

Flavonoidi u terapiji trostruko negativnog karcinoma dojke

Vićan, Mia Rae

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:798964>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Mia Rae Vićan

**Flavonoidi u terapiji trostruko negativnog
karcinoma dojke**

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Mia Rae Vićan

**Flavonoids in triple negative breast cancer
therapy**

Bachelor thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularne biologije na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Flavonoidi u terapiji trostruko negativnog karcinoma dojke

Mia Rae Vićan

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Među brojnim vrstama karcinoma dojke, trostruko negativni karcinom dojke (TNBC) jedan je od najagresivnijih s najlošijom prognozom. Stanice ovog tipa ne ekspimiraju niti jedan od tri glavna biomarkera (ER, PR i HER2) što značajno otežava liječenje koje se većinom svodi na citotoksičnu kemoterapiju. Flavonoidi, sekundarni biljni metaboliti prisutni u voću, povrću, čaju i vinu, predstavljaju obećavajuću terapijsku opciju za različite bolesti zbog svojih antioksidativnih, protuupalnih i antikancerogenih svojstava. Za mnoge flavonoide poput genisteina, kvercetina, kempferola, apigenina i drugih pokazano je da kod TNBC-a u pretkliničkim ispitivanjima inhibiraju proliferaciju i progresiju staničnog ciklusa, induciraju apoptozu, poboljšavaju antitumorski imunosni odgovor te da suprimiraju migraciju, epitelno-mezenhimalnu tranziciju i angiogenezu. Dostupnost, niska toksičnost i sinergistički učinak koji pokazuju u primjeni s kemoterapijom samo su neke od prednosti flavonoida kao strategije liječenja TNBC-a. Ipak, nužna je provedba većeg broja kliničkih istraživanja kao i daljnjih istraživanja kako bi se razvili odgovarajući ciljani sustavi dostave flavonoida.

Ključne riječi: karcinom dojke, biljni metaboliti, signalni putevi, terapija, ekspresija gena
(31 stranica, 4 slike, 89 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Flavonoids in triple negative breast cancer therapy

Mia Rae Vićan

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Amongst the many types of breast cancer, triple-negative breast cancer (TNBC) is one of the most aggressive, with the worst prognosis. Cells of this type lack the expression of the three main biomarkers (ER, PR and HER2) which significantly complicates treatment, often reducing it to cytotoxic chemotherapy. Flavonoids, secondary plant metabolites found in fruits, vegetables, tea and wine, are a promising therapeutic option for various diseases due to their antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties. Several flavonoids, such as genistein, quercetin, kaempferol, apigenin and others have been shown to inhibit proliferation and cell cycle progression, induce apoptosis, enhance the antitumor immune response and suppress migration, epithelial–mesenchymal transition and angiogenesis of TNBC in preclinical trials. Availability, low toxicity and synergistic effects observed when used in combination with chemotherapeutics are just some of the advantages of flavonoids as a treatment strategy for TNBC. However, the implementation of more clinical studies is necessary as well as further research in order to develop suitable targeted delivery systems for flavonoids.

Keywords: breast carcinoma, plant metabolites, signaling pathways, therapy, gene expression

(31 pages, 4 figures, 89 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Nada Oršolić, PhD

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Klasifikacija raka dojke.....	2
2.1. Histološka klasifikacija karcinoma dojke	2
2.2. Molekularni podtipovi karcinoma dojke.....	3
3. Trostruko negativni karcinom dojke.....	4
3.1. Podtipovi trostruko negativnog karcinoma dojke.....	4
3.2. Strategije liječenja.....	5
4. Flavonoidi.....	7
5. Molekularni učinci flavonoida u liječenju trostruko negativnog karcinoma dojke	8
5.1. Indukcija apoptoze	8
5.2. Inhibicija proliferacije i progresije staničnog ciklusa.....	11
5.3. Inhibicija stanične migracije, invazivnosti i epitelno-mezenhimalne tranzicije	12
5.4. Antiangiogeno djelovanje	14
5.5. Aktivacija antitumorskog imunogenog odgovora.....	15
5.6. Epigenetska regulacija	16
6. Izazovi i ograničenja terapijske primjene flavonoida	18
7. Zaključak	18
8. Literatura.....	20
9. Životopis.....	31

Popis kratica

5-LO – 5-lipoksigenaza (engl. *5-lipoxygenase*)

Ab – protutijelo (engl. *antibody*)

ADC – konjugati protutijelo-lijek (engl. *antibody-drug conjugate*)

Ag – antigen (engl. *antigen*)

AhR – aril hidrokarbonski receptor (engl. *aryl hydrocarbon receptor*)

Akt – protein kinaza B (engl. *protein kinase B*)

Apaf-1 – čimbenik aktivacije apoptotične proteaze 1 (engl. *apoptotic protease activating factor-1*)

Bak – antagonist/ubojica proteina Bcl-2 (engl. *Bcl-2 homologous antagonist/killer*)

Bax – Bcl-2 asociran protein X (engl. *Bcl-2-associated protein*)

Bcl-xL – xL protein B stanica limfoma (engl. *B-cell lymphoma protein-extra Large*)

Bcl-2 – protein B stanica limfoma 2 (engl. *B-cell lymphoma protein 2*)

BH3 – Bcl-2 homologna domena 3 (engl. *Bcl-2 homology domain 3*)

BID – agonist smrti s BH3 interakcijskom domenom (engl. *BH3 interacting-domain death agonist*)

BLT2 – leukotrien B4 receptor 2 (engl. *leukotriene B4 receptor 2*)

BRCA1 – gen karcinoma dojke 1 (engl. *breast cancer gene 1*)

BRCA2 – gen karcinoma dojke 2 (engl. *breast cancer gene 2*)

Dnmt3b – DNA metiltransferaza 3 beta (engl. *DNA methyltransferase 3 beta*)

CDK – ciklin ovisna kinaza (engl. *cyclin-dependent kinase*)

CDK1 – ciklin ovisna kinaza 1 (engl. *cyclin-dependent kinase 1*)

CDK2 – ciklin ovisna kinaza 2 (engl. *cyclin-dependent kinase 2*)

c-MYC – onkogen stanične mijelocitomatoze (engl. *cellular myelocytomatosis oncogene*)

CTLA-4 – citotoksični T limfocitni antigen 4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*)

DISC – signalni kompleks koji inducira smrt (engl. *death inducing signaling complex*)

EGFR – receptor epidermalnog čimbenika rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

EMT – epitelno-mezenhimalna tranzicija (engl. *epithelial-mesenchymal transition*)

ER – receptor estrogena (engl. *estrogen receptor*)

ER α – receptor estrogena α (engl. *estrogen receptor α*)

ERK – protein kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinases*)

ERK5 – protein kinaza 5 regulirana izvanstaničnim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinase 5*)

FADD – protein povezan s Fas preko domene smrti (engl. *Fas-associated via death domain*)

FAK – kinaza fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinase*)

FasL – ligand prvog apoptoznog signala (engl. *first apoptosis signal ligand*)

FGF – čimbenik rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*)

FGFR1 – receptor 1 čimbenika rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor receptor 1*)

FOXO – forkhead box O transkripcijski čimbenici (engl. *forkhead box O*)

FoxO3a – forkhead box O3 transkripcijski čimbenici (engl. *forkhead box O3*)

GLI1 – homolog onkogene 1 povezan s gliomom (engl. *glioma-associated oncogene homolog 1*)

GLUT1 – prijenosnik glukoze 1 (engl. *glucose transporter*)

GLUT4 – prijenosnik glukoze 4 (engl. *glucose transporter*)

GSK-3 β – kinaza glikogen sintaze 3 beta (engl. *glycogen synthase kinase 3 beta*)

Hdac2 – histon deacetilaza 2 (engl. *histone deacetylase 2*)

HER2 – receptor humanog epidermalnog čimbenika rasta (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*)

HIF-1 α – hipoksijom inducirani čimbenik-1 α (engl. *hypoxia-inducible factor-1*)

Hsp – protein toplinskog šoka (engl. *heat shock protein*)

hTERT – ljudska reverzna transkriptaza telomeraze (engl. *human telomerase reverse transcriptase*)

IAP – protein inhibitor apoptoze (engl. *inhibitor of apoptosis protein*)

IAP2 – protein inhibitor apoptoze 2 (engl. *inhibitor of apoptosis protein 2*)

IFN- β – interferon β (engl. *interferon β*)

IFN- γ – interferon γ (engl. *interferon γ*)

IL-2 – interleukin 2 (engl. *interleukin 2*)

IL-6 – interleukin 6 (engl. *interleukin 6*)

IL-8 – interleukin 8 (engl. *interleukin 8*)

JAK1 – Janus kinaza 1 (engl. *Janus kinase 1*)

JAK2 – Janus kinaza 2 (engl. *Janus kinase 2*)

JNK – c-Jun N-terminalna kinaza (engl. *c-Jun N-terminal kinase*)

LTB4 – leukotrien B4 (engl. *leukotriene B4*)

MAPK –mitogenom aktivirane protein kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinases*)

MEK5 – mitogenom aktivirana kinaza protein kinaze 5 (engl. *mitogen-activated protein kinase 5*)

MHC – glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*)

MMP – matriks metaloproteinaze (engl. *matrix metalloproteinases*)

MMP-2 – matriks metaloproteinaza 2 (engl. *matrix metalloproteinase 2*)

MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9 (engl. *matrix metalloproteinase 9*)

mTOR – mehanistička meta rapamicina (engl. *mechanistic target of rapamycin*)

MyD88 – primaran odgovor mijeloidne diferencijacije 88 (engl. *myeloid differentiation primary response 88*)

NF- κ B – jezgreni čimbenik pojačivač-kapa-lakihlanaca aktiviranih B stanica (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NK – prirodne stanice ubojice (engl. *natural killer cell*)

Notch – protein homolog neurogenog lokusa notch (engl. *neurogenic locus notch homolog protein*)

Notch-1 – protein homolog neurogenog lokusa notch 1 (engl. *neurogenic locus notch homolog protein 1*)

p53 – tumorski protein 53 (engl. *tumor protein 53*)

PAK4 – p21 aktivirana kinaza 4 (engl. *p21-activated kinase 4*)

PARP – poli (ADP-ribozil) polimeraza (engl. *poly (ADP-ribose) polymerase*)

PD-1 – protein programirane stanične smrti 1 (engl. *programmed cell death protein 1*)

PD-L1 – ligand programirane stanične smrti 1 (engl. *programmed cell death ligand 1*)

PI3K – fosfoinozimid 3-kinaza (engl. *phosphoinositide 3-kinase*)

PIP3 – fosfatidilinozitol (3,4,5)-trisfosfat (engl. *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*)

PR – receptor progesterona (engl. *progesterone receptor*)

PTCH1 – patched homolog 1 (engl. *patched homolog 1*)

PTEN – homolog fosfataze i tenzina (engl. *phosphatase and tensin homolog*)

ROS – reaktivni kisikovi oblici (engl. *reactive oxygen species*)

SMAC – drugi mitohondrijski izveden aktivator kaspaza (engl. *second mitochondria-derived activator of caspases*)

SIRT6 – sirtuin 6 (engl. *sirtuin 6*)

SMO – smoothed protein (engl. *smoothed protein*)

STAT1 - transduktor signala i aktivator transkripcije 1 (engl. *signal transducer and activator of transcription 1*)

STAT3 – transduktor signala i aktivator transkripcije 3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*)

tBID – skraćeni BID (engl. *truncated BID*)

TCR – T-stanični receptor (engl. *T-cell receptor*)

Tet3 – deset-jedanaest translokacijska metilcitozin dioksigenaza 3 (engl. *ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 3*)

TGF- α – transformirajući čimbenik rasta alfa (engl. *transforming growth factor alfa*)

TGF- β – transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*)

Th1 – pomoćničke stanice T tipa 1 (engl. *T helper cell type 1*)

