

# Sfingolipidi kao biomarkeri u dijagnostici i terapiji raka

---

Peruč, Marta

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:027763>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**

Repository / Repozitorij:

BIotech

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)





SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Marta Peruč

SFINGOLIPIDI KAO BIOMARKERI U DIJAGNOSTICI I TERAPIJI RAKA

Završni rad

Rijeka, 2020.



SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Marta Peruč

SFINGOLIPIDI KAO BIOMARKERI U DIJAGNOSTICI I TERAPIJI RAKA

Završni rad

Rijeka, 2020.

Mentor rada: Izv. prof. dr.sc. Mirela Sedić

Završni rad obranjen je dana 18. rujna, 2020.

pred povjerenstvom:

1. Izv. prof. dr. sc. Elitza Markova-Car
2. Doc. Dr. sc. Sanja Dević Pavlić
3. Izv. prof. dr. sc. Mirela Sedić

Rad ima 42 stranice, 8 slika, 0 tablica i 52 literaturna navoda

## SAŽETAK

Sfingolipidi predstavljaju važne komponente membrana eukariotskih stanica, stoga imaju ulogu u regulaciji brojnih staničnih signalnih puteva. U ovom završnom radu cilj je utvrditi koji bioaktivni sfingolipidi i njihovi metabolički enzimi mogu služiti kao potencijalni dijagnostički, prognostički i prediktivni biomarkeri u nekoliko tipova raka, uključujući rak jetre, debelog crijeva i dojke. Biomarkeri su po definiciji objektivne, kvantificirajuće karakteristike bioloških procesa stoga su važni za pravovremeno otkrivanje, dijagnozu, prevenciju te uspješno liječenje bolesti. Brojne su studije pokazale značajnu povezanost između metabolizma sfingolipida i kliničkog ishoda bolesti. Takvi rezultati daju veliku važnost sfingolipidima kao biomarkera u dijagnozi i prognozi raka. Kako bi se uspješno otkrila složena patofiziologija uključena u rak te put genetskih promjena stanica raka, potreban je širok raspon različitih sfingolipidnih biomarkera za poboljšanje osjetljivosti i specifičnosti biomarkera potrebne za istraživanje. Pri tome se naglasak stavlja na pro-apoptotički ceramid, pro-proliferativni sfingozin, ceramid-1-fosfat (C1P), sfingozin-1-fosfat (S1P) te na brojne enzime koji sudjeluju u metabolizmu sfingolipida. Stoga će poremećaj metabolizma i sfingolipidnog reostata u organizmu dovesti do gubitka optimalne razine sfingolipida što upućuje na razvoj kancerogenog stanja.

Ključne riječi: *sfingolipidi, biomarkeri, rak, metabolizam, sfingolipidni reostat*

## ABSTRACT

Sphingolipids are important components of eukaryotic cell membranes that have a role in regulating numerous cellular signals. In this final assignment, the aim is to determine which bioactive sphingolipids and their metabolic enzymes can be potential diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in several types of cancer, including liver, colon, and breast cancer. Biomarkers are by definition objective, quantifiable characteristics of biological processes and therefore important for early detection, diagnosis, prevention, and successful treatment of the disease. Numerous studies show a significant association between sphingolipid metabolism and clinical disease outcomes. Such results give big importance to sphingolipids as biomarkers in the diagnosis and prognosis of cancer. Successful determination of complex pathophysiology involved in cancer and genetic change in cancer cells, demands the use of panel of different sphingolipid biomarkers to improve sensitivity and specificity of biomarkers needed for research. Emphasis is on the use of pro-apoptotic ceramide, pro-proliferative sphingosine, ceramide-1-phosphate (C1P), sphingosine-1-phosphate (S1P), and numerous enzymes involved in the metabolism of sphingolipids. Therefore, disruption of metabolism and sphingolipid rheostat in the organism will lead to loss of optimal sphingolipid levels leading to the development of a cancerous condition.

*Keywords: sphingolipids, biomarkers, cancer, metabolism, sphingolipid rheostat*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. SVRHA RADA.....	3
3. BIOMARKERI.....	4
3.1. KLASIFIKACIJA I KARAKTERISTIKE BIOMARKERA.....	4
3.2. BIOMARKERI RAKA.....	6
3.3. STANJE RAZVOJA U KLINIČKOJ ONKOLOGIJI .....	7
4. UVOD U SFINGOLIPIDE .....	9
4.1. PODJELA I STRUKTURA SFINGOLIPIDA .....	10
4.1.1. SFINGOIDNE BAZE .....	10
4.1.2. CERAMIDI.....	11
4.2. SINTEZA I RAZGRADNJA SFINGOLIPIDA .....	12
4.3. METABOLIZAM SFINGOLIPIDA U SIGNALIZACIJI I TERAPIJI RAKA .....	15
4.3.1. SFINGOZIN-1-FOSFAT.....	16
4.3.2. ENDOGENI CERAMIDI .....	20
5. SFINGOLIPIDNI BIOMARKERI U PROGNOZI I STRATIFIKACIJI RAKA .	23
5.1. RAK JETRE .....	23
5.2. RAK DEBELOG CRIJEVA.....	24
5.3. RAK DOJKE.....	27
6. ZAKLJUČAK.....	31
7. POPIS LITERATURE I IZVORA.....	33
8. POPIS SLIKA .....	40
9. ŽIVOTOPIS .....	41

## 1. UVOD

Glavni izazov u kontroli i prevenciji raka je pravovremeno otkrivanje bolesti kako bi se učinkovitom terapijom doprinijelo smanjenju mortaliteta i morbiditeta. U tim slučajevima važnu ulogu imaju biomarkeri kao „molekularni signalizatori“ fiziološkog stanja stanice u određenom trenutku. Tijekom napredovanja stanice kroz složene procese transformacije u kancerogeno stanje, stanica proizvodi aktivne gene, proteinske produkte i druge organske tvari koje predstavljaju biomarkere koji bi se mogli pokazati korisnima za ranu identifikaciju raka ili podložnosti za razvitak raka kod nekih pacijenata.<sup>[1]</sup>

Dakle, biomarkeri su po definiciji objektivne, kvantificirajuće karakteristike bioloških procesa, odnosno molekule koje ukazuju na normalan ili nenormalan proces koji se odvija u našem tijelu te može biti znak osnovnog stanja ili bolesti. Biomarkeri mogu biti različite vrste molekula poput DNA, proteina ili lipida te mogu upućivati na određeno stanje organizma. Može ih proizvesti tkivo raka ili druge stanice u tijelu kao odgovor na rak, a mogu se pronaći i u krvi, stolici, urinu, tumorskom tkivu ili drugim tkivima i tjelesnim tekućinama. Važno je napomenuti da biomarkeri nisu ograničeni na rak jer postoje i biomarkeri za bolesti srca, multiple skleroze i mnoge druge bolesti.<sup>[2,3]</sup> Drugim riječima, biomarker je karakteristika koja odražava stanje organizma te služi kao pokazatelj normalnih ili patogenih bioloških procesa te farmakološkog odgovora na terapijsku intervenciju.<sup>[2]</sup> Također, mogu odražavati čitav spektar bolesti od najranijih manifestacija do terminalnih stadija. Osim toga, u praksi uključuju i alate i tehnologije koje mogu pomoći u određivanju uzroka, dijagnoze, napredovanja, regresije ili ishoda liječenja bolesti.<sup>[4]</sup>

Iako je pojam „biomarker“ relativno nov, biomarkeri su korišteni u predkliničkim i kliničkim istraživanjima dugi niz godina. Koristile su ga brojne generacije epidemiologa, liječnika i znanstvenika za proučavanje bolesti ljudi. Stoga je njihova primjena u istraživanjima te kliničkoj praksi, odnosno dijagnostici i upravljanju kardiovaskularnim bolestima, rakom,



infekcijama, imunološkim te genetskim poremećajima danas vrlo uobičajena te gotovo neizbježna. Prvi primjeri biomarkera uključuju određivanje razine glukoze u krvi za postavljanje dijagnoze i liječenje dijabetesa te kolesterolemije i time analizu kardiovaskularnog rizika. Povećanje upotrebe biomarkera omogućeno je zbog dostupnosti novih genetskih informacija i genomskih tehnologija. Osim toga, još jedan pokretač korištenja biomarkera je potreba za boljim diferencijalnim dijagnozama kao i brojem ciljanih terapija, posebice na području onkologije. Primjenjuje se i u inovativnim pristupima poput regenerativne medicine.<sup>[5]</sup>

Nedavne translacijske studije karcinoma pružile su brojne dokaze koji podupiru povezanost između metabolizma sfingolipida i kliničkog ishoda bolesti, što potvrđuje veliku važnost sfingolipida kao biomarkera u dijagnozi i prognozi raka.<sup>[6]</sup> Sfingolipidi predstavljaju jednu od glavnih vrsta eukariotskih lipida te igraju važnu ulogu u širokom rasponu bioloških procesa. Prvi sfingolipidi izolirani su krajem 19. stoljeća, a biokemijski pristupi razvijeni u prvom dijelu 20. stoljeća omogućili su otkrivanje kemijske strukture sfingozina te kako ga možemo razlikovati od ostalih lipida. Nakon toga uslijedilo je otkriće različitih vrsta složenih sfingolipida.<sup>[7]</sup> Sfingolipidi poput ceramida i sfingosin-1-fosfata (S1P) su signalne molekule ključne u regulaciji sudbine stanica raznih vrsta organizama, uključujući kvasca, biljaka, kralježnjaka i beskralježnjaka. Dok ceramidi potiču stanične smrtne putove poput starenja i apoptoze, S1P potiče staničnu proliferaciju i putove preživljavanja. Kontrola sudbine stanica pomoću ova dva međusobno konvertirana lipida nazvana je sfingolipidni reostat ili sfingolipidni biostat.<sup>[8]</sup> Osim toga, pokazalo se da razine bioaktivnih sfingolipida koreliraju s preživljavanjem pacijenta te odgovorom na terapiju različitih tipova tumora.<sup>[6]</sup>

## 2. SVRHA RADA

Svrha ovoga rada je ukazati na veliku važnost biomarkera u kliničkim istraživanjima te dijagnostici i upravljanju širokim spektrom različitih bolesti od najranijih do terminalnih stadija.

Cilj je napraviti sveobuhvatni pregled bioaktivnih sfingolipidnih vrsta te enzima koji reguliraju njihov metabolizam i signalizaciju kao potencijalne biomarkere u procjeni rizika te prevenciji i predviđanju reakcije na liječenje kod nekoliko vrsta karcinoma. Također, namjera je pokazati da su s kliničke točke gledišta, bioaktivni sfingolipidi korisni kao biomarkeri za otkrivanje tumora u ranim fazama bolesti poput raka jetre, debelog crijeva i dojke. Dakle, važno je prepoznati ulogu sfingolipida za razlikovanje malignih od nemalignih lezija, ali i kao potencijalne mete novih terapija. Ukratko, cilj je naglasiti da je metabolizam sfingolipida značajno povezan s napredovanjem raka.

Naposljetku je namjera napraviti kritički pregled trenutnih problema vezanih uz uvođenje dijagnoze bazirane na sfingolipidima u kliničku praksu te predložiti kako bi se ti problemi mogli riješiti.

