat signalizacija (35).

Celične linije TNRD

Izmed podtipov CL je TNRD najbolj heterogen. TNRD CL imajo zelo nizko izraženost ali pa so brez vseh treh označevalcev (ER-, PR-, HER2-). TNRD lahko delimo na dva bazalna podtipa: TNRD-A in TNRD-B.

TNRD-A linije so pogosto poimenovane bazalnim podobne, zaradi prisotnosti:

- citokeratinov (KRT4/5/6A/6B/13/14/15/16/17),
- integrinov (ITGA6, ITGB4/6) in
- LAMB3, LAMC2, TRIM29, S100A2, SLPI, ANXA8, COL17A1, BNC1, CD10/14/58/59, MET, LYN, CD133, GABRK, VTCN1, BST2, FABP7 (33).

Za TNRD-B CL je značilna povečana izraženost genov, ki so povezani z agresivnimi in invazivnimi lastnosti: vimentin (VIM), moezin (MSN), plazminogen aktivator tkivne vrste (PLAT), transformirajoči rastni faktor beta-1 (TGFB1), transformirajoči rastni faktor beta-2 prekursor (TGFBR2), tirozin-protein kinazni receptor UFO (AXL), kolageni (COL3A1, COL6A1/2/3, COL8A1), matriks metalopeptidaza (MMP2/14) metalopeptidaza inhibitor (TIMP1) ipd. (5, 7, 8); ter lastnost podobnosti matičnih rakastih celic, kot so CD44(+) in CD24(-) (35,36).

Kolageni (COL3A1, COL6A1/2/3, COL8A1), proteaze (MMP2/14, TIMP1, CTSC, PLAU, PLAUR, SERPINE1/2, PLAT, uPA, PAi) in interakcije med proteini za stabilizacijo citoskeleta (VIM, MSN) so pomembni pri remodelaciji zunajceličnega matriksa, ki je odgovoren za celično migracijo. Signalni faktorji (TGFB1, TGFBR2, AXL) pa so ključnega pomena za nastanek agresivne morfologije. Ob tem se uporabljajo tudi določeni proteini (EGFR, CAV1/2, MSN, ETS1) za karakterizacijo TNRD CL (37,38).

Za opredelitev TNRD-A in B CL se uporabljajo specifične miRNA. Pri tipu A je prisotna predvsem povečana izraženost hsa-miR-492, hsa-miR-26b, hsa-miR-617 in hsa-miR-155. Pri tipu B pa je

povečana izraženost hsa-miR-22, hsa-532-3p, hsa-miR-125b, hsa-miR-501-5p, hsa-miR-155. Zanimivo je, da hsa-miR-155 oz. miR-155-5p (TNRD-A) in hsa-miR-155* oz. miR-155-3p (TNRD-B) izvirata iz enakega prekursorja, vendar izkazujeta nasprotno vzorec izraženosti pri teh tipih TNRD (33).

Onkogeno vlogo hsa-miR-155 je dobro opisana pri levkemijah. Prav tako naj bi igrala pomembno vlogo v kardiovaskularnem sistemu (okvara vodi do hipertenzije) in imunskem odgovoru. Nekateri izmed predlaganih načinov delovanja so v sklopu apoptoze, diferenciacije, angiogeneze, proliferacije in epiteljske mezenhimske tranzicije.

Fenotipsko so TNRD-A celice bolj diferenciran podtip od TNRD-B in lahko imajo ali luminalnemu-podobne ali bazalnemu-podobne morfološke značilnosti. TNRD-B celice imajo bolj mezenhimsko-podoben izgled in imajo večjo tendenco k invaziji. Posledično so TNRD-A CL večinoma podobne osrednjemu bazalnemu tumorskemu podtipu. TNRD-B celice se lahko uporabijo za modeliranje nizko klavdinskega ali metaplastičnega RD (39).

BRCA 1 kodira protein, ki oblikuje Rap80/Abraxas/Brca1/Brcc36 kompleks kot odgovor na DNA poškodbe. Mutacije tega gena so povezane z dedno obliko RD, ki je podoben sporadičnemu jedrnemu bazalnemu tumorju. TNRD-A CL so karakterizirane z BRCA1 mutacijskim vzorcem. Večina trenutno dostopnih CL RD (HCC1937, MDAMB436, SUM149PT, HCC3153) spadajo k temu podtipu (16,40).

Tabela 4: Seznam celičnih linij raka dojke

CEL. LINIJE	ER	PR	HER2	BRCA1	PODT	SER	MEDIJ	TUM
BT483	+	+/-	-	WT	LA	BT	RPMI	IDC
CAMA1	+	+/-	-	WT	LA	NA	DMEM	AC
EFM19	+	+	-	ND	LA	EFM	RPMI	IDC
HCC1428	+	+	-	ND	LA	HCC	RPMI	AC
HCC712	+	+/-	-	ND	LA	HCC	RPMI	DC
IBEP2	+	-	-	ND	LA	NA	DMEM	IDC
KPL1	+	-	-	ND	LA	NA	RPMI	IDC
LY2	+	-	-	ND	LA	NA	DMEM	IDC
MCF7	+	+	-	WT	LA	MCF	RPMI, DMEM	IDC
MDAMB134	+	-	-	ND	LA	MDA	RPMI	IDC
MDAMB134VI	+	-	-	WT	LA	MDA	DMEM	IDC
MDAMB175	+	-	-	ND	LA	MDA	RPMI	IDC
MDAMB175VII	+	-	-	WT	LA	MDA	DMEM	IDC
MDAMB415	+	+/-	-	WT	LA	MDA	DMEM	AC
T47D	+	+	-	WT	LA	NA	RPMI	IDC
ZR751	+	+/-	-	WT	LA	ZR75	RPMI	IDC
ZR75B	+	-	-	ND	LA	ZR75	RPMI	NA
BSMZ	+	+	+	ND	LB	NA	RPMI	IDC
BT474	+	+	+	WT	LB	BT	RPMI	IDC
EFM192A	+	+	+	ND	LB	EFM	RPMI	AC
BEP1	-	+	+	ND	LB	IBEP	DMEM	IDC
IBEP3	-	+	+	ND	LB	IBEP	DMEM	IDC
MDAMB330	+	-	+	WT	LB	MDA	RPMI	ILC
MDAMB361	+	+/-	+	WT	LB	MDA	RPMI, DMEM	AC
UACC812	+	+/-	+	WT	LB	UACC	RPMI, DMEM	IDC
ZR7527	+	-	+	WT	LB	ZR75	RPMI	IDC
ZR7530	+	-	+	WT	LB	ZR75	RPMI	IDC
21MT1	-	+/-	+	ND	H	21	α -MEM/DFC1	IDC
21MT2	-	+/-	+	ND	H	21	α -MEM/DFC1	IDC
21NT	-	+/-	+	ND	H	21	α -MEM/DFC1	IDC
21PT	-	+/-	+	ND	H	21	α -MEM/DFC1	IDC
AU565	-	-	+	WT	H	NA	RPMI	AC
HCC1008	-	-	+	ND	H	HCC	RPMI	IDC
HCC1569	-	-	+	WT	H	HCC	RPMI	MC
HCC1954	-	-	+	WT	H	HCC	RPMI	DC
HCC202	-	-	+	WT	H	HCC	RPMI	DC
HCC2218	-	-	+	ND	H	HCC	RPMI	DC
HH315	-	-	+	ND	H	HH	RPMI	C
HH375	-	-	+	ND	H	HH	RPMI	C
KPL-4	-	-	+	WT	H	KPL	DMEM	IDC
MDAMB453	-	-	+	WT	H	MDA	RPMI, DMEM	AC
OCUB-F	-	-	+	WT	H	NA	RPMI	NA
SKBR3	-	-	+	WT	H	SKBR	RPMI, McCoys	AC
SKBR5	-	-	+	WT	H	SKBR	RPMI	AC
SUM190PT	-	-	+	WT	H	SUM	Ham's F12	Inf
SUM225CWN	-	-	+	WT	H	SUM	Ham's F12	IDC
UACC893	-	-	+	WT	H	UACC	RPMI	IDC
BT20	-	-	-	WT	TNRD-A	BT	RPMI, DMEM	IDC
CAL148	-	-	-	WT	TNRD-A	CAL	DMEM	AC
DU4475	-	-	-	WT	TNRD-A	NA	RPMI	IDC
EMG3	-	-	-	ND	TNRD-A	NA	DMEM	IDC
HCC1143	-	-	-	ND	TNRD-A	HCC	RPMI	DC
HCC1187	-	-	-	ND	TNRD-A	HCC	RPMI	DC
HCC1599	-	-	-	ND	TNRD-A	HCC	RPMI	DC
HCC1806	-	-	-	ND	TNRD-A	HCC	RPMI	SqC
HCC1937	-	-	-	MU	TNRD-A	HCC	RPMI	DC
HCC2157	-	-	-	ND	TNRD-A	HCC	RPMI	DC
HCC3153	-	-	-	MU	TNRD-A	HCC	RPMI	DC

HCC70	-	-	-	WT	TNRD-A	HCC	RPMI	DC
HMT3522	-	-	-	WT	TNRD-A	HMT	DMEM, F12	B
KPL-3C	-	-	-	ND	TNRD-A	KPL	RPMI	IDC
MA11	-	-	-	ND	TNRD-A	NA	DMEM	ILC
MDAMB435	-	-	-	WT	TNRD-A	MDA	DMEM	AC
MDAMB436	-	-	-	MU	TNRD-A	MDA	RPMI, L15	AC
MDAMB468	-	-	-	WT	TNRD-A	MDA	RPMI, L15	AC
MFM223	-	-	-	WT	TNRD-A	NA	MEM	C
SUM185PE	-	-	-	WT	TNRD-A	SUM	Ham's F12	DC
SUM229PE	-	-	-	WT	TNRD-A	SUM	RPMI	DC
BT549	-	-	-	WT	TNRD-B	BT	RPMI	IDC
CAL120	-	-	-	WT	TNRD-B	CAL	DMEM	AC
CAL51	-	-	-	WT	TNRD-B	CAL	DMEM	AC
CAL851	-	-	-	WT	TNRD-B	CAL	DMEM	AC
HCC1395	-	-	-	ND	TNRD-B	HCC	RPMI	DC
HCC1739	-	-	-	ND	TNRD-B	HCC	RPMI	DC
HCC38	-	-	-	ND	TNRD-B	HCC	RPMI	DC
HDQ-P1	-	-	-	MU	TNRD-B	NA	DMEM	IDC
Hs578T	-	-	-	WT	TNRD-B	NA	RPMI, DMEM	IDC
MDAMB157	-	-	-	WT	TNRD-B	MDA	RPMI, DMEM	MC
MDAMB231	-	-	-	WT	TNRD-B	MDA	RPMI, DMEM	AC
SKBR7	-	-	-	WT	TNRD-B	SKBR	RPMI	AC
SUM102PT	-	-	-	WT	TNRD-B	SUM	Ham's F12	IDC
SUM1315M02	-	-	-	MU	TNRD-B	SUM	Ham's F12	IDC
SUM149PT	-	-	-	MU	TNRD-B	SUM	Ham's F12	InfDC
SUM159PT	-	-	-	WT	TNRD-B	SUM	Ham's F12	AnC