Th2 – pomoćničke stanice T tipa 2 (engl. *T helper cell type 2*)

TLR4 – receptori slični Toll-u (engl. *Toll-like receptor 4*)

TNBC – trostruko negativni karcinom dojke (engl. *triple-negative breast cancer*)

TNF – čimbenik nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)

TP53 – gen tumorskog proteina 53 (engl. *tumor protein 53 gene*)

TRADD – protein povezan s receptorom čimbenika nekroze tumora 1 preko domene smrti (engl. *TNF receptor 1-associated via death domain*)

TRAIL – ligand koji inducira apoptozu povezanu s čimbenikom nekroze tumora (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*)

VEGF – čimbenika rasta krvožilnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor receptor*)

1. Uvod

Karcinogeneza obuhvaća složeni proces genetskih i epigenetskih promjena uslijed kojih stanice izbjegavaju regulirane programe stanične proliferacije i transformiraju se u tumorske. Izbjegavanje apoptoze, neograničen kapacitet dioba, pojačana angiogeneza, otpornost na djelovanje supresora rasta, indukcija vlastitih signala rasta i sposobnost metastaziranja glavni su mehanizmi koji dovode do nastanka i progresije patoloških promjena koje rezultiraju pojavom raka (Hanahan i Weinberg, 2000). Genetske predispozicije, okolišni čimbenici kao i stil života su komponente koje utječu na pojavu karcinogeneze (Łukasiewicz i sur., 2021). Tumorske stanice se nekontrolirano dijele i dovode do nastanka abnormalnih tkivnih staničnih masa koje se nazivaju tumorima. Tumori se općenito dijele na benigne (dobroćudne) i maligne (zloćudne) tumore. Benigni tumori sporo rastu, ne prolaze kroz bazalne membrane te se ne šire na okolna tkiva niti u druge dijelove tijela (Park i sur., 2022). S druge strane, stanice malignih tumora nekontrolirano proliferiraju, prolaze kroz bazalne membrane i infiltriraju okolno tkivo čime je otežano njihovo kirurško uklanjanje (Li i sur., 2022). Mogu i metastazirati, odnosno širiti se u druge dijelove tijela putem krvotoka ili limfnog sustava (Adinew i sur., 2021).

Rak dojke čini skup molekularno raznolikih zloćudnih bolesti koje potječu od stanica dojke. Ovaj oblik raka je najčešće dijagnosticiran rak među ženama i drugi po redu najčešći uzrok smrti vezan uz rak u svijetu (Sung i sur., 2021). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, 2022. godine je rak dojke dijagnosticiran 2,3 milijuna žena te je globalno zabilježeno 670 000 smrtnih slučajeva (World Health Organization, 2024). Iako velik dio slučajeva ne završava smrću, operacije i liječenje mogu značajno umanjiti kvalitetu života. Većina žena koja razvije rak dojke u državama višeg prihoda će preživjeti dok suprotno vrijedi za većinu žena u državama srednjeg i nižeg prihoda (Ginsburg i sur., 2017). Preventivno ponašanje kao i provođenje programa probira neki su od načina kako se mogu potencijalno smanjiti stope pojavnosti raka dojke i povećati provedbu ranog liječenja (Łukasiewicz i sur., 2021).

Pokazano je kako se 5 - 10% slučajeva raka dojke može pripisati genetskim mutacijama i obiteljskoj povijesti bolesti dok 20 - 30% čimbenicima koji se ponašanjem mogu mijenjati (Sun i sur., 2017). Značajan faktor rizika razvoja raka dojke je spol s obzirom da se manje od 1% svih dijagnosticiranih rakova dojke javlja kod muškaraca (Jemal i sur., 2009). Starenje neizbježno povećava šanse razvoja ove bolesti pa se tako rak dojke u oko 80% slučajeva javlja kod pojedinaca

starijih od 50 godina (Benz, 2008). Uočena je i korelacija između određenih molekularnih tipova raka dojke i dobnih skupina – agresivni trostruko negativni tip najčešći je kod pacijenata mlađih od 40 godina dok je luminalni A tip najčešći kod onih starijih od 70 godina (McGuire i sur., 2015). Dijagnoza raka dojke kod bliskih članova obitelji, gušće tkivo dojke, kasna menopauza, pretilost žena u postmenopauzi, rana menarha, kasna dob prve trudnoće, prekomjerna konzumacija alkohola i pušenje su čimbenici koji povećavaju rizik od oboljenja (Łukasiewicz i sur., 2021; Obeagu i Obeagu, 2024).

Nekoliko genetskih mutacija dovodi se u vezu s povećanim rizikom razvoja raka dojke, a među njima su najznačajnije mutacije *BRCA1* i *BRCA2*. Mutacije u ovim genima nasljeđuju se autosomno dominantnim nasljeđivanjem ili se mogu javljati *de novo* (Łukasiewicz i sur., 2021). Oba gena kodiraju tumor supresorske proteine koji sudjeluju u popravku DNA homolognom rekombinacijom i kontroli staničnog ciklusa (Sun i sur., 2017). U stanicama s nefunkcionalnim *BRCA1* i *BRCA2* popravak dvolančanih lomova odvija se drugim mehanizmima koji su skloni greškama, primjerice nehomolognim spajanjem krajeva. Njihove stanice kćeri stoga mogu akumulirati kromosomske rearanžmane koji u nekim slučajevima mogu rezultirati pojavom stanične linije sa sposobnošću proliferacije i metastaziranja (Narod i Foulkes, 2004). Žene s mutacijama u *BRCA1* ili *BRCA2* genima u prosjeku imaju oko 70% šanse razviti rak dojke do 80. godine života te veću vjerojatnost oboljenja u mlađoj životnoj dobi (Feng i sur., 2018).

2. Klasifikacija raka dojke

2.1. Histološka klasifikacija karcinoma dojke

Ovisno o podrijetlu stanica, rak dojke može se podijeliti na karcinome i sarkome. Karcinom je najčešći oblik raka dojke koji nastaje iz promijenjenih epitelnih stanica dok je sarkom značajno rjeđi oblik koji nastaje iz stromalnih komponenti dojke poput miofibroblasta i krvnih žila (Feng i sur., 2018). Karcinomi se dijele ovisno o točnom području nastanka i invazivnosti. U mliječnim kanalićima dojke javljaju se duktalni karcinomi, a lobularni karcinomi u nakupinama mliječnih žlijezda, lobulima (Obeagu i Obeagu, 2024). Ova dva tipa karcinoma mogu biti *in situ* ili invazivni karcinomi. Kada je karcinom prisutan u području gdje je prvotno i nastao, ne širi se na susjedna tkiva te nema metastatskog potencijala kategorizira se kao *in situ* (Cserni, 2020).

2.2. Molekularni podtipovi karcinoma dojke

Unatoč zajedničkom tkivnom porijeklu, karcinom dojke obuhvaća vrlo heterogenu i fenotipski raznoliku skupinu tumora. Molekularna determinacija podtipova karcinoma dojke bila je ključna za razvoj odgovarajućih ciljanih terapija i metoda liječenja s obzirom da same histološke karakteristike tumora ne mogu biti mete liječenja (Kumar i Aggarwal, 2016). Jedno od prvih takvih istraživanja proveli su Perou i sur. (2000) koji su proučavali razlike u ekspresiji gena među pacijentima s karcinomom dojke i podijelili ga na 4 podtipa: luminalni (prema engl. *luminal*), HER2 obogaćeni (prema engl. *HER2-enriched*), podtip bazalnog karaktera (prema engl. *basal-like*) i podtip normalnog karaktera (prema engl. *normal-like*). Luminalni podtip je naknadno podijeljen na luminalni tip A i luminalni tip B (Sørli i sur., 2001) dok neke kasnije analize izostavljaju podtip normalnog karaktera smatrajući da je prijašnja klasifikacija rezultat kontaminacije uzoraka zdravim mliječnim žlijezdama (Fan i sur., 2006). Danas je ustaljena podjela na 5 molekularnih podtipova s obzirom na profil ekspresije gena: luminalni A, luminalni B, HER2 obogaćeni, podtip bazalnog karaktera i podtip s niskim sadržajem kladina (prema engl. *claudin-low*) koji je otkriven 2007. godine (Herschkowitz i sur., 2007; The Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Stanice luminalnog podtipa karcinoma dojke imaju profile ekspresije koji podsjećaju na stanice luminalnog epitela koji oblaže mliječne kanaliće te ekspimiraju hormonske receptore ER i PR zbog čega njihovo liječenje najčešće uključuje hormonsku terapiju u kombinaciji s kemoterapijom (Łukasiewicz i sur., 2021). HER2 obogaćeni podtip karakterizira nedostatak ER i PR ekspresije, prekomjerna ekspresija receptorske tirozin kinaze HER2 i niska ekspresija gena tipičnih za luminalni i bazalni epitel (Łukasiewicz i sur., 2021). Ovaj podtip se liječi terapijama usmjerenim na receptor HER2 koji pokreće brojne signalne kaskade vezane za karcinogenezu dojke (Feng i sur., 2018). Stanice podtipa bazalnog karaktera pokazuju značajnu sličnost u ekspresiji gena sa stanicama bazalnog mioepitela dojke (Perou i sur., 2000). Većina karcinoma bazalnog karaktera su trostruko negativni karcinomi odnosno, ne ekspimiraju ER, PR niti HER2 zbog čega nisu podložni specifičnim ciljanim terapijama već se u njihovom liječenju uglavnom primjenjuje kemoterapija (Dai i sur., 2015). Podtip s niskim sadržajem kladina karakterizira niska ekspresija gena uključenih u staničnu adheziju i visoka ekspresija gena epitelno-mezenhimalne tranzicije te je većina karcinoma ovog podtipa također trostruko negativna (Prat i sur., 2010). Unatoč molekularnoj kompleksnosti i raznolikosti karcinoma dojke, u kliničkoj praksi se učestalije koristi imunofenotipska podjela koja se temelji na detekciji hormonskih receptora i prekomjerne

ekspresije HER2 kako bi se odabrala prikladna terapija (Bianchini i sur., 2016). Karcinomi se tada klasificiraju na ER i PR pozitivne, HER2 pozitivne i trostruke negativne.

3. Trostruko negativni karcinom dojke

TNBC obuhvaća heterogenu skupinu karcinoma dojke koji ne ekspimiraju ER i PR niti pokazuju prekomjernu ekspresiju HER2 (Lehmann i sur., 2011). U ovu skupinu spadaju najagresivniji karcinomi dojke koji imaju jedinstvene molekularne profile, visoke stope proliferacije, lošije prognoze, rane recidive i visoke metastatske potencijale (Pastena i sur., 2024). Ova skupina čini 15 - 20% svih dijagnosticiranih karcinoma dojke sa stopom smrtnosti od oko 40% unutar prvih pet godina od dijagnoze (Yin i sur., 2020). Metastaze se kod većine pacijenata javljaju tijekom prve tri godine od dijagnoze, a pacijenti kod kojih se nije javio recidiv tijekom tog perioda pokazuju slične stope preživljenja kao ER pozitivni karcinomi dojke (Lehmann i sur., 2016). TNBC se češće javlja kod žena mlađih od 40 godina i kod afroameričke populacije (Yin i sur., 2020). Mutacije *BRCA1* gena povećavaju rizik razvoja TNBC-a te je 60 – 80% karcinoma dojke kod pacijenata s takvim mutacijama TNBC fenotipa (Kumar i Aggarwal, 2015).