### 3. BIOMARKERI

#### 3.1. KLASIFIKACIJA I KARAKTERISTIKE BIOMARKERA

Općenito, biomarkeri se mogu klasificirati na temelju njihove uloge u različitim stadijima i stanjima bolesti: biomarkeri rizika koji daju uvid u predispoziciju za razvitak bolesti kod zdravih ljudi, dijagnostički biomarkeri koji otkrivaju je li bolest već prisutna te omogućavaju detekciju u ranim fazama bolesti, predikcijski biomarkeri koji daju naznake vjerojatnog učinka terapije na pacijenta, prognostički biomarkeri koji se koriste za proučavanje napredovanja bolesti neovisno o liječenju te za određivanje mogućeg uzroka bolesti, biomarkeri vezani uz lijekove koji pokazuju hoće li lijek biti učinkovit i/ili siguran kod pacijenta te kako će pacijentovo tijelo procesuirati taj lijek, monitoring biomarkeri korisni kod kroničnih bolesnika ili u bolesnika s remisijom za praćenje učinkovitosti liječenja te rezistencije na liječenje te farmakodinamički biomarkeri koji pomažu u odabiru doze kemoterapije i drugih lijekova.<sup>[5,9]</sup>

Također, biomarkere je moguće podijeliti na temelju različitih vrsta biomolekula poput biomarkera na bazi DNA ili RNA, proteinskih te ugljikohidratnih i lipidnih biomarkera.<sup>[5]</sup> Cirkulirajuća DNA je među prvim biomarkerima procijenjenima za određeni stadij raka. Povećana koncentracija serumske DNA povezana je uz rak, najčešće metastatski, i drugim stanjima kao što su sepsa i autoimune bolesti.<sup>[9]</sup> Proteini su konačni rezultat genske ekspresije te ih je moguće modificirati ko- i post-translacijski kako bi se dodatno regulirala razmjena informacija. Dakle, proteini su lako dostupni biomarkeri koji nose veću količinu informacija od gena i drugih genskih materijala.<sup>[10]</sup> Također, utječu na molekularne putove u normalnim i transformiranim stanicama pa imaju važnu ulogu u pokretanju i progresiji stanja bolesti.<sup>[5]</sup> Ugljikohidrati se najviše izražavaju na površini stanica u obliku glikolipida, glikoproteina i glikana, pri čemu glikani mogu biti N- ili O- vezani. Tijekom kancerogeneze dolazi do promjene u ekspresiji tih glikana što ih čini potencijalnim biomarkerima.<sup>[9]</sup>

Lipidomičke metode se također vrlo često koriste u identifikaciji i validaciji biomarkera specifičnih za bolest. Lipidi se sastoje od kolesterola, fosfolipida na bazi glicerola i sfingolipida na bazi ceramida. Otkriveno je da je disfunkcija metabolizma lipida povezana s patogeneзом mnogih bolesti poput dijabetesa, Alzheimerove bolesti, hipertenzije i raka.<sup>[11]</sup>

Nadalje, da bi biomarkeri bili primijenjeni u širokoj kliničkoj praksi, trebaju pouzdano pružati korisne kliničke informacije. Stoga, optimalni biomarkeri, vremenski, troškovno i klinički, moraju ispunjavati četiri osnovna kriterija:

1. Lako dostižan
2. Odgovarajuća osjetljivost
3. Odgovarajuća stabilnost
4. Koristan za pacijenta kroz terapijske i dijagnostičke intervencije

Krv je najčešći izvor biomarkera jer je izložena izravno svim organima tijela. Uzorci krvi su uobičajeni za razne kliničke testove u trenutnoj upotrebi. U karcinomu jajnika, ovo može biti osobito korisno jer simptomi i znakovi nisu specifični za bolest, a trenutni dijagnostički modaliteti ne prepoznaju bolest u ranom stadiju. Ovaj stadij bolesti može rezultirati promjenama krvnih dijelova u cirkulaciji na način koji je moguće otkriti novijim tehnologijama.

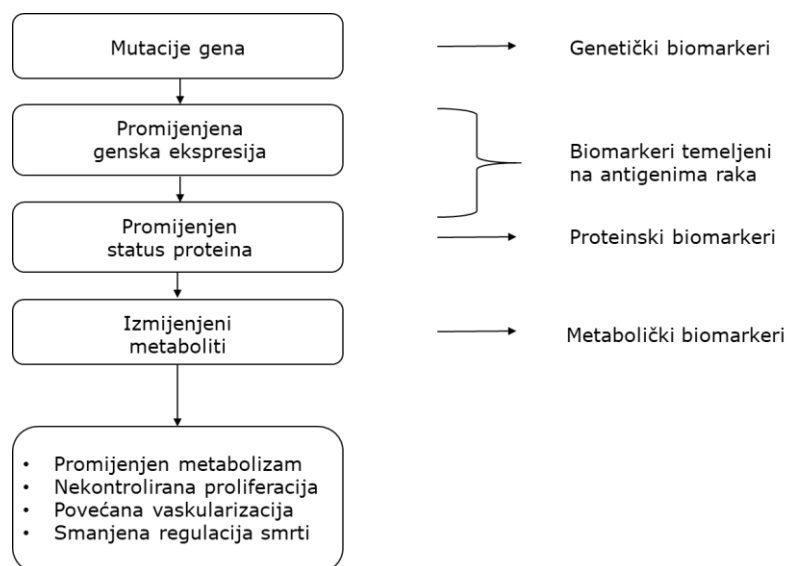
Osim toga, za uspješan biomarker je potrebno zadovoljiti ravnotežu između ciljne osjetljivosti i odgovarajuće specifičnosti. Pri tome, specifičnost, odnosno sposobnost prepoznavanja neinficiranog pacijenta često postaje progresivno teža za postići kako slučajevi postaju sve rjeđi. Primjerice, uočeno je da rak jajnika zahvaća 1 od 2500 žena u menopauzi, stoga je procijenjeno da je za ovako rijetku bolest potrebna specifičnost učinkovitog biomarkera od oko 99%.

Posljednji kriterij učinkovitog biomarkera je klinička primjenjivost. Razvoj biomarkera može imati koristi ako identificirani biomarkeri daju uvid u etiologiju, mehanizam ili terapijsku intervenciju za bolest. Međutim, kako

bi biomarkeri u konačnici bili od kliničke vrijednosti, moraju pružiti informacije koje će usmjeravati kliničku praksu te koje mogu pomoći prilikom promijene ishoda za pacijenta, poput preživljavanja bolesti ili povećanja kvalitete života. Primjerice, test krvi koji identificira prisutnost raka pluća može biti koristan ako komponente testa daju informacije o raku pluća ili ako se koristi u kombinaciji s drugim dijagnostičkim modalitetima. Testiranje na određeni biomarker zajedno s odgovarajućom i učinkovitom kliničkom intervencijom dokazano mijenja ishod, ranom dijagnozom i intervencijom, ili poboljšanom kvalitetom života i smanjenim životnim rizikom od raka.<sup>[10]</sup>

### 3.2. BIOMARKERI RAKA

Biomarkeri raka su endogeni proteini i metaboliti čiju je količinu moguće izmjeriti te na temelju toga odrediti stanje i napredovanje tumora te reakciju pacijenta na terapiju. Prisutni su u tkivima raka i tjelesnim tekućinama te obuhvaćaju širok raspon molekula, uključujući transkripcijske faktore, površinske receptore te izlučene proteine. Razvoj proteomike i genomike omogućio je proučavanje neoplastične dinamike u transformaciji stanice iz normalne u neoplastičnu tijekom koje dolazi do različitih promjena u genomskim i proteomskim osobinama stanice. Pri tome, proteomika proučava dinamiku stanice te detektira promjene u staničnim mehanizmima poput post-translacijskih modifikacija ili promjena stanične aktivnosti i funkcije. Osim toga, proučavanje staničnih i molekularnih mehanizama uključenih u transformaciju stanice važno je za otkrivanje biomarkera koji mogu biti izravan uzrok bolesti ili koji imaju sekundarnu ulogu u pokretanju i napredovanju bolesti. Detektiranje molekularnih biomarkera u različitim fazama raka, u promijenjenoj fiziologiji (Slika 1.), uvelike pomaže u analizi normalnih stanica te kako one postaju kancerogene, ali pružaju i uvid u etiologiju raka što može biti korisno za rano otkrivanje, dijagnozu i liječenje. Također, takvi biomarkeri mogu imati važnu ulogu u terapiji kao mete za djelovanje lijekova.



Slika 1 Izmijenjena fiziologija u raku koja pruža mogućnost prepoznavanja biomarkera u različitim fazama. Preuzeto iz: Sunitha Reddy M., Krishna Reddy P., Kishore Reddy A.. Biomarkers- Burgeoning Tools in Early Cancer Detection. Kishore reddy et al., Int. J. Rev. Life. Sci., 1(2), 2011, 45-55.

Stanice raka predstavljaju širok spektar genetskih promjena, poput mutacija, preuređenja gena i genske amplifikacije što naposljetku vodi do poremećaja molekulskih puteva koji imaju ulogu u regulaciji rasta, preživljavanja te metastaziranja stanice. Dešifriranje složene patofiziologije koja je uključena u rak zahtijeva uporabu panela biomarkera za poboljšanje osjetljivosti i specifičnosti biomarkera.<sup>[9]</sup>

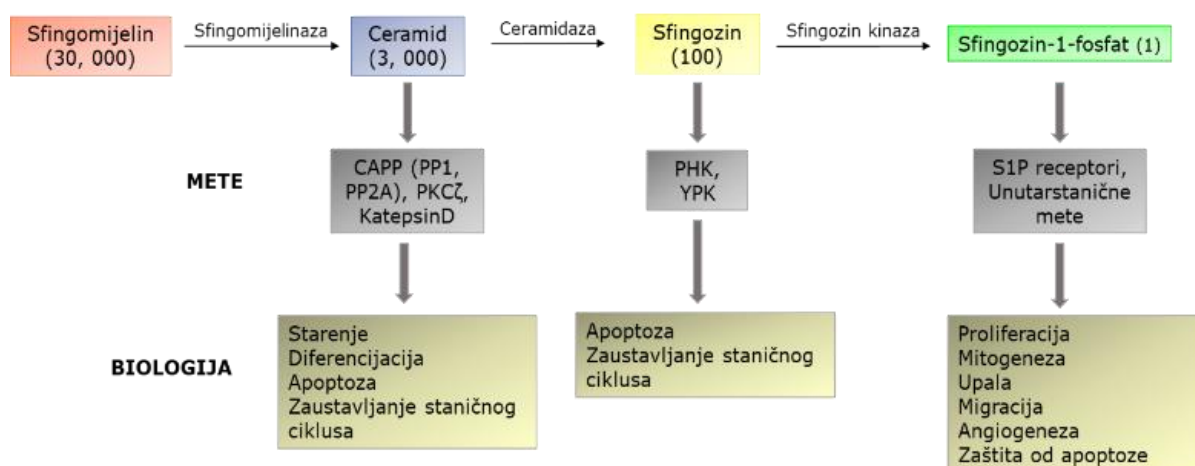
### 3.3. STANJE RAZVOJA U KLINIČKOJ ONKOLOGIJI

S obzirom da se smrtni slučajevi od raka mogu spriječiti pravovremenom detekcijom te da su postojeće terapije, posebno operativne, mnogo efikasnije u ranijim fazama raka, biomarkeri pružaju dinamičan i moćan pristup u razumijevanju spektra onkološke fiziopatologije, probiru, dijagnozi i prognozi. Abnormalna razina biomarkera može sugerirati rak, no biomarkeri u kombinaciji s biopsijom rezultiraju učinkovitim dijagnostičiranjem raka.<sup>[9]</sup> Osim toga, biomarkeri će liječnicima omogućiti da razviju individualne planove liječenja za svoje pacijente s

rakom, omogućavajući tako liječnicima da prilagode lijekove specifične za njihov tip tumora. Pritom će se poboljšati stopa reakcije na lijekove, toksičnost lijeka će biti ograničena, a troškovi povezani s testiranjem različitih terapija i pratećim liječenjem nuspojava će se smanjiti.<sup>[5]</sup> Brz rast molekularne biologije i laboratorijske tehnologije proširio se do točke u kojoj će primjena tehnički naprednih biomarkera uskoro postati još izvedivija. Molekularni biomarkeri će u rukama kliničkih istražitelja pružiti dinamičan i moćan pristup za razumijevanje spektra bolesti s očitim primjenama u analitičkoj epidemiologiji, kliničkim ispitivanjima i prevenciji te dijagnozi i liječenju bolesti.<sup>[4]</sup>

#### 4. UVOD U SFINGOLIPIDE

Sfingolipidi su vrsta lipida koja zbog svojih amfifilnih svojstava, uz fosfolipide i kolesterol, čini glavnu komponentu lipidnog dvosloja membrane pa ima važnu ulogu u održavanju funkcije i fluidnosti barijere. Međutim, moguće ih je pronaći i u tjelesnim tekućinama poput krvi kao dio cirkulirajućih lipoproteinskih čestica ili se mogu prenositi pomoću drugih proteina poput serumskog albumina. Osim toga, uzajamno djeluju sa specifičnim proteinskim metama poput fosfataza, kinaza i G-vezanih proteina ( S1P receptor) čime postižu važnu ulogu u održavanju vijabilnosti eukariotskih stanica tako što reguliraju različite biološke procese uključujući rast, proliferaciju, migraciju, invaziju i/ili metastazu te apoptozu stanica (Slika 2.).<sup>[6,12,13]</sup>



Slika 2 Prikaz biološke uloge sfingolipida. CAPP, Ser-Thr fosfataza aktivirana seramidom; PKC, protein kinaza C; PHK, homolog protein kinaze B; YPK, proteinska kinaza kvasca; S1P, sfingozin-1-fosfat. Preuzeto iz: Yusuf A. Hannun, Lina M. Obeid. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 February. 9(2):139-50.