Legenda: PODT – podtip RD, SER – serija CL, MEDIJ – uporabljen rastni medij, TUM – vrsta izvornega tumorja, WT – divji tip (angl. *wild type*), ND – nedoločeno, LA – luminalni tip A, LB – luminalni tip B, H - HER2 pozitiven, TNRD-A – trojno negativen A, TNRD-B – trojno negativen B, AC – adenokarcinom, AnC – anaplastični karcinom, B – benigni tumor, C – karcinom, CS – karcinosarkom, DC – duktalni karcinom, IDC – invazivni duktalni karcinom, ILC – invazivni lobularni karcinom, InfC – vnetni karcinom, InfDC – vnetni duktalni karcinom, MC – medularni karcinom, SqC – skvamozni karcinom, NA – ni podatkov. Povzeto po Xiaofeng et al. (5).

3.2 Gojenje celičnih linij raka dojk

3.2.1 Mutacije

Pojav DNA alteracij je večji pri CL RD kot pri tumorjih. Povprečno so alteracije CL dvakrat pogostejše kot pri tumorjih (5,41). Vzrok temu je lahko dejstvo, da CL večinoma izvirajo iz invazivnih tumorjev z visokih gradusom. V takšnih celicah hitreje pride do genomskih sprememb v procesu *in vitro* kultivacije. Posledično imajo CL RD spremembe v DNA zapisu, ki niso prisotne v prvotnem tkivu ter so zgolj posledica kultivacije. Takšne *de novo* mutacije lahko privedejo do fenotipskih sprememb. Primer je MCF-7 CL, pri kateri je prisotna variabilna občutljivost na tamoksifen (42). Kljub temu je na podlagi podatkov primerjalne genomske hibridizacije (CGH) prisotno mnenje, da so CL, kar se tiče glavnih oz. pomembnejših DNA sprememb, primerljive s prvotnim tkivom (5,41–43).

Obstaja pa še druga vrsta kancerogenih dejavnikov vpliva na vzorce izražanja cele vrste genov. Ti dejavniki spremenijo izražanje nekaterih kritičnih genov (ter nastanek in delovanje njihovih produktov) brez neposrednega vpliva na DNK-zaporedje. Ta način delovanja imenujemo epigenetsko delovanje. Tako pri epigenetskih spremembah kot tudi pri genetskih spremembah je potrebno, da se novi vzorec vtisne v na novo zasnovan celični spomin in se prenese v naslednje generacije celic. Ti mehanizmi so prav tako podobni med CL RD in tumorji. V literaturi je opisano, da so metilacijski vzorci CpG-otokov bili primerljivi med CL in tumorjem. Geni, pri katerih je bil prisoten metilacijski vzorec na promotorski regiji, so bili: ER, PR, protein hipermetiliran pri raku 1 (HIC1), protein adenomatsne polipoze kolona (APC), rak dojk 1 (BRCA1) ipd. Ob tem pa so poročali tudi o neskladnostih na drugih genih (44).

Iz literature je razvidno, da so na molekularnem nivoju diskriminativni označevalci in iz tega sledeče fenotipske značilnosti prisotne v CL pogosto tudi značilne za tumorsko tkivo. Npr. geni, ki korelirajo z ER+ ali ER- fenotipom pri CL RD, so povezani s pozitivno ali negativno korelacijo ER izraženosti v tumorskem tkivu (5).

3.2.2 Celično okolje

Na celično okolje vpliva več dejavnikov; rastni medij, parametri gojenja (temperatura, atmosfera itd.), rast v 2D ali 3D kulturah ali kot ksenograft in dodani rastni dejavniki.

Kompleksne medcelične komunikacije se v *in vivo* okolju, kadar so CL vzgojene v plastičnih posodah in dvodimenzionalnih razsežnostih, izgubijo. CL so občutljive na razmere v kulturi. To velja predvsem za dodatek ravnih faktorjev, ki lahko spremenijo celični fenotip in vodijo v neprimerno aktivacijo signalnih poti ali diferenciacijo. Dober primer tega je, ko se luminalnim epitelijskim celicam doda epidermalni rastni faktor (EGF). To lahko vodi v izgubo izraženosti E-kadherin značilnosti, kar vodi v bolj premično obliko fenotipa. Gojenje v neprimernem okolju lahko drastično vpliva na celično morfologijo, interakcije med celicami in celico ter matriksom, celično polarnost in diferenciacijo kot tudi na spremembo signalnih kaskad genske izraženosti. Identifikacija najbolj primernih pogojev za celično rast in gojenje specifičnega fenotipa je posledično izrednega pomena. Kot model imajo 2D kulture številne pomanjkljivosti, še posebej v primerjavi s 3D sistemi (npr. organoidi). Primer potrditve omenjenega je raziskava Pickl in Ries, v kateri sta pokazala značilno drugačen odgovor na zdravilno učinkovino med 2D in 3D kulturo (45).

3.3 Omejitve in dileme uporabe in vitro CL

Kljub pomembni vlogi, ki jo igrajo CL RD v procesu raziskovanja in odkrivanja mehanizmov tumorske iniciacije in evolucije, imajo tudi svoje pomanjkljivosti. Potrebno je izpostaviti dilemo glede prenosljivosti dognanj na CL v klinično okolje (46). Čeprav so tkiva v večinskem deležu identična glede na glavno določitev receptorskega in HER2 statusa, je v zadnjem času vedno več znanega o naknadnih drastičnih genetskih in epigenetskih spremembah v sklopu vzgajanja linije v laboratorijskem okolju. Posledično ostaja odprto vprašanje o primerljivosti molekularnih značilnosti, heterogenosti RD in CL (5,46). Klonalna populacija ene CL ne more dobro prikazati raznolikosti procesov na intra-tumorskem nivoju. Karcinogeneza je večstopenjski proces, ki vključuje mnogo kliničnih in patoloških stopenj. Med te sodijo tipična hiperproliferacija, lokalna invazija, tvorba invazivnega karcinoma in v končni fazi razsoj bolezni. Ta proces spremljajo postopne pridobitve različnih vrst genetskih in epigenetskih mutacij celic, ki jim sledijo klonalna selekcija in ekspanzija. V fazi kultiviranja CL lahko pride do eliminacije določenega tipa celic, ki so sprva prisotne v tkivu, vendar se zaradi dejavnikov okolja ne morejo razviti. Vzroki so lahko v porušenem mikrookolju ali pomanjkanju posebnih dejavnikov. Posledično lahko pride do njihovega propada in s tem spremembe heterogenosti tumorja. Primer tega so celice, ki na plastični površini ali sploh ne rastejo oz. brez dodatka specifičnih dejavnikov iz tumorskega mikrookolja ne morejo uspevati in posledično odmrejo. Zato se poraja vprašanje ali je potencialna CL, ki bi lahko služila kot model tumorja in ob tem ohranjala vso heterogenost, sploh

mogoča. Uspeh v dolgoročni propagaciji je pomemben omejitveni dejavnik pri izdelavi kakovostne CL. Primer tega so CL TNRD. Ta podvrsta raka ima vsaj 4 podtipa: jedrno bazalen, nizko klavdinski, metaplastični in bogat z interferonom. Vsak izmed naštetih ima pomembne molekularne značilnosti in klinične implikacije. Na razpolago so zgolj TNRD-A in TNRD-B linije. TNRD -A je večinoma dobro reprezentativna za podtip jedrno bazalen in TNRD-B je uporaben za modeliranje nizko klavdinskega in/ali metaplastičnega podtipa. Prisotno pa je pomanjkanje za podtip bogat z interferonom. Prav tako je zelo malo CL (npr. MCF7, T-47D, MDAMB231), kljub celotnemu številu, ki so se uveljavile na trgu. Glede na tehnične težave pri ekstrakciji viabilnega tumorskega tkiva iz okoliške strome, je večina RD prvotno iz tkiva invazivnega karcinoma, kar nas vodi do razmisleka glede reprezentativnosti prvotnega tkiva. Takšen primer je v literaturi opisan za CL MDAMB435, katerega prvotno tkivo je morebiti bilo v resnici okultni melanom (47). V literaturi so tudi opisani vplivi fibroblastov na morfološke spremembe CL. Opisan je bil vpliv fibroblastov na stimulacijo izraženosti luminalnih keratinov v bazalni celicah in bazalnih keratinov v luminalnih celicah. Prav tako je bilo opisano, da celice vzgojene v okolju z visoko/nizko EGFR aktivnostjo pogosto postanejo ER+/- . To nakazuje na pomen vpliva okolja pri vzgoji CL (48). Dodaten pomislek pri uporabi CL RD je ponovljivost v različnih laboratorijih ali drugačnih pogojih. V teh primerih lahko CL razvijejo drugačne lastnosti. V literaturi so vidni primeri različne kategorizacije iste CL v edinstvene skupine na podlagi drugačnega molekularnega in morfološkega opisa. Pregled teh anomalij so opisali Xiaofeng et al. (5). Primeri, ki so jih izpostavili, so za HER2 in ER status. Prikaz teh anomalij je v **tabeli 5**.