3.1. Podtipovi trostruko negativnog karcinoma dojke

Lehmann i sur. (2011) podijelili su TNBC na šest podtipova: bazalnog karaktera 1 (prema engl. *basal-like 1*), bazalnog karaktera 2 (prema engl. *basal-like 2*), mezenhimalni (prema engl. *mesenchymal*), mezenhimalni podtip matičnog karaktera (prema engl. *mesenchymal stem-like*), imunomodulatorni (prema engl. *immunomodulatory*) i luminalni androgeni receptorski podtip (prema engl. *luminal androgen receptor*). Karcinom podtipa bazalnog karaktera 1 ima visoku ekspresiju gena vezanih za regulaciju staničnog ciklusa i popravak DNA, a podtip bazalnog karaktera 2 pokazuje abnormalnu aktivaciju signalnih puteva koji su posredovani čimbenicima rasta (Yin i sur., 2020). Mezenhimalni i mezenhimalni podtip matičnog karaktera pokazuju povišenu ekspresiju gena epitelno-mezenhimalne tranzicije, izvanstaničnih receptorskih interakcija i stanične diferencijacije, međutim, mezenhimalni podtip matičnog karaktera ima i nisku ekspresiju kludina i gena stanične proliferacije (Lehmann i sur., 2015; Dass i sur., 2021). Imunomodulatorni podtip proliferira putem signalizacije citokinima i imunosnim stanicama te ga karakteriziraju promjene u imunosnim odgovorima vezanima za Th1, Th2 i NK (Newton i sur., 2022). Luminalni

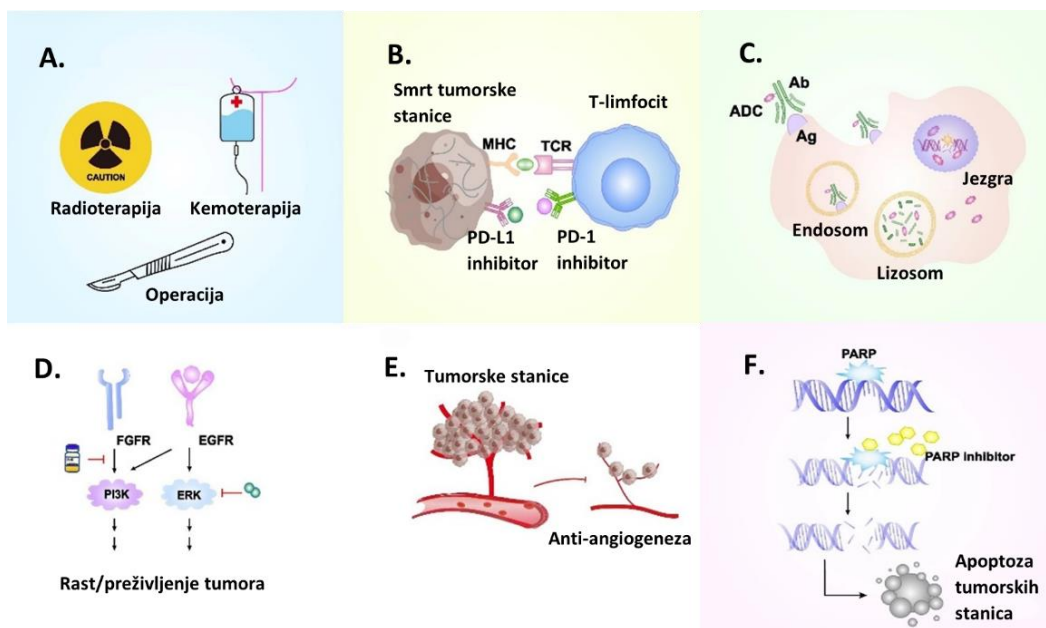
androgeni receptorski podtip je jedinstven podtip koji ima visoku ekspresiju androgenskog receptora te za razliku od ostalih podtipova pokazuje jaku aktivaciju hormonskih signalnih puteva poput sinteze steroida i metabolizma porfirina, androgena i estrogena (Yin i sur., 2020). Lehmann i sur. (2016) naknadno su ipak redefinirali podjelu TNBC-a na podtipove bazalnog karaktera 1, bazalnog karaktera 2, mezenhimalni i luminalni androgeni receptorski podtip kada su otkrili da su detektiranim transkriptima u prije opisanim imunomodulatornom i mezenhimalnom podtipu matičnog karaktera pridonijeli tumor infiltrirajući limfociti. Kasnija istraživanja su također potvrdila 4 podtipa TNBC-a (Burstein i sur., 2015) te su Liu i sur. (2016) uzimajući u obzir mRNA i lncRNA ekspresiju uveli podjelu na 4 podtipa: imunomodulatorni, luminalni androgeni receptorski podtip, podtip mezenhimalnog karaktera (prema engl. *mesenchymal-like*) i imunosuprimiran podtip bazalnog karaktera (prema engl. *basal-like and immune suppressed*). Kod podtipa mezenhimalnog karaktera su pojačani signalni putevi čimbenika rasta, interakcije izvanstaničnog matriksa i receptora, a slabo su eksprimirani geni stanične proliferacije dok imunosuprimiran podtip bazalnog karaktera karakterizira visoka ekspresija gena replikacije i popravka DNA te niska aktivnost imunskog odgovora (Liu i sur., 2016).

3.2. Strategije liječenja

Lošija prognoza i ograničen izbor terapija za liječenje TNBC-a proizlazi iz njegove agresivne prirode, nedostatnog znanja o biomarkerima i nemogućnosti primjene hormonskih i konvencionalnih molekularno ciljanih terapija koje se primjenjuju kod drugih podtipova karcinoma dojke. Glavni pristup liječenju TNBC-a stoga i dalje obuhvaća citotoksičnu kemoterapiju koja uključuje primjenu taksana, antraciklina ili kemoterapeutika na bazi platine (Zhang i sur., 2023). Kemoterapija se često koristi u kombinaciji s operativnim zahvatima (Slika 1A.) te oko 30 – 40% pacijenata u ranim stadijima TNBC-a nakon neoadjuvantne kemoterapije postižu potpuni nestanak invazivnog karcinoma (von Minckwitz i sur., 2012). Imunoterapija je obećavajuća strategija liječenja TNBC-a u kojoj su se inhibitori imunskih kontrolnih točaka pokazali vrlo uspješnim (Zhang i sur., 2023). Kada se PD-L1 karcinomske stanice veže za PD-1 koji je eksprimiran na površini tumor infiltrirajućih limfocita dolazi do inhibicije citotoksične aktivnosti T-limfocita te stanice karcinoma na taj način uspješno izbjegavaju imunski sustav (Sun i sur., 2018). Pacijenti s TNBC-om često pokazuju višu ekspresiju PD-L1 i prisutnost tumor infiltrirajućih limfocita u odnosu na druge oblike karcinoma dojke (Oualla i sur., 2020) te se kod njih djelovanjem inhibitora imunskih kontrolnih točaka poput inhibitora PD-1 ili PD-L1 može značajno poboljšati

citotoksičnost i proliferacija limfocita (Slika 1B.). Posljednjih godina su u razvoju konjugati protutijelo-lijek koji visokom specifičnošću pomoću monoklonskih protutijela dostavljaju citotoksične lijekove stanicama karcinoma (Slika 1C.) (Zhu i sur., 2023). Još jedna strategija liječenja obuhvaća primjenu inhibitora različitih signalnih puteva čija jaka aktivacija inače pridonosi karcinogenezi (Slika 1D.). Kod TNBC-a su prekomjerno eksprimirane brojne receptorske tirozin kinaze poput EGFR i FGFR1 čijom se aktivacijom pokreću razne kaskade poput PI3K/Akt/mTOR, MAPK/ERK, Wnt/ β -katenin i Notch signalnih puteva koji mogu dovesti do preživljenja i proliferacije stanica karcinoma (Newton i sur., 2022). Za održanje TNBC-a ključno je i kontinuirano stvaranje tumorskih krvnih žila u čemu posreduje VEGF, česta meta ciljnih terapija (Slika 1E.) (Zhu i sur., 2023). Još jedna česta terapijska meta je multifunkcionalan enzim PARP koji sudjeluje u popravku jednolančanih lomova DNA, a čijom inhibicijom dolazi do nakupljanja oštećenja DNA i smrti stanica karcinoma (Slika 1F.) (Zhang i sur., 2023). Inhibitori PARP-a pokazali su se učinkovitijima kod tretmana karcinoma dojke s mutacijama u *BRCA1/BRCA2* genima (Newton i sur., 2022).

Pojava rezistencije na kemoterapiju, radioterapiju, imunoterapiju i druge biološke spojeve značajno pridonosi lošijoj prognozi TNBC-a i njegovom nedovoljno učinkovitom liječenju (Arzi i sur., 2022). S navedenim terapijama asociraju se i brojne nepoželjne nuspojave zbog čega su u tijeku brojna istraživanja s ciljem razvoja učinkovitijih i manje toksičnih terapija. Molekule biljnog porijekla koristile su se kroz čitavu povijest u liječenju i prevenciji različitih bolesti stoga ne čudi da predstavljaju i područje značajnih istraživanja potencijalnih terapija za TNBC.

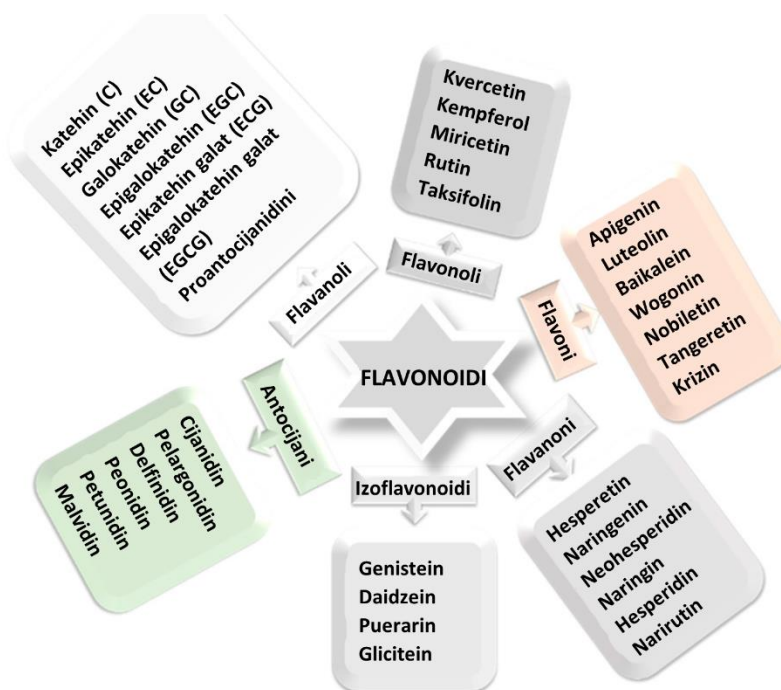


Slika 1. Strategije liječenja TNBC-a. A. Radioterapija, kemoterapija i operacija; B. Inhibitori imunskih kontrolnih točaka; C. Konjugati protutijelo-lijek (ADC); D. Inhibitori signalnih puteva; E. Inhibitori VEGF-a; F. Inhibitori PARP-a (preuzeto i prilagođeno prema Zhu i sur., 2023).

4. Flavonoidi

Flavonoidi su velika skupina sekundarnih biljnih metabolita s polifenolnom strukturom koji zbog svojih povoljnih biokemijskih i antioksidativnih učinaka imaju široku primjenu u različitim farmaceutskim, medicinskim i kozmetičkim proizvodima (Panche i sur., 2016). Glavni izvori flavonoida su voće i povrće poput šljiva, jabuka, trešanja, bobičastog voća, špinata, luka i maslina te čajevi i vina (Kopustinskiene i sur., 2020). Kod biljaka imaju uloge u zaštiti od različitih biotičkih i abiotičkih stresova, detoksifikaciji, alelopatiji, rastu i razvoju kao i uloge signalnih molekula i pigmenata (Liu i sur., 2021). S druge strane, flavonoidi su se pokazali obećavajućom terapijskom opcijom za različite bolesti uključujući i karcinom dojke zbog svojih antioksidativnih, protuupalnih i antikancerogenih svojstava te sposobnosti modulacije aktivnosti različitih staničnih enzima (Adinew i sur., 2021). Pokazano je da flavonoidi utječu na rast, proliferaciju, diferencijaciju, angiogenezu i invazivnost karcinoma tako što moduliraju stanični ciklus i stanične signalne puteve te induciraju apoptozu i autofagiju (Kopustinskiene i sur., 2020). Štoviše, flavonoidi imaju i potencijal poboljšanja učinkovitosti kemoterapije kao i smanjenja njezine toksičnosti u komplementarnoj primjeni (Adinew i sur., 2021). Sva navedena svojstva čine flavonoide vrlo privlačnom potencijalnom strategijom liječenja TNBC-a.