U proteklih nekoliko desetljeća identificirani su gotovo svi glavni enzimi koji sudjeluju u metabolizmu sfingolipida te čija promijenjena ekspresija ili aktivnost ima ključnu ulogu u regulaciji signalizacije i/ili liječenja raka. Te su studije dovele do kliničkih ispitivanja na pacijentima s različitim vrstama tumora kojima je procijenjen potencijal terapijskih strategija usmjerenih na enzime koji kataboliziraju ceramid ili koji stvaraju sfingozin-1-fosfat (S1P).<sup>[12]</sup>



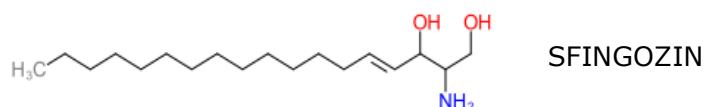
#### 4.1. PODJELA I STRUKTURA SFINGOLIPIDA

Sfingolipidi su amfipatske molekule s hidrofilnim i hidrofobnim svojstvima. Hidrofobni dio sfingolipida čini sfingoidna dugolančana baza od 18 ugljikovih amino-alkohola. Riječ je o dugolančanom alifatskom lancu sa slobodnom terminalnom hidroksilnom skupinom i masnom kiselinom vezanom na amino skupinu drugog ugljikovog atoma lanca. Dodatak lanaca masnih kiselina različitih duljina ili različitih glavnih skupina određuje biološku funkciju sfingolipida. Hidrofilni dio molekule čini terminalna hidroksilna skupina koja može biti supstituirana fosfatnom skupinom ili šećernim ostacima, ovisno o vrsti sfingolipida.<sup>[6,14]</sup>

S obzirom na strukturne razlike sfingolipidi se dijele na: sfingoidne baze, ceramide te kompleksne sfingolipide.<sup>[14]</sup>

##### 4.1.1. SFINGOIDNE BAZE

Sfingoidne baze su skupina dugolančanih amino alkohola koji predstavljaju osnovne strukturne jedinice svih sfingolipida.<sup>[15]</sup> Poznato je više od 60 različitih sfingoidnih baza, uključujući sfingoizin, dihidrosfingoizin i fitosfingoizin, koje se međusobno razlikuju po duljini i razgranatosti alkilnog lanca, stupnju zasićenosti te prema broju i položaju dvostrukih veza i hidroksilnih skupina. Sfingoizin (Slika 3.) čini glavnu okosnicu potrebnu za nastanak kompleksnih sfingolipida.<sup>[16]</sup>



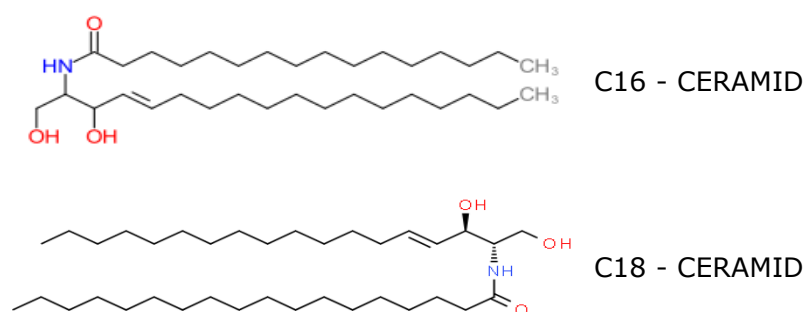
Slika 3 Sfingoidna baza sfigozin.  
Preuzeto iz: <http://www.chemspider.com>

Sfingoidne baze stupaju u interakciju sa brojnim ciljanim molekulama i specifičnim receptorima pa imaju širok raspon biološke aktivnosti. Važno je napomenuti antikoagulacijska, mikostatska i bakteriostatska svojstva sfingoidnih baza. Nadalje, imaju funkciju u modulaciji biofizičkih svojstava

bioloških membrana te time utječu na dinamiku cirkulacije.<sup>[15,17]</sup> Osim toga, pažnja je uvelike posvećena istraživanju njihove uloge u borbi protiv raka debelog crijeva, raka dojke te raznih drugih patogena.<sup>[17]</sup>

#### 4.1.2. CERAMIDI

Ceramidi su najjednostavniji bioaktivni sfingolipidi koji su sastavljeni od sfingoidne baze i masne kiseline vezane na C2 ugljik. Obično su potpuno zasićeni te se sastoje od 14 do 26 C atoma, međutim, ponekad su i duži. Varijacije u duljini alkilnog lanca uzrokovane su postojanjem 6 različitih ceramid sintaza (CERS) koje kataliziraju nastanak ceramida različitih duljina. Na slici 4. prikazana je strukturna formula ceramida izgrađenih od 16 C atoma te od 18 C atoma.



Slika 4 Ceramidi (C16 i C18).  
Preuzeto iz: <http://www.chemspider.com>

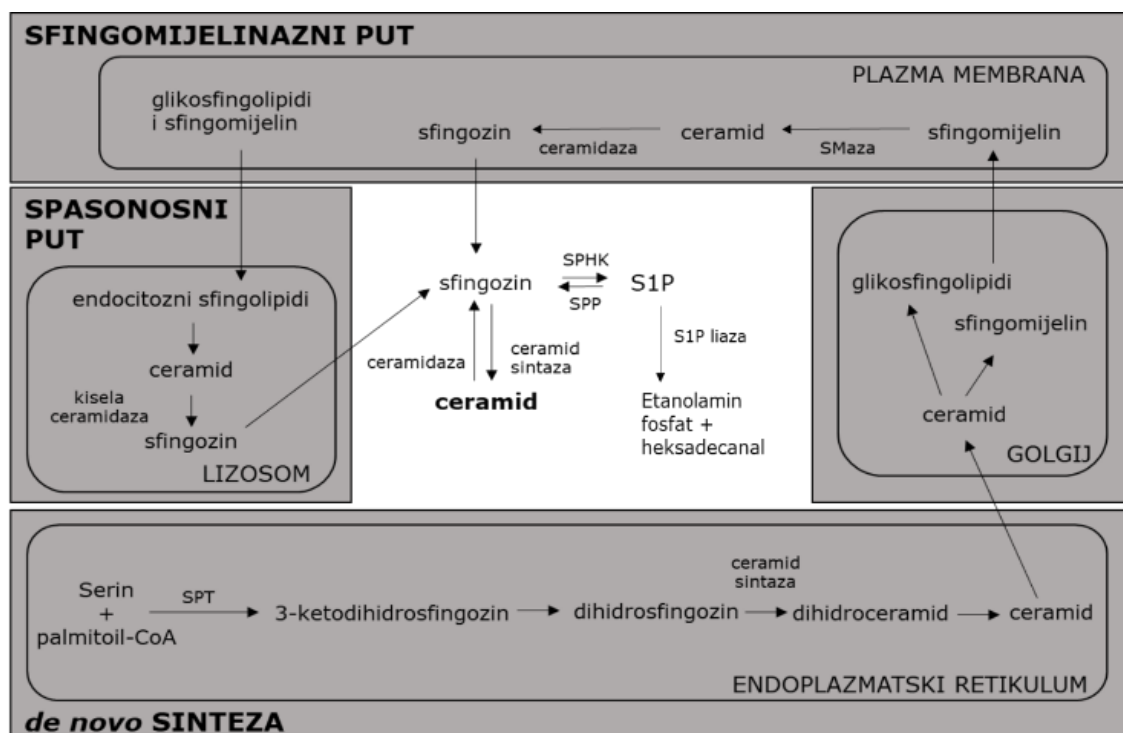
Ceramidi najčešće služe kao prekursori za formiranje složenih sfingolipida ali se može upotrijebiti i kao prekursor za formaciju drugih vrsta sfingolipida poput ceramid-1-fosfata (C1P).<sup>[6]</sup>

Osim što imaju važnu strukturnu ulogu, ceramidi su centralne molekule sfingolipidnog metabolizma te imaju važnu antiproliferativnu ulogu i ključni su za procese stanične signalizacije. Stoga, obično služe kao sekundarni glasnici u regulaciji rasta stanica, diferencijacije, migracije i stanične adhezije te starenja i apoptoze stanica. Također, zbog hidrofobnosti i pretežno zasićene prirode imaju visoku temperaturu

topljenja što im omogućuje tijesno pakiranje te segregaciju na područjima koja se nazivaju membranske "splavi". Splavovi su mikrodomene, poznate kao CRP (eng. *ceramide-rich platforms*), bogate kolesterolom i sfingolipidima te su ključne za modifikaciju receptora i signalnih molekula kako bi se olakšala stanična signalizacija. Nadalje, važni su sekundarni glasnici upalnog odgovora i apoptoze izazvane faktorom nekroze tumora, TNF- $\alpha$ . Također, mogu aktivirati kaspaze 3 i 7 i tako potaknuti apoptozu u eritrocitima. Osim toga, uključeni su u neke vrste raka, međutim, sve vrste ceramida ne igraju istu ulogu u proliferaciji ili staničnoj smrti tumorskih stanica.[18,19]

#### 4.2. SINTEZA I RAZGRADNJA SFINGOLIPIDA

Sinteza ceramida može se odvijati kroz 3 glavna puta: sinteza *de novo*, sfingomijelinazni put te put spašavanja (Slika 5.).



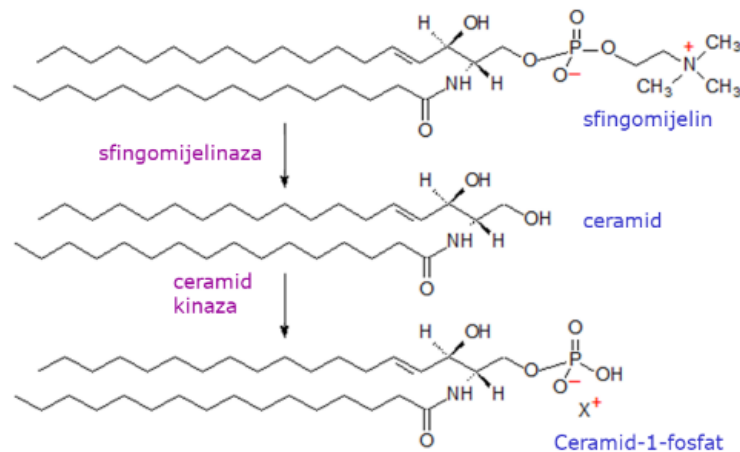
Slika 5 Prikaz puteva sinteze i razgradnje sfingolipida : *de novo* sinteza sfingolipida koja se odvija u endoplazmatskom retikulumu, sfingomijelinazni put u plazmatskoj membrani te spasonosni put koji se odvija u lizosomima. Smaza, sfingomijelinaza; SPHK, sfingozin kinaza; S1P, sfingozin-1-fosfat; SPP, S1P fosfataza; SPT, serin palmitoil transferaza. Preuzeto iz: James R Van Brocklyn, Joseph B Williams. The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: Oxidative stress and the seesaw of cell survival and death. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2012 September.163(1):26-36.