Tabela 5: Osem celičnih linij, ki so različno opredeljene glede receptorskega statusa

Celične linije	ER	PR	HER2	Podtip
HCC1007	+	-	-	LA
HCC1007	+	-	+	LB
HCC1007	-	-	+	HER2+
HCC1419	+	-	+	LB
HCC1419	-	-	+	HER2+
HCC1500	+	+	-	LA
HCC1500	-	-	-	TNRD-B
HCC2185	-	-	-	TNRD-A
HCC2185	-	-	+	HER2+
SUM52PE	+	-	+	LB
SUM52PE	+	-	-	LA
SUM44PE	+	+	+	LB
SUM44PE	+	+/-	-	LA
EVSA-T	-	-	+	HER2+
EVSA-T	-	+	-	LA
MPE600	+	-	-	LA
MPE600	+	-	+	LB

Legenda: LA – luminalen tip A, LB – luminalen tip B, HER2+, TNRD-A – trojno negativen rak dojk vrste A, TNRD-B – trojno negativen rak dojk vrste B. Povzeto po Xiaofeng et al. (5).

Posledično so raziskave, ki bazirajo na CL in njihovi primerjavi zahtevne. Prav tako je razumevanje CL slabše in neenotno. Ob tem je potrebno izpostaviti, da je bil velik delež preiskav opravljen v 2D okolju in ne v 3D okolju, ki je boljši približek fiziološkemu tkivu. V večini poskusov na CL v 2D okolju se celice gojijo na rigidnih materialih kot so poliester ali steklo. Takšne standardne rudimentarne celične enoslojne kulture predstavljajo manj realistično podobo fiziologije realnega tkiva. Izbor materiala in pogojev gojenja bistveno vpliva na tkivno specifično arhitekturo (polarnost, sploščena oblika celic), mehanične/biokemične signale in posledično medcelično komunikacijo (49). Primerjava med splošnimi značilnostmi 2D in 3D sistema je predstavljen v **tabeli 6**.

Tabela 6: Primerjava med 2D in 3D celičnimi kulturami.

Kriterij	2D	3D
Morfologija	Oblika spremenjena	Realna oblika
Genetski profil	Polarizacija izgubljena	Polarizacija ohranjena
Celična diferenciacija	Geni za celično adhezijo, proliferacijo in preživetje so v primerjavi z <i>in vivo</i> spremenjeni	Boljši prikaz rastnih faktorjev, genov za proangiogenezo in adhezijske molekule.
Morfogeneza	Ne spontana	Lahko spontana preko celičnega stika ali zaradi topnih faktorjev
Angiogeneza	Samo observacijska	Lahko funkcionalna
Matematični model	Možen	Boljša geometrija, boljša povezava med strukturo in funkcijo
Ponovljivost	Kratkotrajna	Kontroverzna
Stroški	Dostopno	Drago
Večcelične raziskave	Boljše za ugotavljanje imunskega odgovora.	Primerno za kombinirano kulturo. Za večje število je zahtevna izvedba.

Povzeto po Hoarau-Vécho et al. (49).

3.4 In vivo modeli CL

Z izrazom *in vivo* je mišljen živ organizem. V našem primeru je govora o mišjih modelih. *In vivo* model raka pomeni fiziološko relevanten sistem, s pomočjo katerega lahko proučujemo faze iniciacije in invazije (25). Ob tem predstavljajo vmesno točko med *in vitro* modeli ter kliničnimi raziskavami. Dandanes je dostopno večje število mišjih modelov. Pregled le-teh je prikazan v **tabeli 7**. Časovni razvoj mišjih CL pa je razviden iz **slike 2**.

Najpogostejši in enostavni modeli so ksenografti pridobljeni iz celičnih linij (CDX). Ti temeljijo na vnosu humane CL v imunokomprimirano žival (25). Te CL so pogosto pridobljene iz visoko agresivnih malignih tumorjev ali plevralnega izliva (plevralna tekočina ob pljučnih zasevkih, npr. MDA-MB-231 CL), kar pomeni, da so ti modeli manj primerni za raziskavo zgodnje faze razvoja primarnega tumorja. CDX modeli predstavljajo relativno homogeno maso spremenjenih epiteljskih celic dojke in posledično ne prikažejo heterogene narave RD. Spontano zasevanje CDX

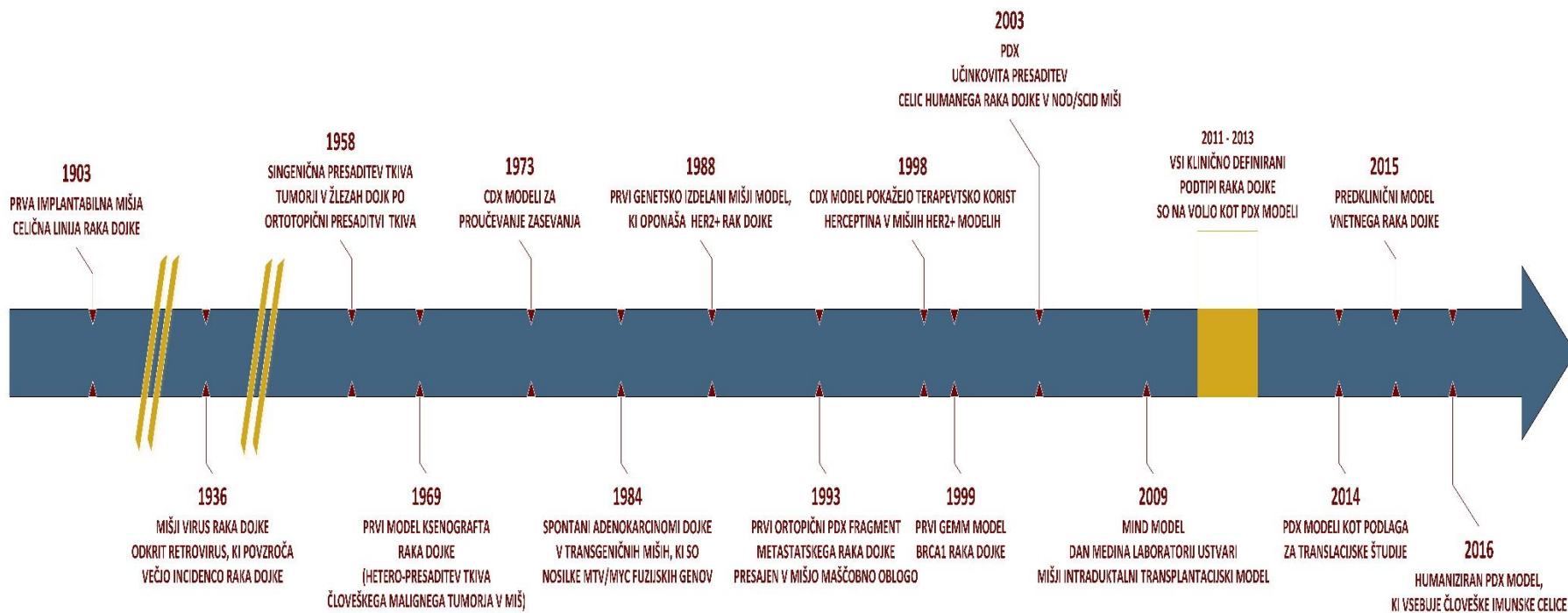
modelov je redko. Posledično niso primerne za takšne vrste raziskav (25). Naslednja skupina CL so od bolnikov pridobljeni ksenografti (PDXs). Za izdelavo teh je potreben prenos primarne humane rakaste celice ali kosov tumorja v imunokomprimirano gostiteljsko miš. Te CL so bile izdelane z namenom, da rešijo težave oz. omejitve, ki jih imajo CDX. Te CL bi ohranile mnoge od primarnih relevantnih značilnosti primarnega človeškega raka (kinetika rasti, histološke značilnosti, obnašanje – invazivnost in potencial zasevanja) in tako omogočile raziskave z večjim pomenom za klinično okolje. Težava teh CL leži v mikrookolju, ki je neprimerno zaradi intrinzičnih razlik med tkivom človeka in miši (npr. mišja maščobna obloga), pomanjkanju imunskih celic in tolerantnih gostiteljev. Slednje je predvsem pomembno pri preizkušanju imunoterapevtikov (25). V literaturi je moč zaslediti raziskave, ki omenjajo možnost uporabe PDX modelov v smislu osebnega, personaliziranega človeškega modela za preizkušanje najbolj primernega terapevtskega režima. Klinično odločanje (dnevi–tedni) je v primerjavi z izdelavo PDX modela (meseči in več) neprimerno hitreje. Posledično je trenutna uporaba teh modelov omejena na kohortne predklinične raziskave. Kljub temu so ti modeli zelo priljubljeni v farmacevtskem okolju (25). Zadnja skupina so s pomočjo genetskega inžinerstva izdelani mišji modeli (GEMMs) (25). Dober pregled le-teh je opravila Kelly Kersten et. al. (50).

Tabela 7: Primerjava med posameznimi *in vivo* modeli.