Osnovnu okosnicu svih flavonoida čini fenilpropanoidni lanac koji tvori dva aromatska prstena međusobno povezana heterocikličkim piranskim prstenom (Kopustinskiene i sur., 2020). S obzirom na kemijsku strukturu, stupanj oksidacije i zasićenost lanaca, flavonoidi se mogu podijeliti na šest glavnih skupina: flavonoli, flavanoni, izoflavonoidi, flavanoli, flavoni i antocijani (Slika 2.) (Adinew i sur., 2021). Flavonoidi su i supstrati različitim modifikacijama poput glikozilacije, glukuronidacije, metilacije, hidroksilacije i drugih metaboličkih transformacija tijekom probave koje utječu na njihovu bioaktivnost (Vachetta i sur., 2022).



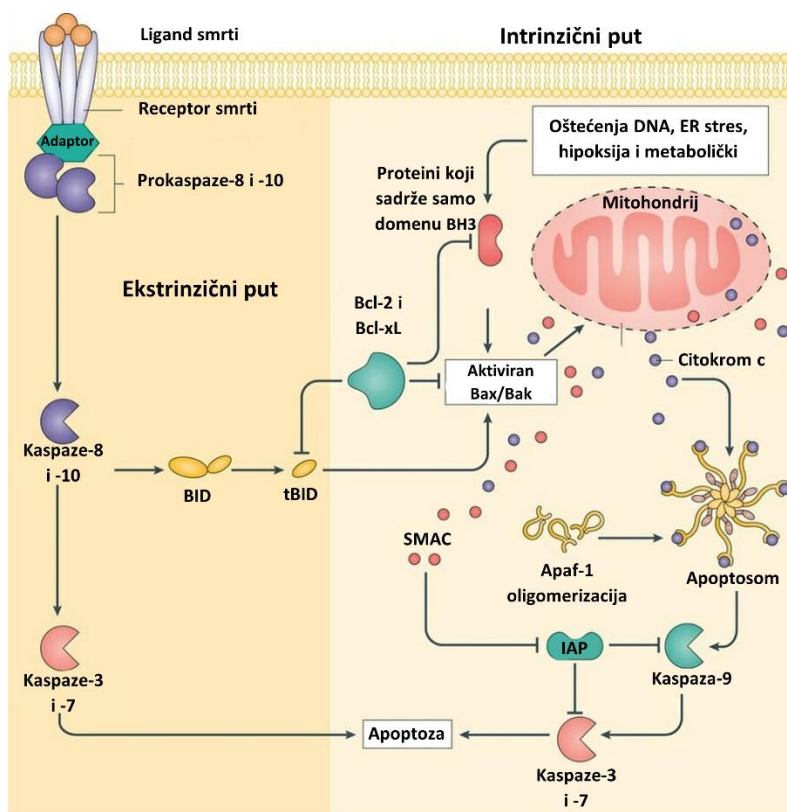
Slika 2. Klasifikacija flavonoida na šest glavnih skupina. S obzirom na stupanj oksidacije središnjeg piranskog prstena flavonoidi se dijele na flavonole, flavanone, izoflavonoide, flavanole, flavone i antocijane. Navedeni su i neki od predstavnika svake skupine (preuzeto i prilagođeno prema Adinew i sur., 2021).

5. Molekularni učinci flavonoida u liječenju trostruko negativnog karcinoma dojke

5.1. Indukcija apoptoze

Apoptoza predstavlja strogo reguliran proces programirane stanične smrti koji je normalan dio razvoja i morfogeneze dok je njegova evazija jedan od važnih mehanizama karcinogeneze koji dovodi do proliferacije tumorskih stanica (Slika 3.) (Adinew i sur., 2021). Ekstrinzični put

apoptoze pokreće se vezanjem liganda smrti (TNF, FasL i TRAIL) za svoje odgovarajuće receptore smrti nakon čega slijedi novačenje adaptorskog proteina TRADD i/ili FADD, nastanak kompleksa DISC te cijepanje i aktivacija prokaspaze-8 i -10 (Jan i Chaudhry, 2019). Aktivirane kaspaze-8 i -10 dalje mogu aktivirati efektorske kaspaze-3 i -7 koje dovode do apoptoze (Park i sur., 2022). Stanični signali nastali uslijed oksidativnog stresa, radijacije ili tretmana citotoksičnim lijekovima induciraju intrinzični put apoptoze koji je posredovan insercijom Bax/Bak u vanjsku mitohondrijsku membranu, njezinom permeabilizacijom i posljedičnim oslobađanjem apoptogenih proteina poput citokroma c u citosol (Jan i Chaundry, 2019). Interakcijom citokroma c i Apaf-1 nastaje apoptosom koji dovodi do aktivacije inicijatorske kaspaze-9 i u konačnici do aktivacije kaspaze-3 i -7 (Derakhshan i sur., 2017). Postoje i anti-apoptotički proteini poput Bcl-2 i Bcl-xL koji sprječavaju oslobađanje citokroma c i održavaju cjelovitost mitohondrija (Jan i Chaundry, 2019). Tumor supresorski protein p53 također sudjeluje u indukciji apoptoze kao odgovor na stanični stres i to djelujući kao transkripcijski čimbenik u regulaciji ekspresije prije spomenutih gena i brojnih drugih uključenih u proces apoptoze (Jan i Chaundry, 2019).



Slika 3. Ekstrinzični i intrinzični put apoptoze. Vezanje liganda smrti za odgovarajući receptor smrti u ekstrinzičnom putu apoptoze dovodi do nastanka kompleksa DISC koji uključuje adaptorski protein i prokaspaze-8 i -10 s citosolne strane stanice. Blizina prokaspaza inducira njihovu autokatalitičku aktivnost i aktivaciju čime pokreću kaspaznu kaskadu te posreduju u cijepanju proapoptotičkog BID u tBID koji aktivira Bax/Bak. Aktivaciju i inserciju Bax/Bak u

vanjsku mitohondrijsku membranu kod intrinzičnog puta pokreću proteini koji sadrže samo domenu BH3 djelovanjem unutarstaničnih signala. Uslijed permeabilizacije mitohondrijske membrane dolazi do oslobađanja citokroma c u citosol, njegove interakcije s Apaf-1 i nastanka apoptosoma koji aktivira prokaspazu-9. Aktivirana kaspaza-9 aktivira efektorske kaspaze-3 i-7 koje dovode do apoptoze. SMAC oslobođen iz mitohondrija sudjeluje u regulaciji apoptoze inhibirajući IAP-ove (preuzeto i prilagođeno prema <https://biologydictionary.net/apoptosis/>).

Brojna istraživanja dokazuju utjecaje različitih flavonoida na brojne komponente apoptotske mašinerije. Tretman trostruko negativnih stanica MDA-MB-231 genisteinom inducirao je apoptozu uslijed inhibicije Notch-1 signalnog puta koji je inače aberantno aktiviran kod TNBC-a (Pan i sur., 2012). Posljedično je inhibirana nuklearna translokacija transkripcijskog čimbenika NF- κ B i smanjena ekspresija njegovih nizvodnih meta poput Bcl-2 i Bcl-xL. Ulogu u promicanju stanične proliferacije ima i signalna kaskada MEK5/ERK5 te su Li i sur. (2008) pokazali da genistein također dovodi i do njezine inhibicije. S obzirom da je NF- κ B meta ERK5 kinaze uočili su i smanjenje aktivacije NF- κ B te posljedično smanjenu ekspresiju Bcl-2, povećanu ekspresiju Bax i indukciju apoptoze posredovanu kaspazom-3. Pokazano je i da kvercetin inducira apoptozu popraćenu porastom koncentracije citosolnog Ca²⁺ i ekspresije Bax, smanjenjem mitohondrijskog membranskog potencijala i ekspresije Bcl-2 te aktivacijom kaspaza-3, -8 i -9 kod stanične linije MDA-MB-231 (Farghadani i Naidu, 2023). FOXO transkripcijski čimbenici su tumor supresori koji sudjeluju u regulaciji proliferacije i apoptoze te su suprimirani u tumorskim stanicama dok njihova fosforilacija JNK kinazama dovodi do njihove relokacije i transkripcije ciljnih gena (Kim i sur., 2012). Proapoptotičko djelovanje kvercetina posredovano je povišenjem ekspresije liganda smrti FasL uslijed pojačane aktivacije FoxO3a i JNK (Kim i sur., 2012; Nguyen i sur., 2017). Klyga i sur., (2020) pokazali su da kvercetin dovodi do utišavanja određenih Hsp-ova i time inducira apoptozu s pojačanom aktivacijom kaspaza i cijepanjem PARP-a koji je meta kaspaza i indikator apoptoze. Kempferol inducira apoptozu putem fosforilacije i aktivacije p53 (Choi i Ahn, 2008) kao i epigalokatehin galat za kojeg je pokazano da povećava i omjer Bax/Bcl-2, oslobađanje citokroma c, indukciju Apaf-1, aktivaciju kaspaze-3 te cijepanje PARP-a (Roy i sur., 2005). Neki flavonoidi izazivajući oksidativni stres induciraju apoptozu pa tako primjerice autooksidacijom miricetina nastaje izvanstanični vodikov peroksid koji u TNBC stanicama u kulturi dovodi do nakupljanja ROS-ova i apoptoze (Knickle i sur., 2018).

5.2. Inhibicija proliferacije i progresije staničnog ciklusa

Nekoliko mehanizama kontrolira progresiju staničnog ciklusa kako bi se osigurala pravilna stanična dioba. Pri tome ključnu ulogu imaju CDK-ovi čija se aktivnost mijenja tijekom faza ciklusa i na taj način dolazi do cikličnih promjena u fosforilaciji i aktivnosti unutarstaničnih proteina koji iniciraju i reguliraju procese replikacije DNA, mitoze i citokineze (Vermeulen i sur., 2003). Najvažniji regulatori aktivnosti CDK-ova su proteini ciklini koji se ciklično razgrađuju i sintetiziraju. Indukcija nekontrolirane stanične proliferacije jedna je od glavnih karakteristika karcinoma dojke koja se može javiti kao posljedica narušene progresije staničnog ciklusa i poremećene regulacije CDK-ova (Adinew i sur., 2021). Signalna kaskada PI3K/Akt predstavlja jednu od najčešće aktiviranih kaskada karcinoma dojke koja promovira staničnu proliferaciju i metastaziranje (Zhang i sur., 2018). Pojačana aktivnost PI3K stimulirana je djelovanjem različitih onkogenih i receptora čimbenika rasta kao i mutacijama te rezultira nastankom sekundarnog glasnika PIP3 te fosforilacijom i aktivacijom kinaze Akt (Dong i sur., 2021). Ona dalje fosforilira brojne supstrate poput mTOR-a, CDK-ova, NF- κ B-a i VEGF-a, na taj način regulirajući različite stanične procese.