*De novo* sinteza započinje formacijom 3-ketodihidrosfingozina na citoplazmatskoj strani endoplazmatskog retikuluma (ER). Nakon redukcije 3-ketodihidrosfingozina na dihidrosfingozin, adicijom lanaca masnih kiselina različitih duljina dobiva se dihidroceramid. Posljednja reakcija naziva se *N*-acetilacija koja je katalizirana pomoću skupine enzima CERS. Postoji šest različitih CERS, a svaki pokazuje visoku specifičnost za određenu duljinu lanca acil CoA za *N*-acetilaciju što određuje sastav masnih kiselina ceramida. Tako nastali ceramid se potom može transportirati u Golgijev aparat gdje služi kao prekursor za formiranje složenih sfingolipida uključujući sfingomijelin i glikosfingolipide. Pri tome, sfingomijelini, najbrojniji sfingolipidi, nastaju adicijom glavne skupine fosfokolin što se najčešće odvija u trans-Golgiju.<sup>[6]</sup> Biosinteza glikosfingolipida odvija se postupno, pri čemu se na ceramid dodaje šećerna skupina koju glikoziltransferaze prenose od nukleotidnih davalaca šećera.<sup>[20]</sup> Za cis-Gogij je karakteristična sinteza glukozilceramida gdje glukozilceramid sintaza (GCS) katalizira adiciju UDP-glukoze na lanac ceramida. Iznimka su galaktozilceramidi koji se sintetiziraju u ER-u.

Nadalje, ceramidi se mogu proizvesti kroz sfingomijelinazni put (Slika 5.) hidrolizom kompleksnih sfingolipida u plazmatskoj membrani, primjerice sfingomijelina pomoću enzima sfingomijelinaze. Nastali ceramid se potom djelovanjem enzima ceramidaze pretvara u sfingozin koji se može fosforilirati pomoću enzima sfingozin kinaze 1 (SPHK1) i sfingozin kinaze 2 (SPHK2) dajući sfingozin-1-fosfat (S1P). Nastali S1P se dalje može razgraditi lipidnim fosfatnim fosfatazama ili pomoću S1P liaze. Osim toga, nastali ceramid se može fosforilirati pomoću enzima ceramid kinaze, najčešće u trans-Golgiju ili plazmatskoj membrani, tvoreći ceramid-1-fosfat (C1P) (Slika 6.).

Za spasonosni put (Slika 5.) je karakteristično resintetiziranje sfingolipida nakon raspada složenih sfingolipida (uglavnom u lizosomu) ponovnom ugradnjom oslobođenog sfingozina u ceramid. Nakon toga slijedi hidroliza ceramida u sfingozin i masne kiseline koje napuste lizosom, a

potom služe kao građevna jedinica za sintezu drugih ceramida pomoću CERS. Konačna razgradnja ceramida je katalizirana ceramidazama, grupom enzima koja ima specifičan afinitet prema ceramidima s određenom duljinom lanaca masnih kiselina.<sup>[6,8,13,14,21]</sup>

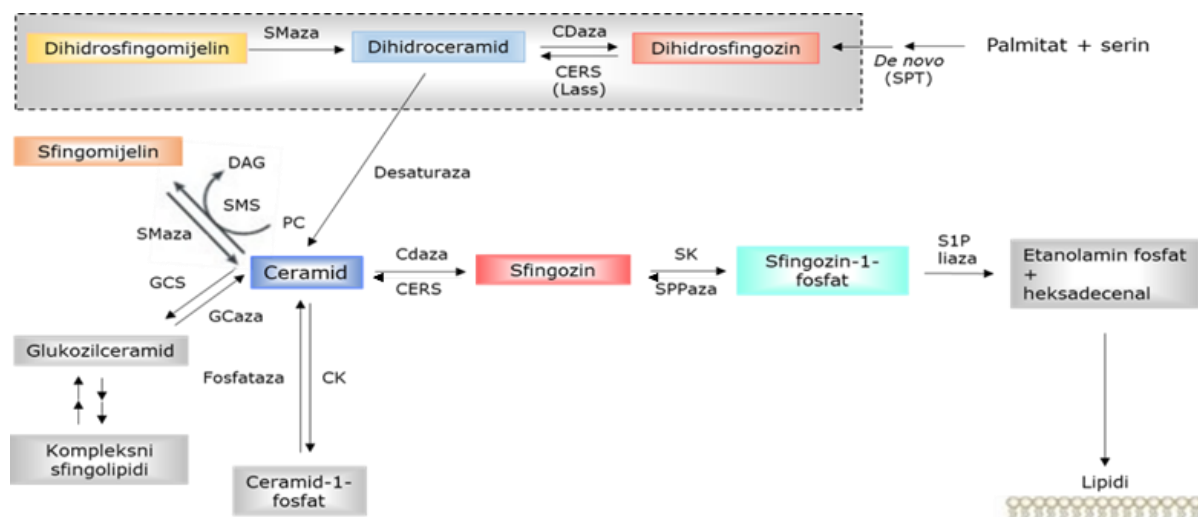


Slika 6 Biosinteza ceramid-1-fosfata.  
Preuzeto iz: <https://www.lipidhome.co.uk/lipids/sphingo/cer-1-p/index.htm>

Zbog hidrofobnih svojstava ceramida, nije moguć njegov spontani transport kroz vodeni medij citosola, stoga stanica mora pronaći put transporta ceramida s membrane ER, gdje je sintetiziran, do Golgijevog kompleksa gdje se odvija sinteza kompleksnih sfingolipida. Karakteristična su dva osnovna transportna mehanizma: vezikularni i nevezikularni transport. U nevezikularnom transportu je potreban citosolni protein koji ima ulogu proteinskog nosača (CERT) ceramida od ER do Golgijeva kompleksa. Vezikularni transport je glavni transport ceramida, najčešće potreban za sintezu glikosfingolipida, a uključuje transport istim vezikulama kojima se transportiraju proteini iz ER. Međutim, regulacija mehanizma vezikularnog transporta, a time i regulacija sinteze glikosfingolipida, je još uvijek nepoznata u potpunosti.<sup>[22]</sup>

### 4.3. METABOLIZAM SFINGOLIPIDA U SIGNALIZACIJI I TERAPIJI RAKA

Sfingolipidni reostat, važan mehanizam koji regulira sudbinu stanica, definiran je kao ravnoteža između različitih bioaktivnih sfingolipida, gdje je naglasak na pro-apoptičkom ceramidu, pro-proliferativnom sfingozinu, C1P-u te S1P-u (Slika 7.).<sup>[6,8]</sup> U mnogim tumorima taj je sfingolipidni reostat potpuno izmijenjen što dovodi do nekontrolirane proliferacije stanica.<sup>[23]</sup> Stoga je održavanje ove ravnoteže potrebno kako bi se održalo normalno funkcioniranje stanice i enzima odgovornih za produkciju ceramida te njegovu pretvorbu u S1P. U regulaciji smrti i preživljavanja stanica raka, ceramidi i sfingozin imaju oprečne uloge. Osim toga, istaknut je metabolizam sfingolipida i signalizacija koji reguliraju procese rasta stanica raka.<sup>[6,12]</sup> Tijekom razvoja raka uobičajena je pretjerana ekspresija enzima koji usmjeravaju metabolizam ceramida prema produkciji pro-proliferativnih sfingolipidnih vrsta. Dakle, kod mnogih vrsta karcinoma izvješteno je o povećanoj regulaciji ceramid kinaze, ceramidaza (uglavnom kiselih ceramidaza) te SPHK1 i SPHK2, što otvara nove puteve za terapijsku intervenciju za rak.<sup>[6]</sup>



Slika 7 Metabolizam sfingolipida. Ceramid je središnja molekula u metabolizmu sfingolipida te se može sintetizirati de novo ili hidrolizom složenih sfingolipida poput sfingomijelina djelovanjem SMaza. Pretvorbu sfingozina u ceramid kazaliraju CERS1-6. Suprotno tome, ceramid se hidrolizira CDazom čime se oslobađaju masne kiseline i sfingozin. Djelovanjem CDaza i SK (SPHK1 i SPHK2) nastaje S1P koji se dalje hidrolizira pomoću S1P liaze. Metabolizam ceramida za stvaranje složenih sfingolipida zahtjeva sintezu glukozilceramida pomoću GCaza. SMS pretvara ceramid u sfingomijelin umetanjem fosfokolina u ceramid, a CK pretvara ceramid u C1P. SMaza, sfingomijelinaza; CDaza, ceramidaza; CERS, ceramid sintaza; CK, ceramid kinaza; DAG, diacilglicerol; GCaza, glukozil ceramidaza; GCS, glukozilceramid sintaza; PC, fosfatidilkolin; SK, sfingozin kinaza; SMS, sfingomijelin sintaza; SPPaza, sfingozin fosfat fosfataza; SPT, serin palmitoil transferaza; S1P liaza, sfingozin-1-fosfat liaza.

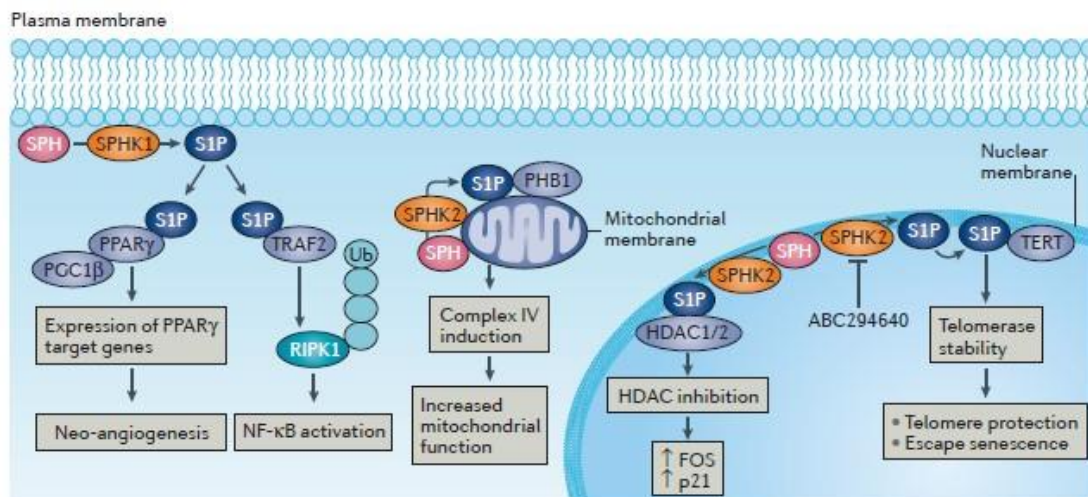
Preuzeto iz: Yusuf A. Hannun, Lina M. Obeid. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 February. 9(2):139-50.

#### 4.3.1. SFINGOZIN-1-FOSFAT

Sfingozin-1-fosfat (S1P) je bioaktivni metabolit sfingozina koji je povezan s progresijom tumora kroz pojačanu proliferaciju i pokretljivost, a nalazi se u različitim tumorskim tkivima i u mikrookolišu tumora (TME). S1P upravlja procesima koji pokreću rast i razvoj stanica karcinoma, uključujući proliferaciju, preživljavanje, migraciju, invaziju, angiogenezu, limfangiogenezu i upalu. Posreduje u interakciji između stanica raka i staničnih komponenti tumorskog mikrookoliša putem proizvodnje citokina koji inducira stromalne stanice (poput fibroblasta, imunoloških stanica i endotelnih stanica) u tumorskom mikrookolišu da bi nastale i lučile S1P, što zauzvrat potiče proliferaciju i preživljavanje stanica raka. S1P izlučen iz stanica raka aktivira S1P receptore na endotelnim stanica za promicanje angiogeneze i limfangiogenezu povezane s tumorom. Osim toga, cirkuliranje S1P može pospješiti metastazu karcinoma potiskivanjem aktivnosti citotoksičnih T-stanica vezanjem na S1P receptore na površini imunoloških stanica.