MODEL	PREDNOSTI	POMANJKLJIVOSTI
Ektopična CDX (človeške tumorske celice, presajene subkutano)	<ul style="list-style-type: none"> - Enostavno, poceni in tehnično manj zahtevno. - Vključene so humane rakaste celice. - Volumen raka je enostavno izmeriti s kaliperji. - Možna resekcija raka. 	<ul style="list-style-type: none"> - Imunokomprimiran gostitelj. - Ni primerno za vse podtipke raka. - Rak raste periferno. - Primerno zgolj za modeliranje napredovale bolezni.
Ortotopična CDX (v žlezi ali maščobni oblogi dojke)	<ul style="list-style-type: none"> - Primerno mikrookolje. - Velikost raka možno izmeriti s pomočjo kaliperja. - Možna resekcija. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tehnično bolj kompleksno kot ektopični modeli. - Imunokomprimiran gostitelj. - Ni primerno za vse podtipke tumorjev. - Primerno zgolj za modeliranje napredovale bolezni.
Metastatski CDX (vnos preko vene v repu ali intrakardialno)	<ul style="list-style-type: none"> - Ponovljiva rakasta rast na specifičnih mestih (kosti, pljuča). 	<ul style="list-style-type: none"> - Ni primarnega raka, posledično ni primerno za raziskavo o začetnih fazah rasti. - Tehnično zahtevno.
PDX	<ul style="list-style-type: none"> - Človeške rakaste celice ali deli raka so presajeni. - Rak obdrži histopatološke značilnosti in genetski profil prvotnega raka. - Možna resekcija. 	<ul style="list-style-type: none"> - Agresivni podtipi so bolj priljubljeni. - Potreben je dostop do svežega človeškega tkiva. - Visoki stroški. - Imunokomprimiran gostitelj. - Mišja stroma sčasoma nadomešča človeško. - Dolgotrajen proces.
SINGENIČNO (mišje tkivo presajeno v po vrsti ujemajočega se gostitelja)	<ul style="list-style-type: none"> - Po navadi hitro-rastoči raki. - Tumo in mikrookolje sta iz iste vrste. - Imunokompetenten gostitelj. - Možna resekcija. - Lahko je metastatski. 	<ul style="list-style-type: none"> - Mišje mikrookolje. - Mesto zasevanja, frekvenca in latenca so zelo variabilni. - Primerno zgolj za modeliranje napredovale bolezni.
Običajni GEMM	<ul style="list-style-type: none"> - Naravno mikrookolje. - Intakten imunski sistem. - Možna modelacija zgodnje in pozne faze bolezni. - Lahko je metastatski. 	<ul style="list-style-type: none"> - Mišje mikrookolje. - Genetske spremembe niso primerljiva s človeško boleznijo. - Pogosta nad-fiziološka genska izraženost, zaradi nekontrolirane integracije transgena. - Pomanjkanje časovnega nadzora. - Ni primerno za testiranje določenih terapij (npr. monokonska protitelesa).
Pogojni GEMM	<ul style="list-style-type: none"> - Naravno mikrookolje. - Ciljanje specifičnih celičnih tipov (npr. ER-/ER+). - Imunski sistem intakten. - Primerno za modeliranje zgodnje in pozne faze raka. - Odraža genetsko heterogenost. - Reprezentativna histopatologija. - Časovno nadzorovana tumorska iniciacija. 	<ul style="list-style-type: none"> - Mišje mikrookolje. - Nizka frekvenca zasevkov, ki so redko primerljive s kliničnimi zasevki. - Obširni programi vzgajanja (velika poraba časa ter stroški). - Nezaželena izraženost/aktivnost v ne-vnetnih tkivih. - Ni primerno za testiranje določenih terapij (npr. monokonska protitelesa).
Humanizirani modeli (vključuje človeške imunske celice, primarne človeške kostne celice ali tkivne vzorce)	<ul style="list-style-type: none"> - Vpletene človeške celice raka in človeško mikrookolje 	<ul style="list-style-type: none"> - Odsotnost standardizacije med laboratoriji z veliko variabilnostjo. - Dolgotrajnost procesa. - Odvisno od dostopa do svežih »normalnih« človeških tkiv ali od uporabe nesmrtnih človeških celičnih linij. - Visoki stroški

Legenda: CDX - ksenograft pridobljen iz celičnih linij; PDX - od bolnikov pridobljen ksenograft; GEMM - s pomočjo genetskega inženiringa izdelan mišji model.

Povzeto po Ingunn Holen et al. (25).



Slika 2: Prikaz razvoja mišjih CL.
Povzeto po Ingunn Holen et al. (25).

3.5 Raziskovalno delo

Z napredkom visoko zmogljive tehnologije (angl. high-throughput technology) na področju molekularne genetike se je količina informacij na različnih področjih genomike, razumevanja mehanizmov transkripcije, translacije in epigenetskih mehanizmov neizmerno povečala in postala dostopna za raziskovanje na področju raka. Ob tem se stremi k integraciji informacij na številnih nivojih z namenom razumevanja glavnih funkcionalnih razlik, ki so odgovorne za heterogenost raka in s tem posledično omogočiti razvoj novih terapevtskih pristopov. V sklopu tega obstajata dva večja trenda; razširitev spektra in števila podtipov, ki so zelo specifični, ob tem pa iskati skupne točke in značilnosti podtipov. Za določanje teh značilnosti so lahko v pomoč raziskave na celičnih linijah. Prav zaradi tega smo se v nalogi osredotočili na gojenje lastne CL, ki bo primerljiva s standardno in dovolj dobre kvalitete za nadaljnje delo v obliki komparativnih testov karakterizacije in viabilnosti v primerjavi s standardno celično linijo RD.

4 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

4.1 Namen

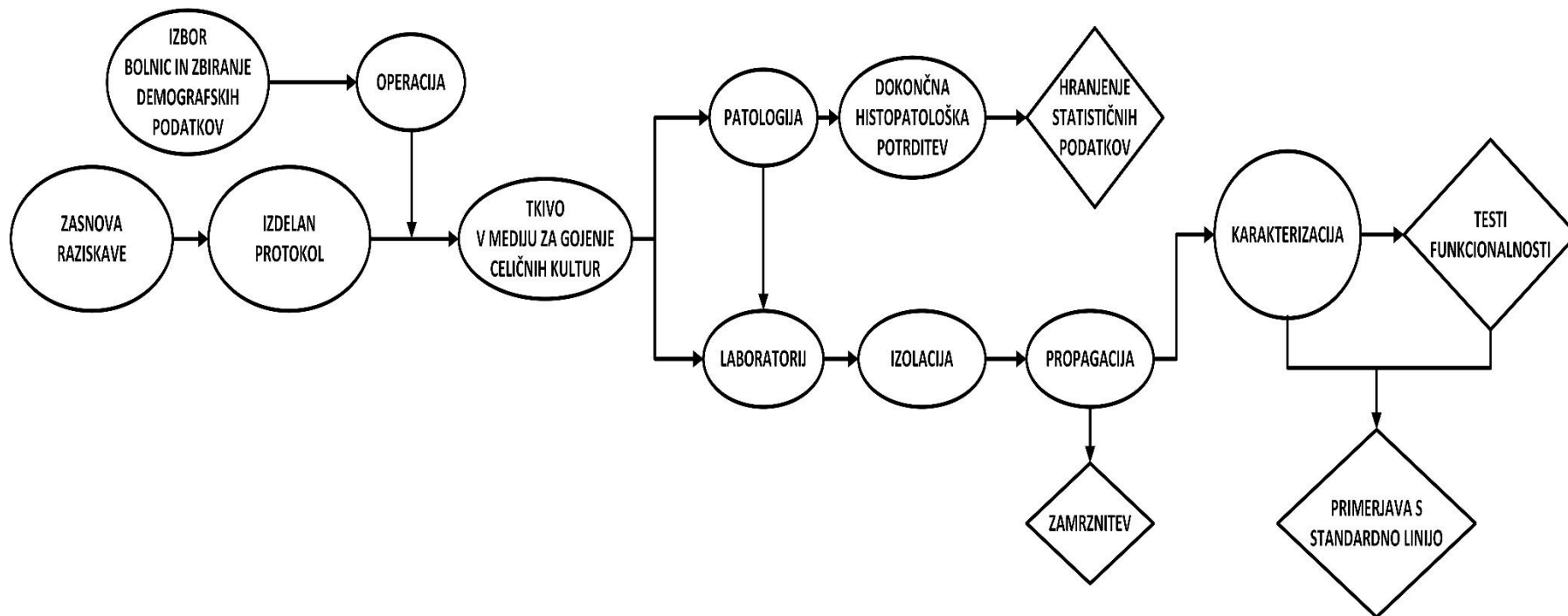
Vzgojiti smo želeli prvo CL TNRD na Medicinski fakulteti univerze v Mariboru (MF UM) in Univerzitetnem kliničnem centru Maribor. Klinični del raziskave je bila načrtovan in izveden v skladu z načeli Helsinške deklaracije o biomedicinskih raziskavah na človeku, določili Konvencije Sveta Evrope o varovanju človekovih pravic in dostojanstva človeškega bitja v zvezi z uporabo biologije in medicine (Oviedske konvencije) ter načel slovenskega Kodeksa medicinske deontologije. Po pridobitvi odobritve etične komisije (priloga A) smo pričeli z laboratorijskim delom. Vsi postopki laboratorijskega dela so bili opravljeni v laboratoriju Inštituta za biomedicinske vede na MF UM. Shematski prikaz delovnega procesa je razviden iz **Slike 3**.

4.2 Hipoteze

1. IZDELAVA PROTOKOLA: Na podlagi pozitivne histopatološke potrditve prisotnosti TNRD po odvzemu tkiva dojk(e), lahko pripravimo učinkovit, enostaven in ponovljiv protokol za izolacijo celic TNRD iz tkivnega vzorca in gojenje obstojne celične linije.

2. GOJENJE CELIČNE LINIJE: Z izbranimi metodami lahko vzgojimo in potrdimo tip celične linije ter skladnost lastnosti celične linije in prvotnega tkiva (izraženost hormonskih receptorjev).

3. PRIMERNOST CELIČNE LINIJE: S primerjavo s standardno linijo raka dojk lahko dokažemo primernost vzgojene celične linije za nadaljnja testiranja oz. pripravo in vitro bolezenskega modela TNRD.



Slika 3: Flow diagram delovnega procesa.

Vir: Lasten.

5 MATERIALI IN METODE

5.1 Materiali

Pri delu v laboratoriju smo uporabljali naslednje kemikalije in topila: Medij za gojenje celičnih kultur Advanced DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), Heat Inactivated Fetal Bovine Serum (Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), L-glutamine (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), penicillin (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), streptomycin (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), fosfatni pufer (PBS) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), tripsin (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in dimethyl sulfoxide DMSO (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Vse uporabljene kemikalije so bile laboratorijske kakovosti, če ni drugače specificirano.

5.1.1 Postopek izolacije

Za izolacijo celic iz tkiva smo uporabili fosfatni pufer, 0,25 % tripsin ter medij Advanced DMEM/F12 z dodatkom 5 % govejega seruma, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina in 10 mg/ml streptomicina.

5.1.2 Postopek gojenja

Za gojenje celic smo uporabljali medij Advanced DMEM/F12 z dodatkom 5 % govejega seruma, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina in 10 mg/ml streptomicina ter 0,25 % tripsin. Celice smo zamrzovali v govejem serumu s 5 % DMSO.