Pojačana aktivacija JNK signalnog puta pri tretmanu MDA-MB-231 stanične linije kvercetinom uzrokuje zaustavljanje staničnog ciklusa u S i G2/M fazama. Takva inhibicija se javlja uslijed pojačane aktivacije p53 koji transkripcijski aktivira p21, inhibitora CDK2 (Nguyen i sur., 2017). Kempferol također zaustavlja stanice u G2/M fazi uslijed inhibicije ciklina A i B te CDK1 (Choi i Ahn, 2008). Arowosegbe i sur. (2020) predložili su kempferol i kao potencijalni inhibitor kinaze PAK4 čija se visoka ekspresija kod TNBC-a inače povezuje s pojačanom staničnom proliferacijom i lošijom prognozom uslijed aktivacije PI3K kaskade. Izorhamnetin, genkwanin i akacetin inhibiraju staničnu proliferaciju i zaustavljaju TNBC stanice u G2/M fazi uslijed pojačane ekspresije p53 i posljedično inhibicije aktivnosti CDK2/ciklin B1 djelovanjem p21 (Zhang i sur., 2018). Antiproliferativni i proapoptički učinci ovih flavonoida proizlaze i iz njihove mogućnosti vezanja i inhibiranja PI3K γ čime narušavaju PI3K/Akt/mTOR signalnu kaskadu. Tretmani TNBC stanica *in vitro* tangeretinom (Vachetta i sur., 2022), fisetinom (Smith i sur., 2016), genisteinom (Pan i sur., 2012) i luteolinom (Lee i sur., 2012) zaustavljaju stanične cikluse u G2/M fazi uslijed inhibicije ekspresije ciklina B1. Luteolin ostvaruje i antiproliferativni učinak na TNBC stanice inhibicijom NF- κ B/c-Myc puta čime značajno snižava aktivnost telomerase koja je ključni pokretač proliferacije karcinoma dojke (Huang i sur., 2019). Nizvodna meta NF- κ B-a, c-Myc

inducira transkripciju katalitičke podjedinice telomeraze hTERT te se stoga djelovanje luteolina očituje u inhibiciji transkripcije hTERT-a i onemogućenom održavanju telomera kromosoma. Pokazano je da hesperitin inhibira proliferaciju MDA-MB-231 stanične linije supresijom ekspresije staničnih prijenosnika glukoze GLUT1 i GLUT4 i supresijom fosforilacije Akt-a koji inače pokreće translokaciju GLUT4-a na staničnu površinu (Yang i sur., 2013). Visoka stopa unosa i metabolizma glukoze važna je za rast stanica karcinoma zbog čega ovakvo djelovanje hesperitina ima značajan antiproliferativni učinak.

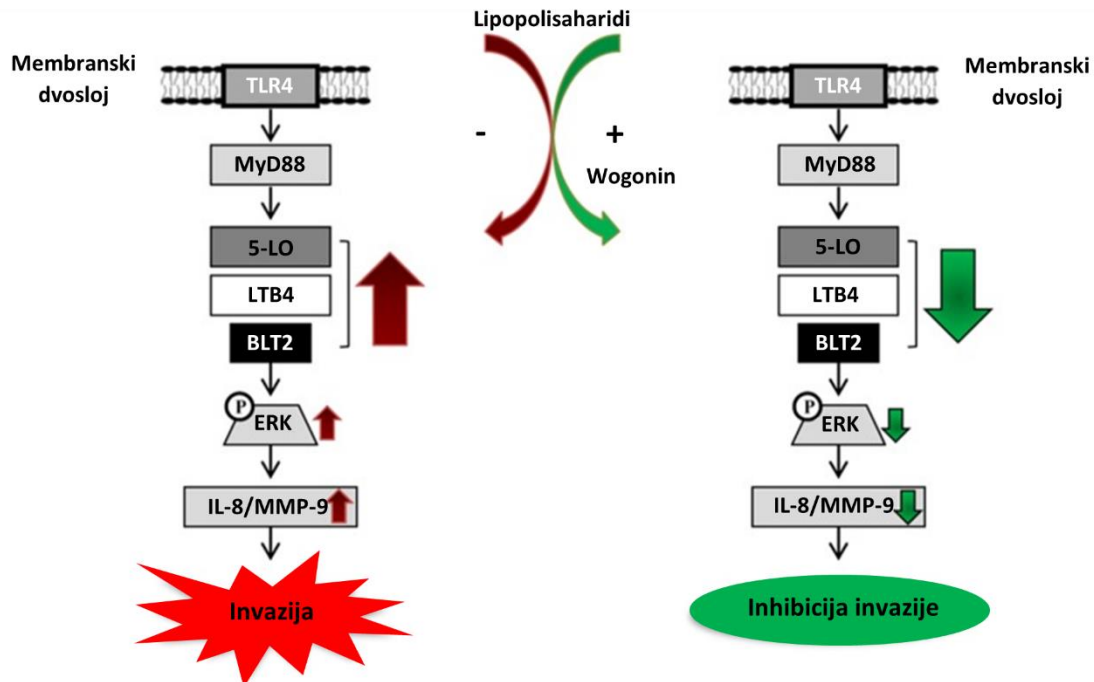
5.3. Inhibicija stanične migracije, invazivnosti i epitelno-mezenhimalne tranzicije

EMT je fenotipska pretvorba koja je uključena u normalne fiziološke procese poput embrionalnog razvoja, ali i u proces odvajanja karcinomskih stanica od mjesta primarnog tumora, njihovo putovanje krvnim i limfinim sustavom u udaljena tkiva te stvaranje metastatskih lezija (Adinew i sur., 2021). Pri tome adhezivne nepokretne karcinomske stanice epitelnog fenotipa prelaze u mobilne invazivne mezenhimske stanice i epitelne stanične biljege poput E-kadherina i kladina zamjenjuju mezenhimski N-kadherin i vimentin (Li i sur., 2018). Brojni transkripcijski čimbenici poput Slug, Snail, Zeb i Twist te signalne molekule poput Wnt, Notch i TGF- β su također uključeni u regulaciju EMT-a. Mobilne karcinomske stanice pokazuju i pojačanu ekspresiju brojnih enzima poput metaloproteinaza iz obitelji MMP kako bi mogle prodirati kroz izvanstanični matriks dok im signalni putevi poput PI3K/Akt, Wnt/ β -katenin i NF- κ B pružaju zaštitu od programirane stanične smrti anoikisom koju inače prolaze normalne epitelne stanice koje su izgubile adheziju s matriksom (Banyard i Bielenberg, 2015). Upala izazvana tumorom može dovesti i do novačenja stanica imunskog sustava koje luče različite citokine koji mogu inducirati ekspresiju pro-metastatskih transkripcijskih čimbenika (Banyard i Bielenberg, 2015).

Fisetin se pokazao učinkovitim supresorom migracije, invazije i EMT-a kod TNBC staničnih linija *in vitro* snižavajući ekspresiju mezenhimskih biljega i transkripcijskog čimbenika Snail te povećavajući ekspresiju epitelnih biljega E-kadherina i kladina, ali i supresorom metastaziranja *in vivo* na mišjim ksenograftnim modelima (Li i sur., 2018). Takav učinak ostvaruje *in vitro* i *in vivo* tako što povećava ekspresiju tumor supresora *PTEN* i inhibira signalni put PI3K/Akt/GSK-3 β . Li i sur. (2018) stoga predlažu da fisetin za sada još nepoznatim mehanizmom potiče ekspresiju *PTEN*-a koji nadalje negativno regulira PI3K/Akt/GSK-3 β kaskadu koja inače stabilizira nizvodni transkripcijski čimbenik Snail kako bi mogao inhibirati ekspresiju gena za E-

kadherin i na taj način potaknuti EMT. Flavonolignan silibinin također utječe na odnos epitelnih i mezenhimskih biljega kako bi inhibirao EMT, smanjuje ekspresiju MMP-2 i MMP-9 čime inhibira migraciju TNBC stanica te pridonosi pojačanoj fuziji mitohondrija i njihovoj smanjenoj fiziji koja je inače nužna za migraciju stanica i formaciju lamelipodija (Si i sur., 2020). Byun i sur. (2017) pokazali su da silibinin snižava ekspresiju MMP-2 i putem inhibicije JAK2/STAT3 kaskade i tim mehanizmom pridonosi smanjenju invazivnosti stanične linije MDA-MB-231. Takav učinak ostvaruje inhibirajući ekspresiju i fosforilaciju kinaze JAK2 što rezultira smanjenjem fosforilacije, dimerizacije i nuklearne translokacije njegovog supstrata STAT3. Posljedično se STAT3 ne može vezati na promotor i inducirati ekspresiju metaloproteinaze MMP-2 koja pridonosi invazivnom fenotipu TNBC-a. Kvercetin i luteolin mijenjaju morfologiju staničnih linija TNBC u ovalni epitelni fenotip, smanjuju ekspresiju mezenhimskih biljega, povećavaju ekspresiju epitelnih biljega te oboje suprimiraju migraciju i invaziju posredstvom inhibicije ekspresije i nuklearne translokacije β -katenina (Srinivasan i sur., 2016; Lin i sur., 2017). Formiranje kompleksa E-kadherin/ β -katenin ključno je za održavanje adhezije među stanicama stoga bi gubitak E-kadherina mogao biti jedan od razloga za omogućenu nuklearnu translokaciju β -katenina pri metastaziranju TNBC-a i indukciju ekspresije gena poput *ciklina D1* i *c-Myc* (Srinivasan i sur., 2016).

Upala i lokalni upalni medijatori tumorskog mikrokoliša usko su povezani s progresijom tumora različitim mehanizmima pa tako izlaganje TNBC staničnih linija lipopolisaharidima povećava ekspresiju receptora proupalnih lipidnih medijatora BLT2 i sintezu njegovih liganda čime se potiče invazivnost i metastaziranje (Park i Kim, 2015). Lipopolisaharidi potenciraju invazivnost stimulacijom TLR4/MyD88 kaskade koja djeluje uzvodno od BLT2 i stvara njegov ligand LTB4 uslijed indukcije ekspresije enzima 5-LO (Go i sur., 2018). Takva kaskada u konačnici posreduje u aktivaciji NF- κ B i sintezi IL-6 i IL-8 koji su ključni za invazivnost i agresiju TNBC-a (Park i Kim, 2015). Flavon wogonin ostvaruje inhibiciju invazivnosti lipopolisaharidom stimuliranih TNBC stanica *in vitro* i *in vivo* smanjenjem ekspresije BLT2 i 5-LO što rezultira inhibicijom fosforilacije ERK-a i posljedično smanjenom sintezom IL-8 i MMP-9 (Slika 4.) (Go i sur., 2018).



Slika 4. Molekularni mehanizam djelovanja wogonina na lipopolisaharidom stimuliranu MDA-MB-231 staničnu liniju *in vitro* i *in vivo*. Lipopolisaharidi stimuliraju invazivnost i metastaziranje TNBC stanica aktivacijom TLR4/MyD88/5-LO/BLT2/ERK kaskade dok wogonin inhibicijom ekspresije BLT2 i 5-LO smanjuje sintezu IL-8 i MMP-9 te umanjuje invazivnost i metastaziranje TNBC-a (preuzeto i prilagođeno prema Go i sur., 2018).

5.4. Antiangiogeno djelovanje

Angiogeneza je fiziološki proces stvaranja novih krvnih žila koji je ključan za rast, preživljenje i metastaziranje karcinoma. Strogo je regulirana različitim endogenim angiostatskim i angiogenim čimbenicima, međutim, različite bolesti poput raka mogu utjecati na njihovu ravnotežu i izazvati patološku tumorsku angiogenezu (Mirossay i sur., 2017). U takvom stanju, angiogeneza poboljšava proliferaciju postojećih krvnih žila koje ulaze u tumorsko tkivo, opskrbljuju ga kisikom i nutrijentima te uklanjaju njegov metabolički otpad (Adinew i sur., 2021). Hipoksija, aktivacija onkogenih ili inaktivacija tumor supresorskih gena mogu izazvati prekomjernu ekspresiju angiogenih čimbenika VEGF, IL-6, IL-8, FGF, TGF- α i prostaglandina E (Adinew i sur., 2021). Angiogene čimbenike luče i tumoru pridruženi makrofazi i stromalne stanice tumorskog mikrookoliša čime novače i potiču endotelne stanice na formiranje krvnih žila (Varghese i sur., 2020). VEGF predstavlja ključni regulator angiogeneze koji je često pojačano eksprimiran kod pacijenata s TNBC-om i koji pokreće proliferaciju i migraciju endotelnih stanica putem PI3K/Akt kaskade te rearanžman citoskeleta (Huang i sur., 2019; Varghese i sur., 2020). HIF-1 α jedan je od transkripcijskih čimbenika koji inducira ekspresiju VEGF-a pri pojavi tumorskog hipoksičnog

stresa (Varghese i sur., 2020). Nekoliko flavonoida pokazalo je antiangiogeni potencijal koji bi mogao pridonijeti poboljšanju terapija usmjerenih na tumorsku angiogenezu TNBC-a.