Unutarstanična koncentracija S1P je niska i čvrsto kontrolirana ravnotežom između njegove proizvodnje katalizirane sfingozin kinazama, defosforilacijom do sfingozina kataliziranom S1P fosfatazama i lipidnim fosfatnim fosfatazama (LPP) te njegovim katabolizmom kataliziranim enzimom endoplazmatskog retikuluma, S1P liazom. Sfingozin kinaze, SPHK1 i SPHK2 pripadaju skupini diacilglicerol kinaza koje kataliziraju stvaranje S1P i tako reguliraju sfingolipidni reostat te sudjeluju u određivanju aktivacije specifičnih onkogenih signalnih puteva.<sup>[12,24]</sup> Ta se dva izotipa sfingozin kinaza razlikuju po svojoj raspodjeli u tkivima, subcelularnoj lokalizaciji te svojstvima konformacije i dimerizacije. Sfingozin kinaza 1 (SPHK1) je uglavnom lokalizirana u citosolu i stvara S1P koji se transportira u izvanstanični prostor, uključujući mikrookoliš tumora. Suprotno tome, sfingozin kinaza 2 (SPHK2) se nalazi uglavnom u jezgri, mitohondriju i endoplazmatskom retikulumu te stvara S1P koji se prije svega veže na unutarstanične mete. Oba enzima mogu se izvesti iz stanica.

Dakle, SPHK1 se može izlučiti endotelnim stanicama, dok se SPHK2 cijepa kaspazom-1 u stanicama podvrgnutim apoptozi, a njezin skraćeni, enzimski aktivni fragment oslobađa se u izvanstaničnom prostoru. Izvanstanične sfingozin kinaze, kao i izlučivanje S1P iz stanica putem autokrine ili parakrine signalizacije, doprinose dostupnosti cirkulirajućeg S1P. S1P se u cirkulaciji veže se na albumin, lipoproteine niske gustoće i lipoproteine visoke gustoće, a mogu ih nositi i eritrociti. Izvanstanični S1P se defosforilira u sfingozin, najčešće djelovanjem LPP koje olakšavaju stanični ulazak sfingozina proizvedenog iz S1P izvan stanica. Kada se nađe unutar stanice, sfingozin se fosforilira natrag u S1P što pokreće unutarstaničnu signalizaciju (Slika 8.).<sup>[24]</sup>



Slika 8 Unutarstanična S1P signalizacija. Citosolni S1P proizveden od SPHK1 ima različite funkcije u usporedbi sa S1P koji je formirao SPHK2 u endoplazmatskom retikulumu i drugim membranama. Na primjer, unutarstanični S1P proizveden od TNF- $\alpha$ -aktiviranog SPHK1 specifično veže ubikvitin ligazu TNF-receptor vezujući faktor 2 (TRAF2) u citoplazmi i pokreće nizvodnu molekularnu signalizaciju što rezultira aktivacijom NF- $\kappa$ B signalizacije, koja bi mogla djelomično objasniti citoprotektivnu funkciju S1P. Također, unutarstanični S1P se može izravno vezati na receptor aktiviran peroksisomskim proliferatorom transkripcijskog faktora (PPAR) $\gamma$  u ljudskim endotelnim stanicama čime inducira povezanost PPAR $\gamma$  s koaktivatorom 1, receptorom-  $\gamma$  aktiviranim peroksisomskim proliferatorom (PGC1 $\beta$ ) u endotelnim stanicama. Osim toga, interakcija između S1P i (PPAR) $\gamma$  važna je za neoangiogenezu, što sugerira da bi S1P-PPAR $\gamma$  os mogla biti nova meta za in vivo angiogenezu i suzbijati progresiju tumora.<sup>[24]</sup>

Preuzeto iz: Besim Ogretmen. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. Nat Rev Cancer. 2018 January. 18(1):33-50.

Različiti podražaji, uključujući faktore rasta i citokine poput epidermalnog faktora rasta (EGF), faktora rasta trombocita (PDGF), vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF), faktora rasta 1 sličnog inzulinu (IGF-1), faktora nekroze tumora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ),



hormoni (npr. estrogen, estradiol) i hipoksija mogu aktivirati SPHK1 koji zatim prelazi iz citosola u plazma membranu i fosforilira sfingozin da nastane S1P. Proizvedeni S1P izvozi se iz stanica karcinoma specifičnim transportnim proteinima koji se nalaze u plazma membrani u izvanstaničnom prostoru gdje se veže i aktivira specifične G-vezane proteinske receptore, koji se nalaze na plazma membrani, na autokrini ili parakrini način (poznato kao „inside-out signalizacija“) za promicanje širenja stanica raka, migracije, invazije i preživljavanja (Slika 8.).<sup>[24]</sup>

Dakle, SPHK1 djeluje kao molekularni regulator interakcija između tumorskih stanica i stanica okolne strome putem proizvodnje S1P, stoga, ima važnu ulogu u poticanju preživljavanja, proliferacije, rasta i diferencijacije tumorskih stanica.<sup>[6]</sup> Također, nastali S1P pokreće unutarstanične procese koji dovode do angiogeneze, odnosno stvaranja novih krvnih žila potrebnih za preživljavanje tumorskih stanica, ali i do nF- $\kappa$ B aktivacije te poticanje upalnih procesa koji pridonose rastu tumora. S1P proizveden od SPHK2 u mitohondrijima i jezgri ima različite unutarstanične mete. Uključen je u epigenetsku regulaciju ekspresije gena vezanjem i inhibiranjem histon deacetilaza, HDAC1 i HDAC2, što pojačava acetilaciju histona i time uzrokuje indukciju transkripcije p21 i c-fos gena u MCF-7 stanicama karcinoma. S1P proizveden u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani pomoću SPHK2 veže se na prohibitin 2 (PHB2), protein koji ima presudnu ulogu u regulaciji funkcije mitohondrija. Interakcija između mitohondrijskih S1P i PHB2 središnja je točka za pravilno sastavljanje citokrom-C oksidaze i mitohondrijske respiracije, stoga igra važnu ulogu u održavanju funkcije mitohondrija (Slika 8.).<sup>[12,24]</sup>

Uništavanjem funkcije SPHK1 enzima doći će do smanjene razine S1P, povećane razine ceramida te inhibicije rasta, proliferacije, invazije i migracije tumorskih stanica *in vitro* različitih vrsta karcinoma.<sup>[6]</sup> U meta-analizi (eng. *meta-analysis*) kliničkih studija povećana ekspresija SPHK1 mRNA ukazivala je na lošu prognozu i smanjeno preživljavanje bolesnika s različitim tipovima raka.<sup>[12]</sup> *In vivo* eksperimenti na miševima pokazali su

da ko-injekcija stanica melanoma s divljim tipom kožnih fibroblasta vidljivo potiče rast tumora i razvoj metastaza u odnosu na miševe kojima su ko-injektirani SPHK1<sup>-/-</sup> fibroblasti.<sup>[6]</sup> Također, SPHK1 je prekomjerno eksprimiran u slučajevima karcinoma debelog crijeva, gdje su miševi kojima su ko-injektirani SPHK1<sup>-/-</sup>-fibroblasti te koji su bili izloženi azoksimetanu, razvili manje tumora debelog crijeva od SPHK1 miševa divljeg tipa.<sup>[12]</sup> Dakle, dokazana je uloga SPHK1 kao regulatora unakrsne komunikacije između kožnih fibroblasta i stanica melanoma, što se smatra kritičnim za razvoj metastaza.

Općenito vrijedi da SPHK1 ima ulogu u poticanju preživljavanja tumorskih stanica, dok SPHK2 djeluje suprotno tako da potiče apoptozu tumorskih stanica. Međutim, važno je napomenuti da je biološka funkcija SPHK2 u stanicama raka determinirana razinom njihove ekspresije. Dakle, visoke razine ekspresije SPHK2 reduciraju staničnu proliferaciju i preživljavanje, dok niska ekspresija SPHK2 doprinosi staničnom rastu i proliferaciji, inducira onkogenu signalizaciju i neoplastičnu transformaciju *in vitro* te provodi formaciju tumora *in vivo*. Osim toga, SPHK2 ima ulogu u epigenetičkoj regulaciji pri čemu dolazi do blokiranja histonske deacetilacije te posljedično acetilacije histona i povećane transkripcije gena p21 koji je ujedno i ključni regulator staničnog ciklusa. Također, štiti telomere od skraćivanja i na taj način produljuje život tumorskim stanicama (Slika 8.).<sup>[6,12]</sup>

Izlučeni S1P prenosi signale vezanjem na pet različitih plazma membranskih G-vezanih proteinskih receptora (S1P1–5). Ovi receptori se povezuju s različitim G proteinima koji kontroliraju različite puteve transdukcije signala, uključujući Rho obitelj, JNK, AKT/ERK, PLC/Ca<sup>2+</sup> i adenilat ciklazu kako bi se pospješilo preživljavanje, proliferacija, angiogeneza i migracija stanica. S1PR1 je spojen isključivo s Gi proteinom čija aktivacija rezultira aktivacijom Ras/MEK/ERK i PI-3-kinaza/AKT putova za promicanje mitogenog i pro-preživljavajućeg signala, a također i aktiviranjem GTPaze Rac iz porodice Rho, koji regulira migraciju stanica i

stvaranje lamelipodije. S1PR1 također može aktivirati fosfolipazu C (PLC) čime inducira mobilizaciju  $Ca^{2+}$ . S1PR2 ima suprotnu ulogu u stanicama karcinoma. Može se vezati na više G $\alpha$  proteina, kao što su G $i$ , G12/13 i G $q$ , te na taj način može inducirati različite signalne puteve. Vezanjem na G12/13 dovodi do aktivacije RhoA i nadalje inhibicije Rac i AKT koji potom inhibiraju staničnu migraciju i staničnu proliferaciju. Suprotno tome, može aktivirati Ras/ERK i PI-3-kinazu putem G $i$  aktivacije za promicanje proliferacije i sprječavanje apoptoze. S1PR3 se također veže na različite G proteinima, uključujući G $i$ , G12/13 i G $q$ . Slično kao S1PR1, S1PR3 promiče migraciju putem Rac puta vezanjem na G $i$ . Osim toga, pokreće signalizaciju putem Ras/ERK i PI-3-kinaze preko G $i$  kako bi se potaknuli mitogeni/propreživljavajući učinci S1P. S1PR4 se pretežno nalazi u limfoidnom sustavu, što ukazuje na njegovu važnu ulogu u imunološkom odgovoru. Nedavna studija pružila je dokaze koji podupiru ulogu S1PR4 kao potencijalnog regulatora antitumorske imunosti. Za S1PR5 je pokazano da podržava rast i preživljavanje stanica karcinoma.