5.2 Metode

5.2.1 Odvzem tkiva in histopatološka analiza

V raziskavi so se uporabili sveži tkivni vzorci pacientk z diagnozo TNRD, ki so bili odvzeti iz svežega preparata po dogovoru z operaterjem in patologom UKC MB. Zaradi skrajšanja hladne ishemije so bili koščki tkivnih vzorcev v najkrajšem možnem času dostavljeni na Oddelek za patologijo UKC Maribor.

V raziskavo so bile vključene pacientke:

- stare med 18 in 100 let,
- obolele za trojno negativnim rakom dojk.

Izključene so bile pacientke:

- stare manj kot 18 in več kot 100 let,
- z zasevki drugih malignomov v dojki.

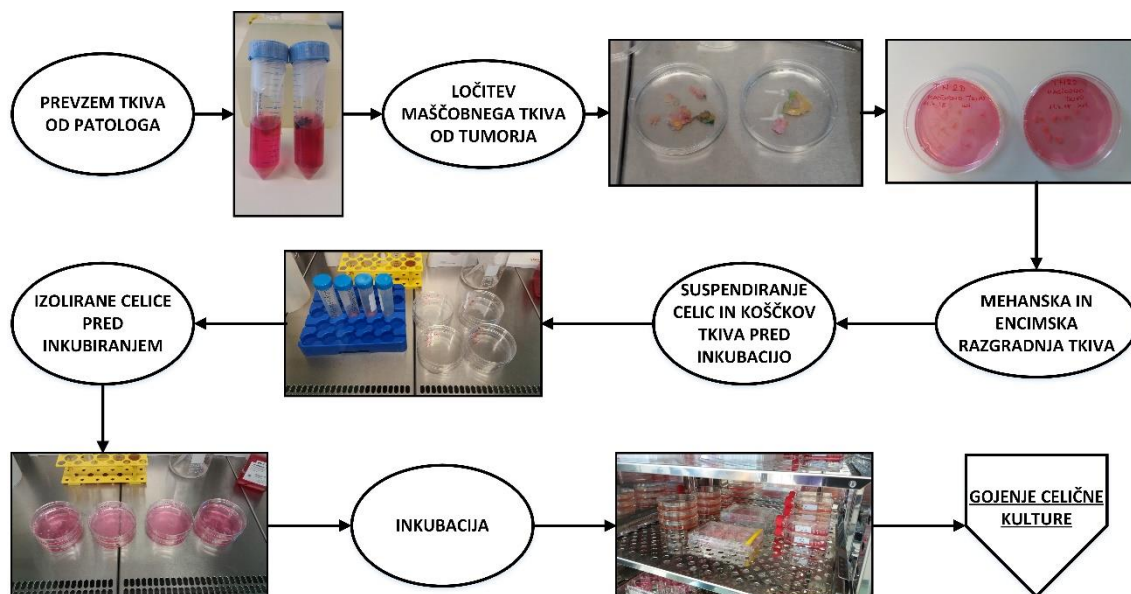
Vzorec tkiva je odvil patolog iz svežega tkivnega vzorca. Vzorec se je zaradi skrajšanja hladne ishemije v najkrajšem možnem času po odvzemu tkivnega vzorca dostavil na Oddelek za patologijo UKC Maribor, poslan v za to posebej označenih vsebnikih. Tkivni vzorci v dogovorjeni velikosti najmanj 3x3x3 mm in največ 5x5x5 mm so se odvzeli le iz tumorjev, večjih od 1 cm (T1c), s čimer ni bila ogrožena histološka diagnostika z določitvijo vseh standardnih prognostičnih in prediktivnih dejavnikov.

Mikroskopski pregled, ki je omogočil vključitev ali izključitev v raziskavo, je opravil specialist patologije. V sklopu pregleda so se opravile standardne histološke analize z določitvijo hormonskega statusa (ER, PR, androgeni receptorji – AR), proliferacijskega indeksa z uporabo Ki67 in HER2 statusa.

5.2.2 Postopek izolacije

Postopek izolacije je potekal v več korakih in je prikazan na **sliki 4**. Po odstranitvi tumorja v operacijski dvorani je operater poslal odstranjen tumor na patologijo. Tam je patolog odvil koščke tkiva iz različnih delov tumorja in jih shranil v medij za gojenje celičnih kultur Advanced DMEM/F12. Zaradi velikega tumorja so bili koščki tkiva dani v dve 50 mL centrifugirki. Celoten postopek je potekal ves čas na hladnem (na ledu).

Tkivo smo po analizi s strani patologa nemudoma prenesli na ledu v laboratorij in pričeli z izolacijo celic. Celoten postopek izolacije je potekal v sterilnem okolju v zaščitni mikrobiološki komori. Koščke tkiva smo prenesli v dve petrijevki in jih 2 x sprali s PBS z dodatkom antibiotikov penicilin in streptomycin. Tkivo smo ponovno prelili s PBS in odstranili odmrle dele in maščobno tkivo. V posebni petrijevki smo pripravili tripsin/EDTA (0,25 %) in vanj odlagali koščke tumorja. Sledila je mehanska obdelava tkiva. S skalpelom smo tkivo narezali na čim manjše koščke (velikosti približno 2 x 2 mm). Tkivo je bilo ves čas prelito s tripsinom, da se ne bi izsušilo. Zatem smo delno razgrajeno tkivo prenesli v inkubator na 37°C, 5 % CO₂.



Slika 4: Shematski prikaz izolacije celic

Vir: Lasten.

Po eni uri inkubacije smo suspenzijo celic prelili z medijem za gojenje celičnih kultur Advanced DMEM/F12 s 5 % FBS in jo razdelili v štiri 50 mL centrifugirke. Sledilo je centrifugiranje na 2500 rpm, 15 minut. Nato smo odlili supernatant, sediment celic pa dvakrat sprali z medijem Advanced DMEM/F12 (2500 rpm, 10 minut). Po zadnjem spiranju smo celice resuspendirali v mediju za gojenje celičnih kultur Advanced DMEM/F12 s 5 % FBS in jih prenesli v osem petrijevke za gojenje celičnih kultur. Celice smo inkubirali v inkubatorju na 37°C, 5 % CO₂.

5.2.3 Postopek gojenja

Postopek izolacije in napredek po dneh je prikazan na **sliki 5**. Tri dni po izolaciji so se celice pričele pritrjati na podlago. Ker je bila večina celic še vedno nepritrjenih, smo celotno suspenzijo celic iz posameznih posodic scentrifugirali na 1400 rpm, 5 minut, ter sedimentu celic dodali svež medij s 5 % FBS in jih vrnili v posodice. Na ta način smo vsak drugi dan menjavali medij, dokler večina celic ni bila adherentnih. Po desetih dneh od izolacije so se različni tipi celic pritrdili na podlago in tako smo vzgajali primarno kulturo. V tej fazi gojenja celic smo del primarne kulture prvič zamrznili. Petrijevko s celicami smo sprali z 2 mL tripsina, dodali 2 mL svežega tripsina in celice inkubirali na 37°C, 5 % CO₂. Po petih minutah so se celice odlepili od podlage. Suspenziji celic v tripsinu smo dodali 8 mL medija Advanced DMEM/F12, jo odpipetirali v 15 mL centrifugirko in scentrifugirali na 1400 rpm, 5 minut. Supernatant smo prelili z 950 µL FBS, dodali 50 µL DMSO in suspenzijo celic prenesli v vialico za zamrzovanje. Tako pripravljene vialice smo dali v posodo Mr. Frosty in celice zamrznili na - 80°C. Po 24-ih urah smo vialice prenesli v tekoči dušik. Del

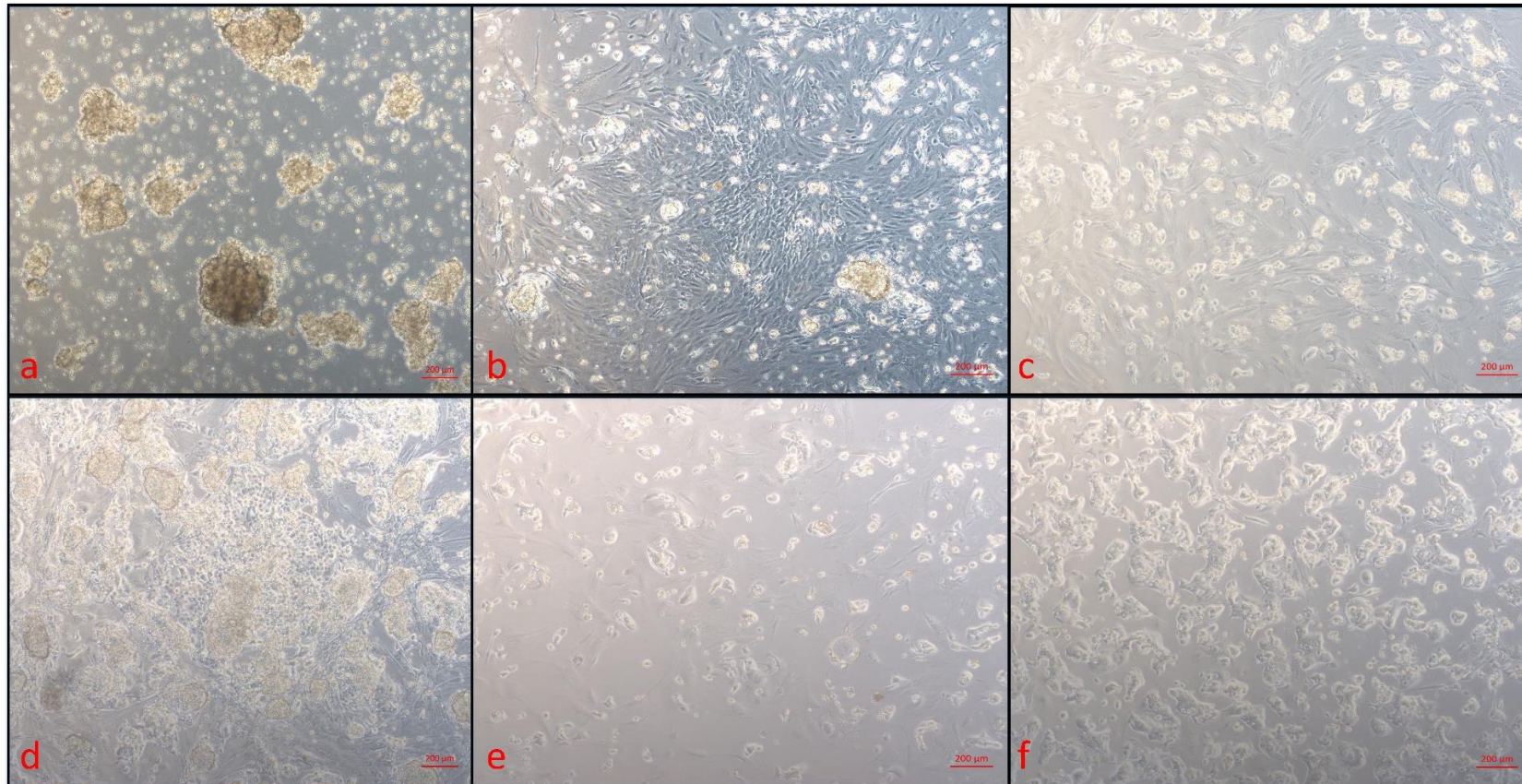
primarne celične kulture smo gojili dalje za namen pridobitve čiste CL TNRD. Iz celične kulture je bilo potrebno odstraniti vse ostale celične tipe (fibroblaste), zato smo razvili dva postopka: 1) celice smo gojili po standardnih postopkih do četrte pasaže in z vsako višjo pasažo ohranili celice v tistih gojilnih posodah, v katerih je spontano prevladal morfološko epitelijski tip celic in 2) po tripsinizaciji primarne kulture smo s pipeto odpipetirali posamezne skupke celic in jih ločeno prenesli v mikrotitrsko ploščico P24. V obeh primerih smo vzgojili celično kulturo TNRD, ki smo jo nadalje karakterizirali z molekularno analizo.