Rast HUVEC stanične linije endotelnih stanica u mediju stanica MDA-MB-231 dovodi do nastanka kapilarnih struktura, ali izoflavonoid glabradin inhibira nastanak kapilarnih struktura *in vitro* kao i formiranje funkcionalnih krvnih žila *in vivo* na mišjem modelu s ubrizganim stanicama MDA-MB-231 (Hsu i sur., 2011). Takav antiangiogeni učinak ostvaruje inhibicijom migracije stanica HUVEC i MDA-MB-231 zbog pojačane degradacije integrina i supresije aktivacije FAK/Src kompleksa koji nizvodno može aktivirati nekoliko signalnih kaskada koje imaju uloge u staničnoj migraciji i angiogenezi. Tretman epigalokatehin galatom inhibira aktivaciju HIF-1 α i NF- κ B te posljedično i ekspresiju VEGF i angiogenezu stanica TNBC *in vitro* i karcinoma dojke imunokompetentnog mišjeg modela *in vivo* (Gu i sur., 2013). Pri tome tretman nije imao utjecaja na tjelesnu i srčanu masu niti na angiogenezu i ekspresiju VEGF-a srca i skeletnih mišića korištenog mišjeg modela s obzirom da se normalna tkiva nalaze pod manjim hipoksičnim stresom pa pokazuju stalno stabilnu ekspresiju VEGF-a i angiogenezu. Hedgehog signalni put sudjeluje u regulaciji krvožilnog formiranja tijekom ranog embrionalnog razvoja, a pokazuje pojačanu aktivnost kod TNBC-a popraćenu s povećanom gustoćom krvnih žila (Tao i sur., 2011). Vežanje Hedgehog liganda za transmembranski receptor PTCH1 prekida njegovo inhibitorno djelovanje na membransku translokaciju SMO čime je omogućena aktivacija i nuklearna translokacija Gli1 transkripcijskog čimbenika koji promovira ekspresiju gena *VEGFA* kod karcinoma dojke (Huang i sur., 2019; Vachetta i sur., 2022). Huang i sur. (2019) su pokazali da wogonozid inhibira angiogenezu *in vitro* i *in vivo* putem smanjenja ekspresije *VEGF*-a s obzirom da ovaj flavonoid inhibira transkripcijsku aktivnost i nuklearnu translokaciju Gli1 te pospješuje razgradnju SMO-a ubikvitinacijom.

5.5. Aktivacija antitumorskog imunskog odgovora

Tumorski mikrookoliš predstavlja okruženje tumora koje uključuje imunosne stanice, izvanstanični matriks, krvožilne stanice, fibroblaste, adipocite i signalne molekule (Adinew i sur., 2021). Mehanizmi urođene i stečene imunosti sudjeluju u regulaciji karcinogeneze pri čemu su glavni nosioci imunskog odgovora na tumore citotoksični T-limfociti CD8⁺ koji prepoznaju abnormalne tumorske antigene izražene preko MHC1 molekula i označavaju tumorske stanice za uništenje (Abbas i sur., 2017). Antitumorskom imunskom odgovoru također pridonose antigen-

predočne stanice, obično dendritičke stanice, koje predočenjem tumorskih antigena i ekspresijom kostimulatornih molekula potiču citotoksične T-limfocite CD8⁺ na diferencijaciju (Tečić Vuger i sur., 2021). Nadalje, sudjeluju i pomoćnički limfociti Th1 CD4⁺ koji aktiviraju makrofage i poboljšavaju odgovor CD8⁺ T-limfocita te NK stanice. S druge strane, imunosne stanice mogu imati i protumorsko djelovanje za što su najčešće odgovorne stanice urođene imunosti koje mogu poticati angiogenezu lučenjem VEGF-a, podržavati progresiju i preživljenje karcinoma lučenjem topivih čimbenika poput NF-κB, TGF-β i imunosupresivnih citokina, pridonositi oštećenju DNA nakupljanjem slobodnih radikala te suprimirati imunosni odgovor (Tečić Vuger i sur., 2021). Takvo djelovanje ostvaruju dendritičke stanice koje mogu uvjetovati diferencijaciju CD4⁺ u protuupalne stanice Th2 i regulatorne stanice T koje suzbijaju antitumorski imunosni odgovor i podržavaju razvoj protumorskih stanica. Važna karakteristika karcinoma je evazija imunosnog odgovora i to posebice pomoću mehanizama koji uključuju CTLA-4 i PD1/PD-L1 i inače služe za kontrolu autoimunih reakcija (Adinew i sur., 2021).

Song i sur. (2020) pokazali su da ikariin značajno oslabljuje imunosupresivnu prirodu tumorskog mikrookoliša tako što smanjuje ekspresiju PD-L1 i prisutnost imunosupresivnih stanica mijeloidnog porijekla, a povećava udio infiltrirajućih CD4⁺/CD8⁺ T stanica. Takvo djelovanje pripisuju histon deacetilazi SIRT6 čiju ekspresiju ikariin povećava uslijed čega SIRT6 deacetilira lizin 9 na histonu H3 u promotorima NF-κB ciljnih gena i time destabilizira NF-κB signalizaciju. Apigenin također pokazuje potencijal povećanja osjetljivosti TNBC stanica na antitumorsko djelovanje T-stanica. Tretman MDA-MB-468 stanične linije apigeninom uzrokovao je smanjenje fosforilacije transkripcijskog čimbenika Stat1 uslijed čega je smanjena i ekspresija PD-L1 na proučavanim tumorskim stanicama (Coombs i sur., 2016). Ekspresiju PD-L1 inducira citokin tumorskog mikrookoliša IFN-γ različitim signalnim putevima poput primjerice Jak1/Jak2/Stat1 (Bellucci i sur., 2015). Coombs i sur. (2016) pokazali su da apigenin inhibira IFN-β i IFN-γ induciranu ekspresiju PD-L1 te povećava proliferaciju i sintezu IL-2 kod stanica T koje ekspimiraju PD-1 i koje su rasle zajedno sa stanicama MDA-MB-468.

5.6. Epigenetska regulacija

Epigenetika obuhvaća nasljedne i reverzibilne promjene u ekspresiji gena koje ne uključuju promjene sekvence DNA (Sharma i sur., 2021). Epigenetski mehanizmi koji moduliraju ekspresiju gena uključuju promjene u CpG metilaciji DNA, posttranslacijske modifikacije histona (poput

metilacija, acetilacija, fosforilacija i ubikvitinacija), ekspresiju nekodirajućih RNA, preuređenje strukture kromatina i pozicioniranje nukleosoma (Adinew i sur., 2021). U nekodirajuće RNA spadaju jednolančane endogene miRNA koje imaju ključnu ulogu u posttranslacijskoj regulaciji ekspresije gena kod TNBC-a pri čemu neke miRNA imaju onkogeno djelovanje, a neke tumor supresorsko (Adinew i sur., 2021). Ciljanje epigenetskih modifikacija u liječenju TNBC-a s različitim spojevima poput inhibitorima histonskih deacetilaza i DNA metiltransferazama predmet je brojnih istraživanja (Selmin i sur., 2020). Nekoliko flavonoida pokazalo je antikancerogene učinke putem epigenetske regulacije kod TNBC-a.

Guo i sur. (2016) pokazali su u dugoročnom istraživanju TNBC pacijenata kako je prehrana obilata sojom (bogata flavonoidima genisteinom i daidzeinom) u godini pred dijagnozu dovela do pojačane ekspresije tumor supresorskih gena i miRNA te smanjene ekspresije onkogeno. Radilo se o pojačanoj ekspresiji nekoliko miRNA koje su uključene u regulaciju ekspresije gena *TP53*. Transkriptomске analize ksenografta dobivenih od TNBC pacijenata pružile su uvid u utjecaj genisteina na procese DNA metilacije i histonske deacetilacije koji u konačnici pridonose njegovom antiproliferativnom učinku (Sharma i sur., 2021). Genistein takvo djelovanje ostvaruje modifikacijom ekspresije i aktivnosti metiltransferaze Dnmt3b, metilcitozin dioksidogene Tet3 i histonske deacetilaze Hdac2. Transkripcijski čimbenik i receptor AhR često je prekomjerno eksprimiran kod TNBC-a i u prisutnosti svojih liganda veže se na promotor *BRCA1* gena te promovira asocijaciju DNA metiltransferaza i histonske modifikacije koje inhibiraju transkripciju *BRCA1* (Selmin i sur., 2020). Posljedično, hipermetilacija promotora gena *BRCA1* koja je opisana kod 30 – 65% slučajeva TNBC-a smanjuje *BRCA1*-ovisnu transaktivaciju gena *ERα* i dovodi do *ERα*-negativnog fenotipa (Selmin i sur., 2020). Tretman genisteinom povećava ekspresiju *BRCA1* uslijed smanjenja novačenja AhR na promotor *BRCA1* i njegove metilacije te nadalje povećava i ekspresiju *ERα* i osjetljivost staničnih linija TNBC *in vitro* i *in vivo* na antiestrogenske terapije (Donovan i sur., 2019). Sinergistički učinak reaktivacije ekspresije *ERα* i pojačanja osjetljivosti na antiestrogenske terapije pokazao je i epigalokatehin galat u primjeni s inhibitorom histonskih deacetilaza, trihostatinom A i to uslijed preuređenja strukture kromatina i promjene statusa acetilacija i metilacija histona u promotoru *ERα* (Li i sur., 2010). Steed i sur. (2020) pokazali su kako tretman staničnih linija TNBC epigalokatehin galatom u kombinaciji s drugim inhibitorom histonskih deacetilaza inducira apoptozu uslijed povećanja ekspresije kaspaze-7 i smanjenja ekspresije IAP2-a. Ovakve promjene ekspresija objasnili su promjenama histonskih modifikacija

u promotorima gena, smanjenom aktivnošću histonske deacetilaze i pojačanom aktivnošću histonske metiltransferaze.

6. Izazovi i ograničenja terapijske primjene flavonoida

Unatoč obećavajućoj ulozi flavonoida u liječenju i prevenciji TNBC-a postoji nekoliko čimbenika koji za sada ograničavaju njihovu terapijsku primjenu. Flavonoidi su osjetljivi na svjetlost, pH i toplinu zbog čega su podložni razgradnji i davanju niskog prinosa tijekom provođenja njihove ekstrakcije i pročišćavanja (Farghadani i Naidu, 2023). Bioraspoloživost i terapijska učinkovitost flavonoida mogu biti snižene zbog njihovih nepovoljnih farmakokinetičkih svojstava poput slabe topljivosti u vodi, niske oralne apsorpcije, podložnosti jetrenom metabolizmu i različitim modifikacijama tijekom apsorpcije u tankom crijevu i kontakta s mikrobiotom debelog crijeva (Chinnikrishnan i sur., 2023). Stoga su brojna istraživanja *in vitro* i *in vivo* usmjerena na razvoj specifične ciljane dostave flavonoida nanonosaačima u svrhu poboljšanja njihove topljivosti i stabilnost u gastrointestinalnim uvjetima te smanjenja potrebe za primjenom vrlo visokih doza lijeka kako bi se postigla biološka aktivnost u organizmu (Farghadani i Naidu, 2023). Nadalje, za sada su još uvijek malobrojni primjeri kliničkih ispitivanja učinaka flavonoida na pacijente s TNBC-om (Vachetta i sur., 2022).