LPP sisavaca sastoji se od tri izoforme: LPP1, LPP2 i LPP3. Prethodne studije pokazale su nisku razinu ekspresije LPP1 i LPP3 u različitim stanicama raka i tumorima, dok je povećana ekspresija LPP2 povezana s transformacijom stanica i ubrzanim ulaskom u S-fazu staničnog ciklusa, što sugerira da LPP2 ima suprotan učinak za rast stanica raka u usporedbi s LPP1 i LPP3.<sup>[24]</sup>

#### 4.3.2. ENDOGENI CERAMIDI

Endogeni ceramidi se sintetiziraju *de novo* putem koji započinje kondenzacijom serina i palmitoil-CoA djelovanjem serinske palmitoiltransferaze (SPT). Time nastaje 3-ketodihidrosfingozin koji se potom reducira djelovanjem 3-ketosfingozin reduktaze na dihidrosfingozin. Zatim slijedi sinteza dihidroceramida djelovanjem ceramid sintaza (CERS1-6), a naposljetku se pomoću enzima dihidroceramid destaturaza (DES) dobije ceramid (Slika 7.).<sup>[12]</sup> Pokazano je da endogeni ceramidi imaju

suprotnu ulogu u regulaciji rasta i preživljavanja stanica raka ovisno o duljinama lanaca masnih kiselina, što dovodi u važnost CERS u patogenezi raka.<sup>[6]</sup> CERS1–6 su specijalizirani za sintezu ceramida s različitim duljinama acilnog lanca, stoga, CERS1 i CERS4 stvaraju C18–20 ceramide, CERS5 i CERS6 C14–16 ceramide, a CERS2 selektivno stvara C22–24 ceramide. CERS3 posreduje u sintezi C28–32 ceramida koji su posebno izraženi u testisima i kožnim tkivima. Ispitivanja stanica karcinoma glave i vrata (HNSCC) pokazala su da C16 ceramid proizveden djelovanjem CERS6 promovira tumorsku proliferaciju. Suprotno tome, C18 ceramid proizveden djelovanjem CERS1 inhibira tumorski rast, odnosno inducira mitofagiju u stanicama glave i vrata te u staničnim linijama akutne mijelonične leukemije (AML).<sup>[6,12]</sup> Osim toga, pretjerana ekspresija CERS4 i CERS6 u stanicama raka dojke i debelog crijeva izaziva stvaranje ceramida kratkih lanaca, poput C16:0, C18:0 i C20:0 ceramida, što oslabljuje staničnu proliferaciju i potiče apoptozu, dok povećana regulacija CERS2 olakšava staničnu proliferaciju. Dodatno, ko-ekspresija CERS sa CERS4 i CERS6 u stanicama raka debelog crijeva poništava supresiju proliferacije stanica i indukciju apoptoze potaknute dugolančanim ceramidima. Na temelju toga moguće je zaključiti da ravnoteža između veoma dugih i dugih lanaca ceramida upravlja ponašanjem stanica te da disregulacija razine različitih vrsta ceramida dovodi do tumorigeneze.<sup>[6]</sup>

Uzimajući u obzir da pretvorba ceramida u sfingozin posreduje enzim kiselina ceramidaza (eng. acid ceramidase, CDase) (ASAH1) čime se održava reostat između tumor-supresora i tumor-promotora, moguće je zaključiti da je aberantna regulacija ceramidnih metaboličkih enzima također povezana sa tumorigenezom (Slika 7.). Akumulacija ASAH1 detektirana je u različitim tumorima, što sugerira njihov pro-proliferativni i pro-preživljavajući učinak. Takvo svojstvo enzima stanicama raka omogućava povećavanje ekspresije tumor-promotora sfingozina unutar stanica, stvarajući tako povoljno okruženje za rast karcinoma. Zbog svojih karakterističnih svojstava kisele ceramidaze predstavljaju ulogu u

stvaranju obećavajuće terapije raka. Stoga, ciljanje ASAH1 u raku prostate, dojke, debelog crijeva, hepatocelularnom raku, HNSCC-u, melanoma stanicama i leukemiji smatra se glavnom strategijom u borbi protiv ovih malignih bolesti. Pokazano je da indukcija apoptoze posredovana inhibicijom ceramidaza povećava učinkovitost konvencionalne kemoterapije u nekoliko modela karcinoma.<sup>[6,23]</sup>

Glukozilceramid sintaza (GCS) također je enzim svojstven metabolizmu ceramida, a katalizira prijenos glukoze u ceramid, što predstavlja početni korak u biosintezi glikolipida te određuje brzinu reakcija (Slika 7.). Poznat već dugi niz godina kao enzim koji usmjerava sintezu cerebrozida i gangliozida, GCS je nedavno uključen u citotoksični odgovor stanica raka na kemoterapiju. Stoga je važno napomenuti da ravnoteža između ceramida i glukozilceramida ili nekih drugih glikosfingolipida kontrolira stanično ponašanje i rast, gdje GCS predvodi ravnotežu u korist proizvodnje metabolita koji potiču maligni rast. Osim toga, prepoznato je da je toksični odgovor stanica na kemoterapiju smanjen kada je aktivnost GCS povećana ili povećan kada je aktivnost GCS blokirana. Kontinuirana ceramidna glikozilacija koja je rezultat prekomjerne ekspresije GCS potiče progresiju raka preko regulacije ekspresije gena povezanih s metastazama tumora. Stoga je povećana ekspresija GCS najčešće prepoznata kao uzrok stečene otpornosti na lijekove u različitim tipovima stanica raka uključujući rak dojke, jajnika, debelog crijeva, grlića maternice, leukemiju i glioblastom. Genetska ili farmakološka inhibicija GCS povećava osjetljivost stanica raka otpornih na lijekove uključujući rak glave i vrata, pluća i malignog pleuralnog mezotelioma, rak gušterače te hepatocelularni rak na različite antikancerogene lijekove *in vitro* i *in vivo*, što jasno ukazuje na to da ciljanje GCS također može biti učinkovita strategija za suzbijanje rezistencije na lijekove protiv raka.<sup>[6,25]</sup>

## 5. SFINGOLIPIDNI BIOMARKERI U PROGNOZI I STRATIFIKACIJI RAKA

### 5.1. RAK JETRE

Rak jetre postao je najčešća primarna malignost jetre. Najčešći oblik raka jetre je hepatocelularni karcinom (HCC) koji je ujedno i treći vodeći uzrok smrti od raka u svijetu. Uglavnom se razvija kod bolesnika s kroničnom bolešću jetre ili cirozom.<sup>[6,26]</sup>

Nedavne studije su pokazale prognostički potencijal jednostavnih sfingolipida i njihovih metaboličkih enzima. Otkrića pokazuju da je ekspresija SPHK1 i SPHK2 enzima povećana u tkivima pacijenata koji boluju od HCC u odnosu na ne-tumorsko tkivo podudarno na razini mRNA i proteina, a koje je koreliralo i na razini veličine i stadija tumora, stupnja diferencijacije i mikrovaskularne invazije.<sup>[27,28]</sup> Osim toga, pacijenti kod kojih je uočena povećana ekspresija SPHK1 imali su manju stopu preživljavanja u odnosu na one kod kojih je ekspresija SPHK1 bila smanjena, što upućuje na to da povećana regulacija SPHK1 može biti indikator za lošu prognozu raka. Također, jedna je studija potvrdila da je povećana razina mRNA SPHK2 ukazivala na rizik od unutar- ili van-hepatičkog recidiva.<sup>[28]</sup> Dakle, općenito vrijedi da je u slučaju hepatocelularnog karcinoma ekspresija obje izoforme sfingozin kinaza povećana. Unatoč tome, neke su studije pokazale da su razine njihova produkta S1P smanjene u HCC tkivima u odnosu na ne-tumorska tkiva.<sup>[28]</sup> To može biti rezultat povećane razgradnje S1P zbog povišene razine mRNA S1P-liaza u HCC tkivima u odnosu na ne-tumorska tkiva. Suprotno tome, pokazalo se da su razine S1P i njegovog prekursorskog sfingozina u serumu pacijenata sa HCC bile povišene u odnosu na pacijente sa cirozom, što upućuje na dijagnostičku važnost dugolančanih sfingoidnih baza u nadzoru HCC.<sup>[29,30]</sup>

Također, pokazalo se da su razine različitih vrsta ceramida smanjene u HCC tkivima u odnosu na podudarna ne-tumorska tkiva.<sup>[6]</sup> S1P je visoko bioaktivni sfingolipid koji potiče staničnu proliferaciju, a S1P fosfataza je

enzim potreban za hidrolizu fosfatne skupine iz S1P. Represija S1P fosfataze bi stoga uzrokovala niske razine ceramida i visoke razine S1P, što može dovesti do proliferacije stanica i otpornosti na lijekove. Dakle, stanice raka razvijaju različite obrambene mehanizme na djelovanje ceramida, uključujući smanjenje njihove proizvodnje i/ili pojačani klirens te proizvodnju pro-proliferativnog S1P.<sup>[26]</sup>

Suprotno tome, uočen je značajni porast serumskih dugolančanih i vrlo-dugolančanih ceramida (C16-C24) u pacijenata sa HCC u odnosu na pacijente sa cirozom jetre, među kojima je C16 ceramid u korelaciji sa markerima hepatocelularne ozlijede. Slično tome su Krautbauer i sur. pružili dokaze za povezanost između omjera dugolančanih i vrlo-dugolančanih ceramida i stupnja ozlijede jetre.<sup>[29]</sup>

Dakle, ova otkrića ukazuju na veliku dijagnostičku preciznost, osjetljivost i specifičnost serumskog C16 – ceramida i S1P pri razlikovanju pacijenata s HCC-om od onih sa cirozom jetre. Time su C16 – ceramidi i S1P nadmašili trenutni klinički biomarker za HCC,  $\alpha$ -fetoprotein, te su postali glavni dijagnostički markeri za detekciju HCC kod pacijenata s bolešću jetre.<sup>[30]</sup>

## 5.2. RAK DEBELOG CRIJEVA

Rak debelog crijeva (engl. *Colorectal cancer, CRC*) je jedna od najčešćih vrsta maligniteta i četvrti vodeći uzrok smrti od raka u svijetu te predstavlja velike izazove u pravovremenom otkrivanju i kliničkom liječenju. Zbog heterogene prirode bolesti i nepostojanja neinvazivnih kliničkih biomarkera s odgovarajućim dijagnostičkim učinkom, otkrivanje je otežano pa CRC ima lošu prognozu. Stoga, postoji velika potreba za novim dijagnostičkim i prognostičkim biomarkerima. Iako je u većini slučajeva CRC sporadična bolest, mutacije gena i epigenetske promjene su podloga progresije adenoma i karcinoma pa imaju važnu ulogu u razvoju raka. Pri tome, aberantna regulacija glavnih regulatornih puteva u metabolizmu

sfingolipida dovodi do poremećene ravnoteže između pro- i anti-apoptotičnih sfingolipidnih vrsta što povećava invaziju i metastaziranje stanica raka debelog crijeva.<sup>[6,31]</sup>

Stoga, sfingolipidi i njihovi metabolički enzimi imaju važnu ulogu u kancerogenezi raka debelog crijeva. Jedan od najznačajnijih potencijalnih biomarkera je SPHK1 jer se pokazalo da je njegova ekspresija povećana u tkivima raka debelog crijeva u usporedbi sa susjednom normalnom sluznicom i adenomima.<sup>[32,33]</sup> Dakle, s obzirom na to da je ekspresija SPHK1 u metastatskom tkivima raka debelog crijeva izrazito povećana u usporedbi s karcinomom debelog crijeva bez metastaza, SPHK1 ima važan klinički značaj kao obećavajući biomarker za otkrivanje i procjenu rizika od metastatskog kolorektalnog karcinoma.<sup>[32]</sup> Slične studije pokazuju važnu ulogu SPHK1 u zloćudnoj progresiji CRC s obzirom na to da povećana ekspresija SPHK1 u tkivima karcinoma značajno korelira s metastazama na limfnim čvorovima, metastazama u jetri i uznapredovalim stadijima tumora.<sup>[34]</sup> Otkrića da je SPHK1 značajan neovisni prediktor smrtnosti u bolesnika sa CRC povećava mogućnost da bi ekspresija SPHK1 mogla biti od velikog značaja za poboljšanje stratifikacije rizika od smrti te za usmjeravanje odluke ka najboljim opcijama za intervenciju za ovu grupu pacijenata. Također, studija Rosa i suradnika je pokazala da SPHK1 ima potencijal u predviđanju učinkovitosti liječenja s obzirom na to da visoka razina SPHK1 u tumorskim tkivima korelira s lošom prognozom za terapiju na bazi cetuximaba u bolesnika s kolorektalnim karcinomom divljih homolognih virusnih onkogeno (KRAS) Kirsten štakora.<sup>[34,35]</sup>