Opis prvega postopka

Petrijevko s primarno celično kulturo smo sprali z 2 mL 0,25 % tripsina. Dodali smo 2 mL 0,25 % tripsina in celice inkubirali na 37°C, 5 % CO₂. Po petih minutah smo suspenziji celic dodali 8 mL medija Advanced DMEM/F12, suspenzijo resuspendirali in jo prenesli v 15 mL centrifugirko. Sledilo je centrifugiranje na 1400 rpm, 5 minut. Supernatant smo odlili, celice pa resuspendirali v 10 mL medija Advanced DMEM/F12. Suspenzijo smo razdelili v dve gojilni posodici T25 (precepljanje 1:2). Vsako posodico smo dopolnili s 4,5 mL medija in 0,5 mL FBS. Celice smo gojili v inkubatorju na 37°C, 5 % CO₂. Tako smo dobili celice prve pasaže. Vsak drugi dan smo zamenjali medij in po sedmih dneh, ko so bile celice 80 % konfluentne, smo jih ponovno tripsinizirali po zgoraj opisanem postopku. Do četrte pasaže je v gojilnih posodah prevladal epitelijski tip celic.

Opis drugega postopka

Petrijevko s primarno celično kulturo smo sprali z 2 mL 0,25 % tripsina. Dodali smo 2 mL 0,25 % tripsina in celice inkubirali na 37°C, 5 % CO₂. Suspenzijo celic smo zamrznili po že opisanem postopku zamrzovanja. V petrijevki preostale skupke celic smo s pipeto ločeno prenesli v vodnjake mikrotitrskeske ploščice P24 (1 skupek na vodnjak). Vodnjakom smo dodali 0,5 mL medija Advanced DMEM/F12 s 5 % FBS in celice inkubirali na 37°C, 5 % CO₂. Po 24-ih urah so se celice pritrdile in čez tri dni smo prvič zamenjali medij. Po dveh tednih smo v dveh vodnjakih opazili homogeno kulturo celic, ki so bile 80 % konfluentne. Po standardnem postopku smo jih tripsinizirali in prenesli v mikrotitrsko ploščico P6. Po desetih dneh smo celice tripsinizirali in jih prenesli v gojilno posodico T25. Celice smo nato razmnožili in jih del zamrznili, del pa karakterizirali.



Slika 5: Postopek gojenja celične linije po dnevih z enotno povečavo: 50x.

Legenda: a) Suspenzija celic TNRD tri dni po izolaciji. b) Primarna kultura celic TNRD. Na sliki so vidni različni tipi celic. c) Mikroskopska slika TNRD, 1.p, 7 dni po tripsinizaciji. Na sliki so vidne rakaste celice in fibroblasti. d) Mikroskopska slika TNRD, 1.p, 17 dni po tripsinizaciji. Na sliki je vidno preraščanje rakastih celic. e) Mikroskopska slika TNRD, 2.p, 4 dni po tripsinizaciji. Na sliki je vidno preraščanje rakastih celic. f) Mikroskopska slika TNRD, 3.p, 4 dni po tripsinizaciji.

Homogena celična kultura.

Vir: Lidija Gradišnik.

6 REZULTATI IN RAZPRAVA

V nadaljevanju bomo predstavili rezultate svojega dela ter jih pokomentirali. Za združitev poglavij »rezultati in razprava« ter za podajanje rezultatov smo se odločili zaradi medsebojne povezanosti posameznih rezultatov, ki tvorijo koherentno celoto. Posledično jih je bolj smiselno razdeliti po vsebini na več sklopov, ki nakazujejo samo strukturo zastavljenega eksperimentalnega dela. Koncept dela je bil sledeči (osnovan tudi na izboru delovnih hipotez):

- **IZDELAVA PROTOKOLA:** Osnovna zamisel je bila izdelava primernega, učinkovitega, enostavnega in ponovljivega protokola za izolacijo celic TNRD iz tkivnega vzorca in gojenje obstojne CL.
- **GOJENJE CELIČNE LINIJE:** Po uspešni pripravi protokola smo z izbranimi metodami želeli izolirati, vzgojiti in potrditi tip CL ter skladnost lastnosti CL in prvotnega tkiva (izraženost hormonskih receptorjev).
- **PRIMERNOST CELIČNE LINIJE:** S primerjavo s standardno linijo RD smo želeli dokazati primernost vzgojene CL za nadaljnja testiranja oz. pripravo in vitro bolezenskega modela TNRD.

Raziskava ne bi bila možna brez primernega tkiva, posledično, v naslednji točki, navajamo anonimizirane rezultate histopatološke analize, ki jo je opravil specialist patologije.

6.1 Odvzem tkiva in histopatološka analiza

Pregledano tkivo je bilo opisano kot Invazivni žlezni karcinom, nespecialni tip, G3 (BRE: tubuli 3 + pleomorfizem jeder 3 + mitoze 3 = 9 točk), z obsežno nekrozo, brez limfovaskularne invazije, brez perinevralne invazije, brez mikrokalcifikacij, slabo zamejen.

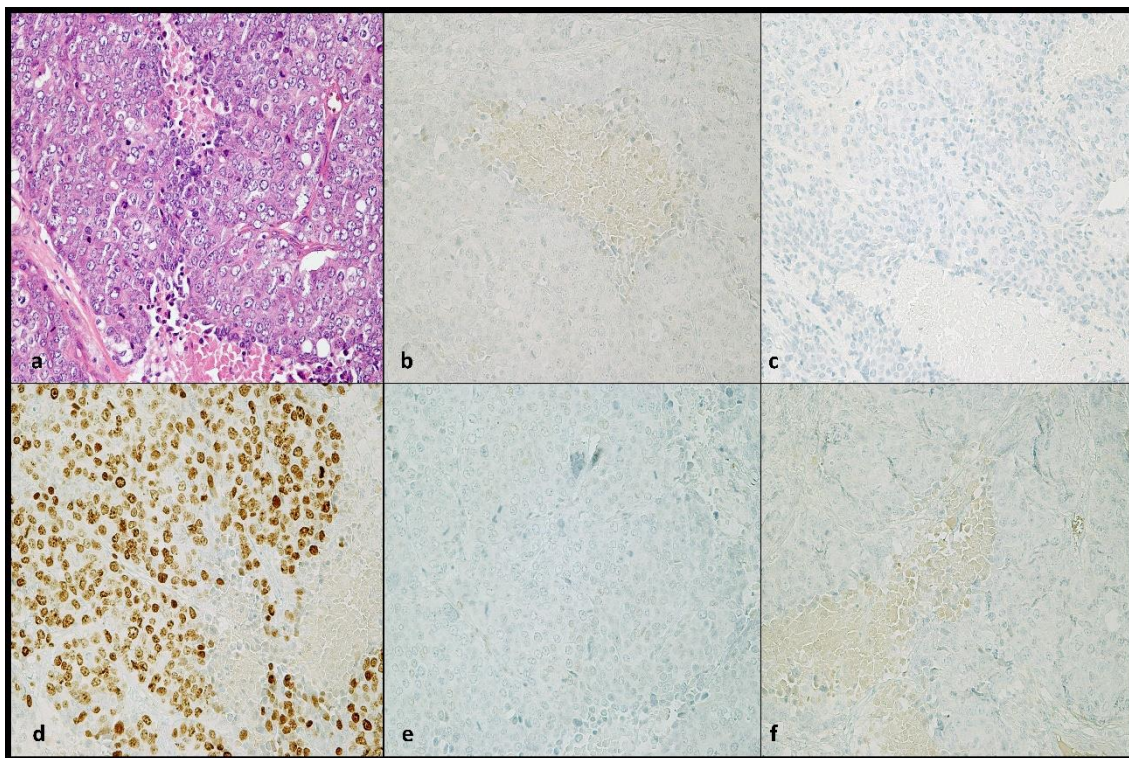
Hormonski status tumorja:

- Estrogenski receptorji so bili negativni.
- Progesteronski receptorji so bili negativni.
- Androgeni receptorji so bili negativni.
- Proliferacijski indeks Ki67 (imonoreaktivne celice) je bil 90% (**slika 5**).