7. Zaključak

Skupinu TNBC karakterizira loša prognoza, agresivnost, visoki metastatski potencijal i nedostatak specifičnih ciljanih terapija. U potrazi za alternativnom strategijom liječenja koja je minimalno toksična, široko dostupna i učinkovita, flavonoidi su se pokazali obećavajućom opcijom. Brojna istraživanja pokazala su da se učinak flavonoida na TNBC očituje u njihovoj supresiji proliferacije, indukciji apoptoze, inhibiciji progresije staničnog ciklusa, stanične migracije i angiogeneze, poboljšanju antitumorskog imunskog odgovora te epigenetskoj regulaciji. Flavonoidi moduliraju brojne signalne kaskade karakteristične i ključne za karcinogenezu TNBC-a poput PI3K/Akt, MAPK/ERK, JAK/STAT, NF- κ B i Wnt/ β -katenin te na taj način učinkovito suprimiraju agresivan i metastatski potencijal TNBC-a kod brojnih *in vitro* i *in vivo* modela. Unatoč obećavajućim otkrićima, u budućnosti je potrebno riješiti pitanja

bioraspoloživosti i farmakokinetičkih svojstava flavonoida kako bi se ona mogla početi primjenjivati u kliničkoj praksi. Stoga je nužno razviti ekološki prihvatljive tehnologije koje će omogućiti masovnu proizvodnju ovih metabolita te istražiti mogućnosti novih ciljanih sustava dostave flavonoida poput različitih nanonosaa. Takvi napredci uz rezultate budućih kliničkih istraživanja pružit će odgovore na pitanja o učinkovitosti i sigurnosti primjene flavonoida u terapiji TNBC-a.

8. Literatura

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2017). *Cellular and molecular immunology* (9th ed.). Elsevier.
- Adinew, G. M., Taka, E., Mendonca, P., Messeha, S. S., & Soliman, K. F. A. (2021). The anticancer effects of flavonoids through miRNAs modulations in triple-negative breast cancer. *Nutrients*, *13*(4), 1212. <https://doi.org/10.3390/nu13041212>
- Arowosegbe, M. A., Amusan, O. T., Adeola, S. A., Adu, O. B., Akinola, I. A., Ogungbe, B. F., Omotuyi, O. I., Saibu, G. M., Ogunleye, A. J., Kanmodi, R. I., Lugbe, N. E., Ogunmola, O. J., Ajayi, D. C., Ogun, S. O., Oyende, F. O., Bello, A. O., Ishola, P. G., & Obasieke, P. E. (2020). Kaempferol as a potential PAK4 inhibitor in triple negative breast cancer: extra precision glide docking and free energy calculation. *Current Drug Discovery Technologies*, *17*(5), 682–695. <https://doi.org/10.2174/1570163816666190823135948>
- Arzi, L., Mollaei, H., & Hoshyar, R. (2022). Countering triple negative breast cancer via impeding Wnt/ β -catenin signaling, a phytotherapeutic approach. *Plants*, *11*(17), 2191. <https://doi.org/10.3390/plants11172191>
- Banyard, J., & Bielenberg, D. R. (2015). The role of EMT and MET in cancer dissemination. *Connective Tissue Research*, *56*(5), 403–413. <https://doi.org/10.3109/03008207.2015.1060970>
- Bellucci, R., Martin, A., Bommarito, D., Wang, K., Hansen, S. H., Freeman, G. J., & Ritz, J. (2015). Interferon- γ -induced activation of JAK1 and JAK2 suppresses tumor cell susceptibility to NK cells through upregulation of PD-L1 expression. *Oncoimmunology*, *4*(6), e1008824. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1008824>
- Benz, C. C. (2008). Impact of aging on the biology of breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *66*(1), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.09.001>
- Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *13*(11), 674–690. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>
- Biology dictionary (2017). *Apoptosis*. <https://biologydictionary.net/apoptosis/> (pristupljeno 16. 8. 2024.).

- Burstein, M. D., Tsimelzon, A., Poage, G. M., Covington, K. R., Contreras, A., Fuqua, S. A. W., Savage, M. I., Osborne, C. K., Hilsenbeck, S. G., Chang, J. C., Mills, G. B., Lau, C. C., & Brown, P. H. (2015). Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*, *21*(7), 1688–1698. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0432>
- Byun, H. J., Darvin, P., Kang, D. Y., Sp, N., Joung, Y. H., Park, J. H., Kim, S. J., & Yang, Y. M. (2017). Silibinin downregulates MMP2 expression via Jak2/STAT3 pathway and inhibits the migration and invasive potential in MDA-MB-231 cells. *Oncology Reports*, *37*(6), 3270–3278. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5588>
- Chinnikrishnan, P., Aziz Ibrahim, I. A., Alzahrani, A. R., Shahzad, N., Sivaprakasam, P., & Pandurangan, A. K. (2023). The role of selective flavonoids on triple-negative breast cancer: an update. *Separations*, *10*(3), 207. <https://doi.org/10.3390/separations10030207>
- Choi, E. J., & Ahn, W. S. (2008). Kaempferol induced the apoptosis via cell cycle arrest in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Nutrition Research and Practice*, *2*(4), 322–325. <https://doi.org/10.4162/nrp.2008.2.4.322>
- Coombs, M. R. P., Harrison, M. E., & Hoskin, D. E. (2016). Apigenin inhibits the inducible expression of programmed death ligand 1 by human and mouse mammary carcinoma cells. *Cancer Letters*, *380*(2), 424–433. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.06.023>
- Cserni, G. (2020). Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica*, *112*(01), 25–41. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-1-20>
- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., & Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American Journal of Cancer Research*, *5*(10), 2929–2943.
- Dass, S. A., Tan, K. L., Selva Rajan, R., Mokhtar, N. F., Mohd Adzmi, E. R., Wan Abdul Rahman, W. F., Tengku Din, T. A. D. A.-A., & Balakrishnan, V. (2021). Triple negative breast cancer: a review of present and future diagnostic modalities. *Medicina*, *57*(1), 62. <https://doi.org/10.3390/medicina57010062>

- Derakhshan, A., Chen, Z., & Van Waes, C. (2017). Therapeutic small molecules target inhibitor of apoptosis proteins in cancers with deregulation of extrinsic and intrinsic cell death pathways. *Clinical Cancer Research*, 23(6), 1379–1387. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2172>
- Dong, C., Wu, J., Chen, Y., Nie, J., & Chen, C. (2021). Activation of PI3K/AKT/mTOR pathway causes drug resistance in breast cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 628690. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.628690>
- Donovan, M. G., Selmin, O. I., Doetschman, T. C., & Romagnolo, D. F. (2019). Epigenetic activation of BRCA1 by genistein in vivo and triple negative breast cancer cells linked to antagonism toward aryl hydrocarbon receptor. *Nutrients*, 11(11), 2559. <https://doi.org/10.3390/nu11112559>
- Fan, C., Oh, D. S., Wessels, L., Weigelt, B., Nuyten, D. S. A., Nobel, A. B., van't Veer, L. J., & Perou, C. M. (2006). Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 355(6), 560–569. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052933>
- Farghadani, R., & Naidu, R. (2023). The anticancer mechanism of action of selected polyphenols in triple-negative breast cancer (TNBC). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 165, 115170. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115170>
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppapalati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T.-C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), 77–106. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>
- Ginsburg, O., Bray, F., Coleman, M. P., Vanderpuye, V., Eniu, A., Kotha, S. R., Sarker, M., Huong, T. T., Allemani, C., Dvaladze, A., Gralow, J., Yeates, K., Taylor, C., Oomman, N., Krishnan, S., Sullivan, R., Kombe, D., Blas, M. M., Parham, G., ... Conteh, L. (2017). The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. *The Lancet*, 389(10071), 847–860. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31392-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31392-7)
- Go, J., Wei, J., Park, J., Ahn, K., & Kim, J. (2018). Wogonin suppresses the LPS-enhanced invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells by inhibiting the 5-LO/BLT2 cascade. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(4), 1899–1908. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3776>

- Gu, J.-W., Makey, K. L., Tucker, K. B., Chinchar, E., Mao, X., Pei, I., Thomas, E. Y., & Miele, L. (2013). EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1 α and NF κ B, and VEGF expression. *Vascular Cell*, 5(1), 9. <https://doi.org/10.1186/2045-824X-5-9>
- Guo, X., Cai, Q., Bao, P., Wu, J., Wen, W., Ye, F., Zheng, W., Zheng, Y., & Shu, X. (2016). Long-term soy consumption and tumor tissue MicroRNA and gene expression in triple-negative breast cancer. *Cancer*, 122(16), 2544–2551. <https://doi.org/10.1002/cncr.29981>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K. E., Jones, L. P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., Backlund, M. G., Yin, Y., Khramtsov, A. I., Bastein, R., Quackenbush, J., Glazer, R. I., Brown, P. H., Green, J. E., Kopelovich, L., ... Perou, C. M. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biology*, 8(5), R76. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-r76>
- Hsu, Y., Wu, L., Hou, M., Tsai, E., Lee, J., Liang, H., Jong, Y., Hung, C., & Kuo, P. (2011). Glabridin, an isoflavan from licorice root, inhibits migration, invasion and angiogenesis of MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cells by inhibiting focal adhesion kinase/Rho signaling pathway. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(2), 318–327. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000148>
- Huang, L., Jin, K., & Lan, H. (2019). Luteolin inhibits cell cycle progression and induces apoptosis of breast cancer cells through downregulation of human telomerase reverse transcriptase. *Oncology Letters*, 17(4), 3842–3850. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10052>
- Huang, Y., Fang, J., Lu, W., Wang, Z., Wang, Q., Hou, Y., Jiang, X., Reizes, O., Lathia, J., Nussinov, R., Eng, C., & Cheng, F. (2019). A systems pharmacology approach uncovers wogonoside as an angiogenesis Inhibitor of triple-negative breast cancer by targeting hedgehog signaling. *Cell Chemical Biology*, 26(8), 1143-1158.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.05.004>
- Jan, R., & Chaudhry, G.-S. (2019). Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(2), 205–218. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.024>

- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., & Thun, M. J. (2009). Cancer statistics, 2009. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *59*(4), 225–249. <https://doi.org/10.3322/caac.20006>
- Kim, H., Choi, B.-S., Lee, S.-S., Kim, L.-S., Ryu, B.-Y., & Nam, J.-S. (2012). JNK-FoxO3a dependent apoptosis in quercetin treated MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Research*, *72*(8_Supplement), 248–248. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2012-248>
- Kıyga, E., Şengelen, A., Adıgüzel, Z., & Önay Uçar, E. (2020). Investigation of the role of quercetin as a heat shock protein inhibitor on apoptosis in human breast cancer cells. *Molecular Biology Reports*, *47*(7), 4957–4967. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05641-x>
- Knickle, A., Fernando, W., Greenshields, A. L., Rupasinghe, H. P. V., & Hoskin, D. W. (2018). Myricetin-induced apoptosis of triple-negative breast cancer cells is mediated by the iron-dependent generation of reactive oxygen species from hydrogen peroxide. *Food and Chemical Toxicology*, *118*, 154–167. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.005>
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, *12*(2), 457. <https://doi.org/10.3390/nu12020457>
- Kumar, P., & Aggarwal, R. (2016). An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *293*(2), 247–269. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3859-y>
- Lee, E.-J., Oh, S.-Y., & Sung, M.-K. (2012). Luteolin exerts anti-tumor activity through the suppression of epidermal growth factor receptor-mediated pathway in MDA-MB-231 ER-negative breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(11), 4136–4143. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.025>
- Lehmann, B. D., Pietenpol, J. A., & Tan, A. R. (2015). Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and new targets for therapy. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, *35*, e31–e39. https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2015.35.e31
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(7), 2750–2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>