Osim toga, studija Lin i suradnika podupire prediktivnu vrijednost osi SPHK/S1P u kolorektalnom karcinomu.<sup>[36]</sup> Pri tome su ekspresiju i prognostičku značajnost S1PR1 istražili na razini proteina kod pacijenata s kolorektalnim karcinomom te su pokazali da je njegova regulacija značajno povećana u lezijama u usporedbi sa susjednim ne-tumorskim tkivima. Klinički relevantan rezultat studije pokazuje da je povećana tumorska ekspresija S1PR1 povezana s metakronim metastazama u jetri i slabim



ukupnim preživljavanjem, a također identificirana i kao snažan prediktor još goreg ishoda za kolorektalni karcinom. Također, pronađena je povećana ekspresija S1PR1 i u tumorskim tkivima pacijenata sa CRR u usporedbi s normalnim tkivima. Suprotno tome, isti autori su otkrili da je ekspresija S1PR2 smanjena na razini gena i proteina u tumoru u usporedbi s normalnim tkivima te da farmakološka i genetska inhibicija S1PR2 olakšava migraciju i invaziju stanica karcinoma debelog crijeva *in vitro*.<sup>[33]</sup>

Nadalje, nedavne studije pokazale su značajan porast razine serumskih C16-, C18-, C18:1- i C24:1- ceramida i sfingozina u pacijenata sa IV stadijem raka debelog crijeva u usporedbi s kontrolom.<sup>[37]</sup> Također, posljedice poremećenog metabolizma otkrivene su i u tumorskim tkivima pacijenata s kolorektalnim karcinomom gdje su razine C16:0-, C24:0- i C24:1-ceramida bile povećane, a C18- i C20-ceramida smanjene.<sup>[38]</sup> Pri tome su dugolančani ceramidi bili povezani uz metastatsko i agresivno ponašanje raka debelog crijeva. Osim toga, povećana regulacija C24:0 ceramida je pozitivno korelirala sa invazijom limfnih čvorova, a visoke razine C24:1 su pronađene u metastatskim tkivima. Djelomična odstupanja razine ceramida mjerene u uzorcima seruma ili tumorskim tkivima mogu biti rezultat heterogenog svojstva bolesti te poteškoćama u određivanju adekvatnih kontrola, ali se mogu objasniti i činjenicom da su u studiju bili uključeni pacijenti s različitim stadijem tumora što ukazuje na to da je svaki korak u napredovanju CRC povezan sa specifičnim poremećajima u metabolizmu sfingolipida.<sup>[39]</sup> Novi podaci sugeriraju da je metabolizam sfingolipida poremećen u krvi pacijenata s IV stadijem CRC, te da sfingolipidi, u ovom slučaju ceramidi, mogu poslužiti kao novi, neinvazivni, jeftini i efikasni biomarkeri na bazi krvi za bolje prognoze i personaliziraniju medicinu.<sup>[31]</sup> Dakle, bilo kakve promjene u sadržaju ceramida su rezultat aberantne regulacije metaboličkog puta ceramida. Uočene promjene u sadržaju ceramida kod raka debelog crijeva mogu se pripisati i aberantnoj regulaciji metaboličkog puta ceramida. Uz to vežemo otkriće da su CERS1, -2, -5 i -6 prekomjerno izraženi u tkivima pacijenata sa RCC te da je CERS5

najčešće korelirao s lošim preživljavanjem i recidivom bolesti u bolesnika s kolorektalnim karcinomom.<sup>[38,40]</sup>

Naposlijetku, Dubois i suradnici istraživali su potencijal plazma ceramida kao prediktora odgovora na hipofraktioniranu stereotaktičku terapiju zračenjem tijela u kombinaciji s irinotekanskom kemoterapijom bolesnika s kolorektalnim karcinomom. S obzirom na razinu plazma ceramida bilo je moguće odrediti razinu odgovora na terapiju, a njihova studija je pokazala značajan porast u razini ukupnih plazma ceramida, ali i porast specifičnih ceramidnih vrsta uključujući C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C22:1, C24:0 i C24:1. Takvi rezultati ukazuju da ceramidi, osim što se mogu koristiti u nadgledanju napredovanja CRR, mogu biti korisni i za stratifikaciju pacijenata na temelju njihove reakcije na liječenje. Takav pristup uvelike može olakšati razvoj prilagođene terapije za povećanje učinkovitosti liječenja.<sup>[41]</sup>

### 5.3. RAK DOJKE

Rak dojke je maligna bolest koja se inicira u stanicama dojke. Pored svih malignih bolesti, karcinom dojke smatra se jednim od vodećih uzroka smrti žena u menopauzi, a čini 23% svih slučajeva raka. U prethodna dva desetljeća, istraživanja vezana za karcinom dojke vodila su velikom napretku u razumijevanju biologije karcinoma dojke, što je rezultiralo poboljšanjem u terapiji.<sup>[42]</sup>

Postoje četiri molekularna podtipa raka dojke koji imaju različite kliničke ishode, a razlikuju se po ekspresiji receptora za estrogen (ER), za progesteron (PR) te receptora 2 za ljudski faktor rasta (HER2/neu). Navedene podtipove možemo klasificirati kao luminalni A, luminalni B, prekomjerno ekspresiran HER2 i bazalni karcinom dojke, pri čemu luminalni karcinom A predstavlja one koji su ER-/PR-pozitivni i HER2-negativni, a luminalni B one koji su ER-/PR-negativni i HER2-pozitivni. Luminalni B najčešće ima lošiju prognozu od luminalnog A karcinoma.<sup>[43]</sup>

Studije su pokazale da su u tumorskim tkivima i u intersticijskoj tekućini iz tkiva prisutne povećane razine sfingoidnih baza poput sfingozina, dihidrosfingozina, S1P i dihidro-S1P u usporedbi s nekancerogenim tkivom dojke. Osim toga, pronađene su i povećane razine S1P u tumorskom tkivu pacijenata s metastazama na limfnim čvorovima raka dojke što potvrđuje ulogu razine S1P kao potencijalnog biomarkera limfnih metastaza kod raka dojke. Također, otkrivena je uloga S1P u interakciji između tumorskih stanica i okolnog normalnog tkiva dojke što je važno za invaziju i metastazu stanica karcinoma.<sup>[44]</sup> Pri tome su razine S1P najčešće povezane s određenim podtipom karcinoma dojke. Primjerice, u slučaju luminalnog A i B karcinoma pronađene su povišene razine S1P, a kod prekomjerne ekspresije HER2 su razine S1P bile snižene.<sup>[45]</sup>

Nadalje, Tsuchida i sur. su pokazali da je povišena razina S1P rezultat povišene regulacije SPHK1.<sup>[45]</sup> Visoka ekspresija SPHK1 je svojstvena značajka karcinoma dojke, a karakteriziraju ju limfne metastaze, niska stopa preživljavanja i loša prognoza za bolesnika s karcinomom dojke.<sup>[47]</sup> Pri tome, razinu ekspresije SPHK1 možemo vezati uz različite podtipove karcinoma dojke. Primjerice, otkriveno je da ER-negativni tumori imaju veću ekspresiju SPHK1 od ER-pozitivnih tumora.<sup>[46,47,48]</sup> Slično tome, veća ekspresija SPHK1 otkrivena je i u HER2-negativnim tumorima u odnosu na HER2-pozitivne tumore.<sup>[49]</sup> Stoga, povećanu ekspresiju SPHK1 najčešće vežemo uz lošiji ishod. Nadalje, pokazalo se da trostruko-negativni tumori imaju veću ekspresiju mRNA SPHK1 u usporedbi s ostalim tumorima dojke što je također koreliralo sa slabijim preživljavanjem pacijenata.<sup>[46,49]</sup> Međutim, suprotno tome, studija koja se temeljila na imunohistokemijskoj analizi, pokazala je da trostruko-negativni tumor ima nižu razinu ekspresije fosfo-SPHK1 u usporedbi s luminalnim tipom raka dojke.<sup>[45]</sup> Različiti dobiveni rezultati mogu biti posljedica heterogenog svojstva bolesti, ali i različite metodologije korištene za proučavanje razine ekspresije SPHK1.<sup>[6]</sup>

Brojne studije pokazale su potencijal utvrđivanja razine ekspresije SPHK1 i S1PRs u kombinaciji sa statusom ER u svrhu predviđanja reakcije

na terapiju i preživljavanja kod bolesnika s karcinomom dojke. Primjerice, kod bolesnika podvrgnutih liječenju tamoksifenom, pokazane su povećane razine jezgrene i citoplazmatske ekspresije SPHK1 u tumorima što je povezano s jačom rezistencijom na tamoksifen i slabijim preživljavanjem pacijenata s ER-pozitivnim karcinomom dojke.<sup>[50]</sup> Dakle, Ruckhäberle i sur. otkrili su da su pacijenti s luminalnim ER-pozitivnim karcinomom dojke i s povećanom SPHK1 ekspresijom imali visoku stopu patološkog odgovora nakon liječenja neoadjuvansom na bazi tamoksifena i doksorubicina u kombinaciji s docetakselom ili ciklofosfamidom nego kod pacijenata sa slabom ekspresijom SPHK1.<sup>[47]</sup>

Ceramidi također imaju važnu ulogu u patogenezi karcinoma dojke s obzirom na njegove povećane razine u malignim tkivima raka dojke u usporedbi s normalnim tkivima.<sup>[44,51]</sup> Konkretno, kao posljedica povećane razine mRNA specifičnih CERS (CERS2, CERS4 i CERS6) značajno su povećane razine C16:0-, C18:0-, C20:0-, C22:0-, C24:0-, C24:1- i C26:1-ceramida.<sup>[44]</sup> Među identificiranim vrstama ceramida, C16:0 se pokazao najperspektivnijim prognostičkim biomarkerom s obzirom na njegove povećane razine u tumorskim tkivima bolesnika s pozitivnim statusom limfnih čvorova u odnosu na tumore s negativnim statusom limfnih čvorova.<sup>[51]</sup> Također, otkriveno je da ER regulira razine specifičnih vrsta ceramida, uključujući C18:0 i C20:0, jer su ti ceramidi značajno povećani u ER-pozitivnim malignim tkivima raka dojke u usporedbi s ER-negativnim tkivima. Osim toga, u ER-pozitivnim tkivima pronađena je i pojačana ekspresija CERS4 i CERS6 te ASAH1.<sup>[48]</sup> Općenito vrijedi da je povećana razina ekspresije ASAH1 povezana s boljom prognozom invazivnog karcinoma dojke neovisno o vrsti liječenja, a može se smatrati i prediktorom za poboljšani ishod u neinvazivnom duktalnom karcinomu *in situ*.<sup>[6]</sup> Otkriće da ER-pozitivni karcinom dojke ima izraženu indukciju sinteze i razgradnje ceramida upućuje na kompleksnu interakciju metaboličkih enzima u regulaciji ponašanja stanica raka. U prilog ovoj hipotezi, nedavna studija stanica karcinoma debelog crijeva pokazala je da

pojačana ekspresija CERS6 transkripcijski aktivira ASAH1, što rezultira povećanom razinom mRNA, ekspresijom proteina i aktivnošću ovog enzima.<sup>[52]</sup>

## 6. ZAKLJUČAK

Velik broj studija pokazale su dijagnostički, prognostički i prediktivni potencijal bioaktivnih sfingolipidnih vrsta te enzima odgovornih za njihov metabolizam u liječenju bolesnika s karcinomom. Zato su sfingolipidi kao biomarkeri važni za rano otkrivanje raka, prevenciju i postizanje optimalnog ishoda. Zahvaljujući razvoju sfingolipidemije temeljene na spektrofotometriji omogućeno je otkivanje brojnih novih sfingolipida kao biomarkera s visokim stupnjem strukturne preciznosti i osjetljivosti. Također, masena spektrometrijska analiza sfingolipida u krvi služi u otkrivanju novih, neinvazivnih dijagnostičkih biomarkera za rak.