HER2 status tumorja:

- Prekomerna izraženost HER2 onkoproteina je bila negativna.
- HER2 status tumorja je bil negativen (**slika 5**)

Na podlagi pregleda hormonskega in HER2 statusa je bila postavljena diagnoza TNRD z AR negativnimi receptorji oz. četverno-negativni rak dojke (angl. quadruple negative breast cancer).



Slika 6: Prikaz rezultatov histopatološke analize opravljene z on-slide in notranjimi pozitivnimi kontrolami, kjer so bili PR, ER, AR, HER2 statusi negativni.

Legenda: a) hematoksilin in eozin barvanje; povečava: 200x b) določanje PR receptorjev; povečava: 200x c) določanje HER2 statusa; povečava: 200x d) določanje Ki67 proliferacijskega indeksa; povečava: 200x e) določanje AR receptorjev; povečava: 200x f) določanje ER receptorjev; povečava: 200x.

Vir: Rajko Kavalar.

6.2 Postopek izolacije

Pri postopku izolacije celic smo po sekvenčnem centrifugiranju odvzeli sediment celic in ga resuspendirali v posodice za gojenje ter jih inkubirali pri standardnih pogojih. Po treh dneh so se celice začele pritrjati na podlago, po desetih dneh pa so bile praktično vse celice pritrjene. Vmes smo menjavali medij, kakor opisano v Metodah. V posodicah so bile prisotne različne vrste celic. Tako smo vzgajili primarno celično kulturo. Ko so se celice pritrdile na podlago, so dobile svojo značilno obliko. Fibroblasti so bili vretenasti, s številnimi citoplazemskimi podaljški, s podolgovatim jedrom, redke maščobne celice so bile okrogle, z mehurčasto citoplazmo in majhnim jedrom. Celice, za katere smo predvidevali, da so bile rakastega izvora, pa so bile epiteljskega videza, s svetlo citoplazmo, in so rasle v skupkih. Na ta način smo dobili primarno kulturo celic raka dojke. V naslednji fazi smo pri postopku kloniranja, ko smo celice primarne

kulture zelo na redko zasejali v gojilno posodico, iz te mešane kulture celic ločili le rakaste celice in tako dobili čisto CL.

Celice TNRD so imele značilen videz epitelijskih celic. Značilna oblika celic je bila poligonalna do okrogla, s pikčasto, drobno granulirano, mestoma pigmentirano citoplazmo in velikim, centralno ležečim, okroglim in hiperkromatskim jedrom. Ponekod so bili dobro vidni nukleoli. Preden so se celice pritrdile na podlago, so plavale v suspenziji in so bile takrat okrogle. Oblika celic se je spreminjala med pritrditvijo in rastjo od okrogle ali ovalne do poligonalne, kar je bilo značilno za veliko gostoto rasti v konfluentni kulturi. Nekatere celice so imele celične podaljške, psevdopodije, ki so jih dobile med rastjo pri nizki konfluenci in kasneje v konfluentni kulturi niso bili več opazni. Po približno desetih dneh je bila kultura konfluentna. Po precepljanju konfluentnih kultur so se celice TNRD večinoma pritrdile na podlago po štirih do osmih urah.

6.3 Postopek gojenja

Celice TNRD so dobro rasle, znakov okužbe z bakterijami ali glivami nismo opazili. S precepljanjem smo naredili zaloge celičnih kultur za nadaljnjo uporabo. Celice smo zamrznili v tekočem dušiku. Ko smo jih odtalili in ponovno zasejali, so imele dobro preživelost (od 90 % do 95 %). Med rastjo so bile celice relativno enostavne za vzdrževanje in so lepo rasle. Kultura je imela v konfluenci videz epitelijskih celic. Povprečen čas do nastanka konfluentne kulture je bil od 7 do 10 dni. Ko je kultura postala konfluentna, se je rast celic nadaljevala, iz česar smo sklepali, da so celice izgubile lastnosti kontaktne inhibicije, kar pomeni, da so celice prerasle površino posodice v eni plasti in so se kopičile v več plasteh. To je značilno za rakaste linije.

Med gojenjem celic TNRD in njihovo rastjo smo spremljali motnost in barvo medija. Takoj ob nasaditvi celic, ko smo dodali svež celični medij, je bil ta rdečkaste barve zaradi indikatorja fenol rdeče, ki je dodan mediju. Pri pH 7 je medij rdeče barve, kadar postane bazičen, preide v vijolično, v kislem pa v rjavo in rumeno barvo. Med rastjo celice porabljajo hranila iz medija in vanj izločajo svoje produkte, rastne faktorje, hormone. Takrat se pH medija začne nižati in se po nekaj dneh začne spreminjati iz rdečkaste v rjavkasto barvo. To pomeni, da so celice v kulturi porabile vse hranilne snovi in da je potrebno medij zamenjati ali pa celično kulturo precepiti, če je že prerasla vso površino posodice. Celice TNRD so izjemno metabolno aktivne in se barva medija spremeni že po treh dneh, tako da smo v teh časovnih obdobjih tudi medij menjavali. Celice TNRD se na podlago niso čvrsto pritrdile in je bila za dosego konfluentne rasti potrebna

dvakrat večja koncentracija pri nasaditvi. Tudi pri delovanju tripsina je bilo odlepljanje celic zelo hitro. Vse to kaže, da je pritrjanje na podlago pri rakastih celicah slabše in da so te bolj mobilne, kar je tipična značilnost rakastih linij. Med tripsinizacijo so celice izgubile svojo značilno epiteljsko obliko in so postajale vse bolj ovalne ter okrogle. Ko so se odlepile od površine, so bili v suspenziji vidni majhni skupki celic in posamezne okrogle celice.

V času oddaje naloge smo pričeli s karakterizacijskimi postopki, ki po preliminarnih rezultatih, kažejo na veliko verjetnost skladnosti s primarnim tkivom.

7 ZAKLJUČKI

V zaključkih povzemamo glavne ugotovitve v teku raziskave, ki jih je najlažje navesti v obliki alinej:

1. Zasnovali smo primeren, učinkovit, enostaven in ponovljiv protokol za izolacijo celic TNRD iz tkivnega vzorca in gojenje obstojne CL.
2. V našem okolju smo (MF UM, UKC MB) prvi izolirali in vzgojili CL RD.
3. Ob oddaji naloge smo začeli s postopki karakterizacije. Sodeč po preliminarnih rezultatih, se nakazuje veliko verjetnost skladnosti s primarnim tkivom.
4. Za nadaljnje raziskave smo pripravili nabor testov za karakterizacijo kot tudi teste viabilnosti z uporabo citotoksičnih zdravilnih učinkovin ob sočasni komparativni analizi z drugimi CL RD.

7.1 Pogled naprej

Zavedamo se, da je do uporabnih rezultatov, ki bi lahko koristili klinikom, še dolga pot. Kljub temu pa že pridobljeni rezultati potrjujejo pravilno naravnost našega pristopa. Tako tudi že načrtujemo nadaljnje korake v raziskavi v smeri testov viabilnosti s citotoksičnimi zdravili in komparativno analizo z drugimi CL. Naslednji korak bo neizpodbitna potrditev ohranitve lastnosti prvotnega tkiva (molekularno in imunhistokemično), s čimer bomo potrdili, da je izdelani protokol in način dela učinkovit. Drugi korak bodo testi viabilnosti s katerimi bomo lahko testirali protitumorske zdravilne učinkovine. Dodatna testiranja citotoksičnosti bodo komparativno izvedena še na drugih CL RD. Na osnovi opravljenega dela smo že pripravili in oddali slovenski pregledni članek. Smo tudi v fazi priprave izvirnega članka, ki bo poslan v revijo *Radiology and Oncology*. Glede na kvaliteto opravljenega dela ter vzpodbudne dobljene rezultate, smo prepričani, da bo članek objavljen.

8 LITERATURA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
2. Zadnik V, Primic Zakelj M, Lokar K, Jarm K, Ivanus U, Zagar T. Cancer burden in Slovenia with the time trends analysis. *Radiol Oncol*. 2017;51(1):47–55.
3. Dawood S, Broglio K, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Giordano SH. Prognosis of Women With Metastatic Breast Cancer by HER2 Status and Trastuzumab Treatment: An Institutional-Based Review. *J Clin Oncol*. 2010;28(1):92–8.
4. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular Classification and Molecular Forecasting of Breast Cancer: Ready for Clinical Application? *J Clin Oncol*. 2005;23(29):7350–60.
5. Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J Cancer*. 2017;8(16):3131–41.
6. Cope LM, Fackler MJ, Lopez-Bujanda Z, Wolff AC, Visvanathan K, Gray JW, et al. Do Breast Cancer Cell Lines Provide a Relevant Model of the Patient Tumor Methylome? Rameshwar P, editor. *PLoS One*. 2014;9(8):e105545.
7. Chavez KJ, Garimella S V., Lipkowitz S. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. Eng-Wong J, Zujewski JA, editors. *Breast Dis*. 2010;32(1–2):35–48.
8. Klevos GA, Ezuddin NS, Vinyard A, Ghaddar T, Gort T, Almuna A, et al. A Breast Cancer Review: Through the Eyes of the Doctor, Nurse, and Patient. *J Radiol Nurs*. 2017;36(3):158–65.
9. Bateman AC, Shaw EC. Breast pathology. *Surg*. 2016;34(1):1–7.
10. Galea M. Benign breast disorders. *Surg*. 2016;34(1):19–24.
11. Sibbering M, Courtney C-A. Management of breast cancer: basic principles. *Surg*. 2016;34(1):25–31.
12. Dillon D, Guidi A, Schnitt S. Pathology of invasive breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Osborne CK, Morrow M, editors. *Diseases of the Breast*. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 1174.
13. Sinn H-P, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care*. 2013;8(2):149–54.

14. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747–52.
15. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869–74.
16. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8418–23.
17. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736–50.
18. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JGM, et al. Subtypes of Breast Cancer Show Preferential Site of Relapse. *Cancer Res*. 2008;68(9):3108–14.
19. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*. 2015;5(10):2929–43.
20. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26(suppl 5):v8–30.
21. Perhavec A, Gazić B, Vidergar B, Matos E, Žgajnar J, Hertl K, et al. Smernice diagnostike in zdravljenja raka dojke. Janez Žgajnar, editor. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; 2014. 64 p.
22. Critchley AC, Cain HJ. Surgical techniques in breast cancer: an overview. *Surg*. 2016;34(1):32–42.
23. Fajdic J, Djurovic D, Gotovac N, Hrgovic Z. Criteria and Procedures for Breast Conserving Surgery. *Acta Inform Medica*. 2013;21(1):16–9.
24. Hole S, Pedersen AM, Hansen SK, Lundqvist J, Yde CW, Lykkesfeldt AE. New cell culture model for aromatase inhibitor-resistant breast cancer shows sensitivity to fulvestrant treatment and cross-resistance between letrozole and exemestane. *Int J Oncol*. 2015;46(4):1481–90.
25. Holen I, Speirs V, Morrissey B, Blyth K. In vivo models in breast cancer research: progress, challenges and future directions. *Dis Model Mech*. 2017;10(4):359–71.
26. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*. 2011;13(4):215.

27. Greely HT, Cho MK. The Henrietta Lacks legacy grows. *EMBO Rep.* 2013;14(10):849.
28. Lasfargues EY, Ozzello L. Cultivation of human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1958;21(6):1131–47.
29. Amadori D, Bertoni L, Flamigni A, Savini S, De Giovanni C, Casanova S, et al. Establishment and characterization of a new cell line from primary human breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 1993;28(3):251–60.
30. Gazdar AF, Kurvari V, Virmani A, Gollahon L, Sakaguchi M, Westerfield M, et al. Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int J cancer.* 1998;78(6):766–74.
31. Lee A V., Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 Cells--Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2015;107(7):djv073-djv073.
32. International Cell Line Authentication Committee. Naming a Cell Line - ver. 1.6. [Internet]. 2015 [cited 2018 Apr 14]. p. 1. Available from: http://iclac.org/wp-content/uploads/Naming-a-Cell-Line_v1_6.pdf
33. Riaz M, van Jaarsveld MTM, Hollestelle A, Prager-van der Smissen WJC, Heine AAJ, Boersma AWM, et al. miRNA expression profiling of 51 human breast cancer cell lines reveals subtype and driver mutation-specific miRNAs. *Breast Cancer Res.* 2013;15(2):R33–R33.
34. Bertucci F, Borie N, Ginestier C, Groulet A, Charafe-Jauffret E, Adélaïde J, et al. Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. *Oncogene.* 2004;23(14):2564–75.
35. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 2006;10(6):515–27.
36. Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi Y-L, Girard L, Gandhi J, et al. Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery. Blagosklonny M V, editor. *PLoS One.* 2009;4(7):e6146.
37. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F, Finetti P, Adélaïde J, Cervera N, et al. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene.* 2006;25(15):2273–84.
38. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(12):10.1101/cshperspect.a005058 a005058.

39. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer*. 2016;7(10):1281–94.
40. Wang B, Elledge SJ. Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brca1/Brcc36 complex in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(52):20759–63.
41. Lacroix M, Haibe-Kains B, Hennuy B, Laes JF, Lallemand F, Gonze I, et al. Gene regulation by phorbol 12-myristate 13-acetate in MCF-7 and MDA-MB-231, two breast cancer cell lines exhibiting highly different phenotypes. *Oncol Rep*. 2004;12(4):701–7.
42. Hiscox S, Baruha B, Smith C, Bellerby R, Goddard L, Jordan N, et al. Overexpression of CD44 accompanies acquired tamoxifen resistance in MCF7 cells and augments their sensitivity to the stromal factors, heregulin and hyaluronan. *BMC Cancer*. 2012;12:458.
43. Larramendy ML, Lushnikova T, Björkqvist AM, Wistuba II, Virmani AK, Shivapurkar N, et al. Comparative genomic hybridization reveals complex genetic changes in primary breast cancer tumors and their cell lines. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;119(2):132–8.
44. Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene*. 2002;21(35):5462–82.
45. Pickl M, Ries CH. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene*. 2009;28(3):461–8.
46. Fackler MJ, Lopez Bujanda Z, Umbricht C, Teo WW, Cho S, Zhang Z. Novel methylated biomarkers and a robust assay to detect circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. *Cancer Res*. 2014;74.
47. Christgen M, Lehmann U. MDA-MB-435: the questionable use of a melanoma cell line as a model for human breast cancer is ongoing. *Cancer Biol Ther*. 2007;6(9):1355–7.
48. Dvořánková B, Szabo P, Lacina L, Kodet O, Matoušková E, Smetana K. Fibroblasts prepared from different types of malignant tumors stimulate expression of luminal marker keratin 8 in the EM-G3 breast cancer cell line. *Histochem Cell Biol*. 2012;137(5):679–85.
49. Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *Int J Mol Sci*. 2018;19(1):181.
50. Kersten K, de Visser KE, van Miltenburg MH, Jonkers J. Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. *EMBO Mol Med*. 2017;9(2):137–53.

8.1 Odposlani prispevki

Skok K, Maver U, Gradišnik L, Sobočan M, Takač I. Celične linije raka dojke. Zdravniški vestnik.

8.2 Prispevki v pripravi

Skok K, Maver U, Gradišnik L, Potočnik U, Čelešnik HS, Kavalarič R, Sobočan M, Takač I. Isolation and characterisation of a new triple negative breast cancer cell line. Radiology and Oncology.

Clinicopathological characteristics of patients with node negative, triple negative breast cancer: a 10-year follow up. Arko D, Sobočan M, Fokter DN, Čas SN, Skok K, Takač I.

9 ZAHVALA

Za strokovno pomoč, razumevanje in podporo pri izdelavi naloge se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Iztoku Takaču, dr. med. svetnik in doc. dr. Urošu Mavru, mag. farm.

Zahvala gre tudi Lidiji Gradišnik, Marko Milojeviću in Boštjanu Krajncu iz Inštituta za biomedicinske vede MF UM, ki so ključno pomagali pri izvedbi vključenih raziskav v tej nalogi.

Iskreno se zahvaljujem tudi prim. dr. Rajku Kavalariju, dr. med., ki mi je pomagal pri strokovni presoji pripravljenega pregleda o celičnih linijah raka dojk in je tudi soavtor pri angleškem prispevku, ki je v pripravi za revijo *Oncology and Radiology*.

Zahvaljujem se tudi Moniki Sobočan, dr. med. in Damjanu Sisingerju, dr. med. za pomoč pri izvedbi projekta.

10 ENOTE IN OKRAJŠAVE

SEZNAM KRATIC

APC - protein adenomatsne polipoze kolona
AR – androgeni receptor
AXL - tirozin-protein kinazni receptor UFO
BCL – bazalna celična linija
BL – bazalnemu podtipu podoben
BRCA1 - rak dojk 1
BT-20 - CL RD tipa TNRD-A je bila izolirana iz RD 74-letne ženske leta 1958.
CDX - ksenografti pridobljeni iz celičnih linij
CGH – primerjalna genomska hibridizacija
CL - celična linija
DCIS – angl. ductal carcinoma in situ; slo. duktalni intraepitelni karcinom
DIB – debeloigelnja biopsija
EGF – epidermalni rastni faktor
ER – estrogen receptor
ERBB2+ - HER2 ali receptor tirozin-proteinska kinaza erbB-2
ESR1 - estrogenski receptor 1
FASN - sintaza maščobnih kislin
FLNA - filamin alfa
GEMM – s pomočjo genetskega inžineriranja izdelani mišji modeli
GNRH/LNRH – angl. gonadotropin-releasing hormone; slo. gonadotropin sproščujoči hormon
GRB7 - na rastni faktor vezani protein 7
HER 2 – receptor za humani epidermalni rastni faktor 2
HIC1 - protein hipermetiliran pri raku 1
IM – imunomodulator
LAR – luminalni androgeni receptor
LCIS – angl. lobular carcinoma in situ, slo. lobularni intraepitelni karcinom
LCL – luminalna celična linija
MAPK - mitogen-aktivirana proteinska kinaza
MAPK1/3 - mitogen-aktivirana proteinska kinaza 1
MCF-7 –CL RD tipa LA je bila izolirana leta 1970 od 69-letne belke.
MDAMB231 - CL RD tipa TNRD-B je bila izolirana iz adenocarcinoma 51-letne ženske.
MEK – mitogen aktivirana proteinska kinaza kinaza
MiRNA – mikro RNA
MMP2/14 - matriks metalopeptidaza
MSN - moezin
mTOR - tarčno mesto sesalcev za rapamicin
OHKC – oralna hormonska kontracepcija
PDX - od bolnikov pridobljeni ksenografti
PR – progesterone receptor
RB1 - retinoblastomski protein
RD – rak dojk
SNB – angl. sentinel node biopsy; slo. biopsija varovalne bezgavke
T47D - CL tipa LA je bila izolirana iz plevralnega izliva duktalnega karcinoma dojke 54-letne ženske.
TGFB1 - transformirajoči rastni faktor beta-1
TGFB2 - transformirajoči rastni faktor beta-2 prekurzor
TIMP1 - metalopeptidaza inhibitor
TNRD – trojno negativni rak dojk
TNRD-A – TNRD bazalni tip A
TNRD-B – TNRD bazalni tip B
TYK2 - tirozin kinaza 2
VIM - vimentin

11 PRILOGE

A) Odobritev etične komisije



KOMISIJA ZA MEDICINSKO ETIKO

Red. prof. dr. Iztok Takač, dr. med.,
Klinika za ginekologijo in perinatologijo,
UKC Maribor,
Ljubljanska 5, 2000 Maribor

Št. dopisa: UKC-MB-KME-3/18
Datum: 18.2.2018

Spoštovani,

Komisija za medicinsko etiko (KME) UKC Maribor je obravnavala vašo vlogo za etično oceno predloga raziskave z naslovom:

" Razvoj in testiranje celičnih linij z namenom proučevanja trojno negativnega raka dojke "

KME je na seji 14. februarja 2018 ocenila, da je raziskava etično sprejemljiva in vam s tem izdaja soglasje za njeno izvedbo.

Lep pozdrav,

Izr. prof. dr. Milan RELJIČ, dr. med.,
predsednik Komisije za medicinsko etiko UKC Maribor

Milovan