- Lehmann, B. D., Jovanović, B., Chen, X., Estrada, M. V., Johnson, K. N., Shyr, Y., Moses, H. L., Sanders, M. E., & Pietenpol, J. A. (2016). Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection. *PLOS ONE*, *11*(6), e0157368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157368>
- Li, J., Gong, X., Jiang, R., Lin, D., Zhou, T., Zhang, A., Li, H., Zhang, X., Wan, J., Kuang, G., & Li, H. (2018). Fisetin inhibited growth and metastasis of triple-negative breast cancer by reversing epithelial-to-mesenchymal transition via PTEN/Akt/GSK3 β signal pathway. *Frontiers in Pharmacology*, *9*, 772. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00772>
- Li, Y., Lin, B., Liang, S., Tao, J., Zhang, L., Wang, J., & Zheng, J. (2022). Epidemiology and survival of patients with malignant carotid body tumors in the SEER database. *Journal of Vascular Surgery*, *76*(4), 973-978.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2022.04.039>
- Li, Y., Yuan, Y.-Y., Meeran, S. M., & Tollefsbol, T. O. (2010). Synergistic epigenetic reactivation of estrogen receptor- α (ER α) by combined green tea polyphenol and histone deacetylase inhibitor in ER α -negative breast cancer cells. *Molecular Cancer*, *9*(1), 274. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-274>
- Li, Z., Li, J., Mo, B., Hu, C., Liu, H., Qi, H., Wang, X., & Xu, J. (2008). Genistein induces cell apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Toxicology in Vitro*, *22*(7), 1749–1753. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.08.001>
- Lin, D., Kuang, G., Wan, J., Zhang, X., Li, H., Gong, X., & Li, H. (2017). Luteolin suppresses the metastasis of triple-negative breast cancer by reversing epithelial-to-mesenchymal transition via downregulation of β -catenin expression. *Oncology Reports*, *37*(2), 895–902. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5311>
- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., & Yin, H. (2021). The flavonoid biosynthesis network in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(23), 12824. <https://doi.org/10.3390/ijms222312824>
- Liu, Y.-R., Jiang, Y.-Z., Xu, X.-E., Yu, K.-D., Jin, X., Hu, X., Zuo, W.-J., Hao, S., Wu, J., Liu, G.-Y., Di, G.-H., Li, D.-Q., He, X.-H., Hu, W.-G., & Shao, Z.-M. (2016). Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, *18*(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0690-8>

- Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—an updated review. *Cancers*, *13*(17), 4287. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>
- McGuire, A., Brown, J., Malone, C., McLaughlin, R., & Kerin, M. (2015). Effects of age on the detection and management of breast cancer. *Cancers*, *7*(2), 908–929. <https://doi.org/10.3390/cancers7020815>
- Mirossay, L., Varinská, L., & Mojžiš, J. (2017). Antiangiogenic effect of flavonoids and chalcones: an update. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), 27. <https://doi.org/10.3390/ijms19010027>
- Narod, S. A., & Foulkes, W. D. (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews Cancer*, *4*(9), 665–676. <https://doi.org/10.1038/nrc1431>
- Newton, E. E., Mueller, L. E., Treadwell, S. M., Morris, C. A., & Machado, H. L. (2022). Molecular targets of triple-negative breast cancer: where do we stand? *Cancers*, *14*(3), 482. <https://doi.org/10.3390/cancers14030482>
- Nguyen, L. T., Lee, Y.-H., Sharma, A. R., Park, J.-B., Jagga, S., Sharma, G., Lee, S.-S., & Nam, J.-S. (2017). Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, *21*(2), 205. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2017.21.2.205>
- Obeagu, E. I., & Obeagu, G. U. (2024). Breast cancer: a review of risk factors and diagnosis. *Medicine*, *103*(3), e36905. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000036905>
- Oualla, K., Kassem, L., Nouiakh, L., Amaadour, L., Benbrahim, Z., Arifi, S., & Mellas, N. (2020). Immunotherapeutic approaches in triple-negative breast cancer: state of the art and future perspectives. *International Journal of Breast Cancer*, *2020*, 8209173. <https://doi.org/10.1155/2020/8209173>
- Pan, H., Zhou, W., He, W., Liu, X., Ding, Q., Ling, L., Zha, X., & Wang, S. (2012). Genistein inhibits MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell growth by inhibiting NF-κB activity via the Notch-1 pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, *30*(2), 337–343. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.990>

- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Park, G.-S., & Kim, J.-H. (2015). Myeloid differentiation primary response gene 88-leukotriene B4 receptor 2 cascade mediates lipopolysaccharide-potentiated invasiveness of breast cancer cells. *Oncotarget*, 6(8), 5749–5759. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3304>
- Park, M. Y., Kim, Y., Ha, S. E., Kim, H. H., Bhosale, P. B., Abusaliya, A., Jeong, S. H., & Kim, G. S. (2022). Function and application of flavonoids in the breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7732. <https://doi.org/10.3390/ijms23147732>
- Pastena, P., Perera, H., Martinino, A., Kartsonis, W., & Giovinazzo, F. (2024). Unraveling biomarker signatures in triple-negative breast cancer: a systematic review for targeted approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), 2559. <https://doi.org/10.3390/ijms25052559>
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., He, X., & Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12(5), R68. <https://doi.org/10.1186/bcr2635>
- Roy, A. M., Baliga, M. S., & Katiyar, S. K. (2005). Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells via modulation in protein expression of p53 and Bax and caspase-3 activation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(1), 81–90.
- Selmin, O. I., Donovan, M. G., Stillwater, B. J., Neumayer, L., & Romagnolo, D. F. (2020). Epigenetic regulation and dietary control of triple negative breast cancer. *Frontiers in Nutrition*, 7, 159. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00159>
- Sharma, M., Arora, I., Chen, M., Wu, H., Crowley, M. R., Tollefsbol, T. O., & Li, Y. (2021). Therapeutic effects of dietary soybean genistein on triple-negative breast cancer via regulation of epigenetic mechanisms. *Nutrients*, 13(11), 3944. <https://doi.org/10.3390/nu13113944>

- Si, L., Fu, J., Liu, W., Hayashi, T., Nie, Y., Mizuno, K., Hattori, S., Fujisaki, H., Onodera, S., & Ikejima, T. (2020). Silibinin inhibits migration and invasion of breast cancer MDA-MB-231 cells through induction of mitochondrial fusion. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *463*(1–2), 189–201. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03640-6>
- Smith, M. L., Murphy, K., Doucette, C. D., Greenshields, A. L., & Hoskin, D. W. (2016). The dietary flavonoid fisetin causes cell cycle arrest, caspase-dependent apoptosis, and enhanced cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in triple-negative breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *117*(8), 1913–1925. <https://doi.org/10.1002/jcb.25490>
- Song, L., Chen, X., Mi, L., Liu, C., Zhu, S., Yang, T., Luo, X., Zhang, Q., Lu, H., & Liang, X. (2020). Icariin-induced inhibition of SIRT6/NF- κ B triggers redox mediated apoptosis and enhances anti-tumor immunity in triple-negative breast cancer. *Cancer Science*, *111*(11), 4242–4256. <https://doi.org/10.1111/cas.14648>
- Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A.-L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(19), 10869–10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>
- Srinivasan, A., Thangavel, C., Liu, Y., Shoyele, S., Den, R. B., Selvakumar, P., & Lakshmikuttyamma, A. (2016). Quercetin regulates β -catenin signaling and reduces the migration of triple negative breast cancer. *Molecular Carcinogenesis*, *55*(5), 743–756. <https://doi.org/10.1002/mc.22318>
- Steed, K. L., Jordan, H. R., & Tollefsbol, T. O. (2020). SAHA and EGCG promote apoptosis in triple-negative breast cancer cells, possibly through the modulation of cIAP2. *Anticancer Research*, *40*(1), 9–26. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13922>
- Sun, C., Mezzadra, R., & Schumacher, T. N. (2018). Regulation and function of the PD-L1 checkpoint. *Immunity*, *48*(3), 434–452. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.014>
- Sun, Y.-S., Zhao, Z., Yang, Z.-N., Xu, F., Lu, H.-J., Zhu, Z.-Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P.-P., & Zhu, H.-P. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, *13*(11), 1387–1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tao, Y., Mao, J., Zhang, Q., & Li, L. (2011). Overexpression of Hedgehog signaling molecules and its involvement in triple-negative breast cancer. *Oncology Letters*, *2*(5), 995–1001. <https://doi.org/10.3892/ol.2011.357>
- Tečić Vuger, A., Šeparović, R., Vazdar, L., Pavlović, M., Linarić, P., Šitić, S., Šepetavc, M., & Vrbanec, D. (2021). Immunity and cancer: role of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer. *Libri Oncologici Croatian Journal of Oncology*, *49*(1), 20–28. <https://doi.org/10.20471/LO.2021.49.01.03>
- The Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *490*(7418), 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Vachetta, V. S., Marder, M., Troncoso, M. F., & Elola, M. T. (2022). Opportunities, obstacles and current challenges of flavonoids for luminal and triple-negative breast cancer therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, *6*, 100077. <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2022.100077>
- Varghese, E., Liskova, A., Kubatka, P., Samuel, S. M., & Büsselberg, D. (2020). Anti-angiogenic effects of phytochemicals on miRNA regulating breast cancer progression. *Biomolecules*, *10*(2), 191. <https://doi.org/10.3390/biom10020191>
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, *36*(3), 131–149. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x>
- von Minckwitz, G., Untch, M., Blohmer, J.-U., Costa, S. D., Eidtmann, H., Fasching, P. A., Gerber, B., Eiermann, W., Hilfrich, J., Huober, J., Jackisch, C., Kaufmann, M., Konecny, G. E., Denkert, C., Nekljudova, V., Mehta, K., & Loibl, S. (2012). Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, *30*(15), 1796–1804. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.8595>

- World Health Organization (2024). *Breast cancer*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> (pristupljeno 16. 8. 2024.).
- Yang, Y., Wolfram, J., Boom, K., Fang, X., Shen, H., & Ferrari, M. (2013). Hesperetin impairs glucose uptake and inhibits proliferation of breast cancer cells. *Cell Biochemistry and Function*, *31*(5), 374–379. <https://doi.org/10.1002/cbf.2905>
- Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W., & Yu, S. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, *22*(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>
- Zhang, H.-W., Hu, J.-J., Fu, R.-Q., Liu, X., Zhang, Y.-H., Li, J., Liu, L., Li, Y.-N., Deng, Q., Luo, Q.-S., Ouyang, Q., & Gao, N. (2018). Flavonoids inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy through downregulation of PI3K γ mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K/ULK signaling pathway in human breast cancer cells. *Scientific Reports*, *8*(1), 11255. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29308-7>
- Zhang, Z., Zhang, R., & Li, D. (2023). Molecular biology mechanisms and emerging therapeutics of triple-negative breast cancer. *Biologics: Targets and Therapy*, *17*, 113–128. <https://doi.org/10.2147/BTT.S426392>

9. Životopis

Rođena sam 13. 2. 2003. u Dubrovniku. Osnovnu školu Marina Držića u Dubrovniku završila sam 2017. godine nakon čega sam upisala II. gimnaziju u Zagrebu. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja bila sam kategorizirana tenisačica pri Hrvatskom olimpijskom odboru. Bila sam viceprvakinja Hrvatske u kategoriji do 14 godina, prvakinja Hrvatske u kategoriji parova do 14 i 16 godina te s tenis klubom Top Spin ekipna prvakinja Hrvatske do 18 godina (2019. i 2021.) i viceprvakinja I. seniorske lige (2019. i 2022.). Upisala sam sveučilišni prijediplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu 2021. godine. Tijekom studija sam volontirala na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja (SiSB) 2023. godine i bila voditeljica radionice u sklopu znanstvene manifestacije Dan i noć na PMF-u 2024. godine. Tijekom akademske godine 2023./2024. obavljala sam laboratorijsku stručnu praksu u Laboratoriju za epigenetiku pod mentorstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš. Dobitnica sam stipendije grada Dubrovnika za nadarene studente.