Klinička translacija sfingolipidnih biomarkera se vrlo često oslanja na studije kod kojih se pojavljuje problem nedosljednosti. Jedan od razloga dobivanja različitih rezultata studija provedenih na istom tipu raka je heterogenost bolesti, različiti histološki tipovi tumora i mjesta gdje je tumor lociran unutar nekog organa. Osim toga, provođenje različitih analitičkih metoda za analizu enzima i receptora povezanih sa sfingolipidnim metabolizmom može ograničavati usporedbu dobivenih rezultata između različitih studija. Dodatno, velik broj studija uključuju ispitivanja na malom broju uzoraka tumora, što ne predstavlja u potpunosti složenost biologije raka.

Multicentrične studije u velikim i dobro definiranim kliničkim skupinama, dostupnost kvalitetnih kliničkih uzoraka kao i uzorkovanje primarnih i metastatskih tumora iz više regija te standardizirani analitički protokoli mogu pružiti ujednačene i ponovljive podatke koji će olakšati prijenos otkrivenih biomarkera u kliničku upotrebu. Kako bi se poboljšala prognostička točnost i specifičnost prilikom upotrebe sfingolipidnih biomarkera, treba uzeti u obzir ključne molekularne značajke karakteristične za određenu vrstu raka znajući da je metabolizam sfingolipida isprepleten sa signalnim mrežama koje kontroliraju ponašanje i sudbinu stanica raka. Dodatno, integracija validiranih sfingolipidnih biomarkera s trenutnim modalitetima probira dodatno će povećati

dijagnostičke performanse i pomoći u identificiranju najboljih terapijskih pristupa u bolesnika s karcinomom.<sup>[6]</sup>

## 7. POPIS LITERATURE I IZVORA

- [1] P. R. Srinivas, B. S. Kramer, S. Srivastava. Trends in Biomarker Research for Cancer Detection. *Lancet Oncology*. 2001 November. 2(11):698-704.
- [2] K. Strimbu, J. A. Tavel. What are Biomarkers?. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010 November. 5(6): 463–466.
- [3] My cancer. What are biomarkers?. Preuzeto: 6. travnja, 2020.. Web stranica: <https://www.mycancer.com/resources/what-are-biomarkers/>
- [4] R. Mayeux. Biomarkers: Potential Uses and Limitations. *NeuroRx*. 2004 April. 1(2): 182–188.
- [5] R. Huss. Translational regenerative medicine, Chapter 19 Biomarkers.
- [6] Sedić M., Grbčić P., Kraljević Pavelić S., Bioactive Sphingolipids as Biomarkers Predictive of Disease Severity and Treatment Response in Cancer: Current Status and Translational Challenges. *Anticancer Research*, 2019 January, 39(1):41-56.
- [7] Yusuf A. Hannun, Lina M. Obeid. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 March. 19(3): 175–191.
- [8] James R. Van Brocklyn, Joseph B. Williams. The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: Oxidative stress and the seesaw of cell survival and death. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2012 September.163(1):26-36.
- [9] Sunitha Reddy M., Krishna Reddy P., Kishore Reddy A.. Biomarkers- Burgeoning Tools in Early Cancer Detection. Kishore reddy et al., *Int. J. Rev. Life. Sci.*, 1(2), 2011, 45-55.
- [10] E. C. Kohn, N. Azada, C. Annunziata, A. S. Dhamoon, G. Whiteley. Proteomics as a tool for biomarker discovery. *IOS Press. Disease Markers* 23 (2007) 411–417.



- [11] F. Yan, H. Zhao, Y. Zeng. Lipidomics: a promising cancer biomarker. *Clin Transl Med.* 2018. 7: 21.
- [12] B. Ogretmen. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2018 January. 18(1): 33–50.
- [13] Yusuf A. Hannun, Lina M. Obeid. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 February. 9(2):139-50.
- [14] Physics. LibreTexts. Sphingolipids. Postavljeno: 27. siječnja, 2020. Preuzeto: 20. travnja, 2020. Web stranica: [https://phys.libretexts.org/Courses/University\\_of\\_California\\_Davis/UCD%3A\\_Biophysics\\_241\\_-\\_Membrane\\_Biology/01%3A\\_Lipids/1.05%3A\\_Sphingolipids](https://phys.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/UCD%3A_Biophysics_241_-_Membrane_Biology/01%3A_Lipids/1.05%3A_Sphingolipids)
- [15] A. C. Carreira, T. C. Santos, M. A. Lone, E. Zupančič, E. Lloyd-Evans, R. F. M. de Almeida, T. Hornemann, L. C. Silva. Mammalian Sphingoid Bases: Biophysical, Physiological and Pathological Properties. *Prog Lipid Res.* 2019 July. 75:100988.
- [16] S. Potočki. Potential health benefits of sphingolipids in milk and dairy products. *Mljekarstvo / Dairy.* November, 2016. 66(4):251-261.
- [17] Siddabasave Gowda B. Gowda, S. Usuki, Mostafa A. S. Hammam, Y. Murai, Y. Igarashi, K. Monde. Highly efficient preparation of sphingoid bases from glucosylceramides by chemoenzymatic method. *J Lipid Res.* 2016 February. 57(2): 325–331.
- [18] Cécile L. Bandet, Sophie Tan-Chen, Olivier Bourron, Hervé Le Stunff, Eric Hajdich. Sphingolipid Metabolism: New Insight into Ceramide-Induced Lipotoxicity in Muscle Cells. *Int J Mol Sci.* 2019 February. 20(3): 479.
- [19] C. R. Bollinger, V. Teichgräber, E. Gulbins. Ceramide-enriched Membrane Domains. *Biochim Biophys Acta.* 2005 December 30. 1746(3):284-94.

- [20] Ronald L. Schnaar, Taroh Kinoshita. *Essentials of Glycobiology*, 3rd edition. Chapter 11 Glycosphingolipids.
- [21] M. Cao, C. Ji, Y. Zhou, W. Huang, W. Ni, X. Tong, Ji-Fu Wei. Sphingosine Kinase Inhibitors: A Patent Review. *Int J Mol Med*. 2018 May. 41(5):2450-2460.
- [22] K. Funato, H. Riezman, M. Muñiz. Vesicular and Non-Vesicular Lipid Export From the ER to the Secretory Pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2020 January. 1865(1):158453.
- [23] Y. Vijayan, M. B. Lankadasari, K. B. Harikumar. Acid Ceramidase: A Novel Therapeutic Target in Cancer. *Curr Top Med Chem*. 2019. 19(17):1512-1520.
- [24] P. Grbčić, M. Sedić. Sphingosine 1-Phosphate Signaling and Metabolism in Chemoprevention and Chemoresistance in Colon Cancer. *Molecules* 2020. 25(10), 2436.
- [25] Richard J. Bleicher, Myles C. Cabot. Glucosylceramide Synthase and Apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2002 December 30.. 1585(2-3):172-8.
- [26] R. Savić, X. He, I. Fiel, E. H. Schuchman. Recombinant Human Acid Sphingomyelinase as an Adjuvant to Sorafenib Treatment of Experimental Liver Cancer. *PLoS One*. 2013. 8(5): e65620.
- [27] H. Cai, X. Xie, L. Ji, X. Ruan, Z. Zheng. Sphingosine kinase 1: A novel independent prognosis biomarker in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2017 April. 13(4): 2316–2322.
- [28] B. Uranbileg, H. Ikeda, M. Kurano, K. Enooku, M. Sato, D. Saigusa, J. Aoki, T. Ishizawa, K. Hasegawa, N. Kokudo, Y. Yatomi. Increased mRNA Levels of Sphingosine Kinases and S1P Lyase and Reduced Levels of S1P Were Observed in Hepatocellular Carcinoma in Association with Poorer Differentiation and Earlier Recurrence. *PLoS One*. 2016 February. 17;11(2):e0149462.

- [29] G. Grammatikos, N. Schoell, N. Ferreirós, D. Bon, E. Herrmann, H. Farnik, V. Köberle, A. Piiper, S. Zeuzem, B. Kronenberger, O. Waidmann, J. Pfeilschifter. Serum sphingolipidomic analyses reveal an upregulation of C16- ceramide and sphingosine-1-phosphate in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016 April. 7(14): 18095–18105.
- [30] A. I. Fitian, D. R. Nelson, C. Liu, Y. Xu, M. Ararat, R. Cabrera. Integrated metabolomic profiling of hepatocellular carcinoma in hepatitis C cirrhosis through GC/MS and UPLC/MS-MS. *Liver Int*. 2014 October. 34(9): 1428–1444.
- [31] M. Vacante, A. M. Borzì, F. Basile, A. Biondi. Biomarkers in colorectal cancer: Current clinical utility and future perspectives. *World J Clin Cases*. 2018 December, 6. 6(15): 869–881.
- [32] T. Kawamori, T. Kaneshiro, M. Okumura, S. Maalouf, A. Uflacker, J. Bielawski, Y. A. Hannun, L. M. Obeid. Role for sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis. *FASEB J*. 2009 February. 23(2): 405–414.
- [33] S. Samuhasaneeto, S. Promagsorn, C. Punsawad. Sphingosine 1-phosphate receptor 4 expression in colorectal cancer patients. *Walailak J Sci Technol*. 2016. (14): 663-669.
- [34] S. S. L. Tan, L. W. Khin, L. Wong, B. Yan, C. W. Ong, M. Salto-Tellez, Y. Lam, C. T. Yap. Sphingosine Kinase 1 Promotes Malignant Progression in Colon Cancer and Independently Predicts Survival of Patients With Colon Cancer by Competing Risk Approach in South Asian Population. *Clin Transl Gastroenterol*. 2014 February. 5(2): e51.
- [35] R. Rosa, R. Marciano, U. Malapelle, L. Formisano, L. Nappi, C. D'Amato, V. D'Amato, V. Damiano, G. Marf, S. Del Vecchio, A. Zannetti, A. Greco, A. De Stefano, C. Carlomagno, B. M. Veneziani, G. Troncone, S. De Placido, R. Bianco. Sphingosine Kinase 1 Overexpression Contributes to Cetuximab Resistance in Human Colorectal Cancer Models. *Clin Cancer Res*. 2013 January. 19(1): 138-147.

- [36] Q. Lin, Y. Wei, Y. Zhong, D. Zhu, L. Ren, P. Xu, P. Zheng, Q. Feng, M. Ji, M. Lv, C. Liang, J. Xu. Aberrant expression of sphingosine-1-phosphate receptor 1 correlates with metachronous liver metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Tumour Biol.* 2014 October. 35(10):9743-50.
- [37] D. Separovic, A. F. Shields, P. A. Philip, J. Bielawski, A. Bielawska, J. S. Pierce, A. L. Tarca. Altered Levels of Serum Ceramide, Sphingosine and Sphingomyelin Are Associated with Colorectal Cancer: A Retrospective Pilot Study. *Anticancer Res.* 2017 March. 37(3): 1213–1218.
- [38] L. Chen, H. Chen, Y. Li, L. Li, Y. Qiu, J. Ren. Endocannabinoid and ceramide levels are altered in patients with colorectal cancer. *Oncology Reports.* 2015 May. (34):447-454.
- [39] S. M. Hanash, S. J. Pitteri, V. M. Faca. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature.* 2008 April. 452(7187):571-9.
- [40] S. Fitzgerald, K. M. Sheehan, V. Espina, A. O'Grady, R. Cummins, D. Kenny, L. Liotta, R. O'Kennedy, E. W. Kay, G. S. Kijanka. High CerS5 expression levels associate with reduced patient survival and transition from apoptotic to autophagy signalling pathways in colorectal cancer. *J Pathol Clin Res.* 2015 January. 1(1): 54–65.
- [41] N. Dubois, E. Rio, N. Ripoche, V. Ferchaud-Roucher, Marie-Hélène Gaugler, L. Champion, M. Krempf, C. Carrie, M. Mahé, X. Mirabel, F. Paris. Plasma ceramide, a real-time predictive marker of pulmonary and hepatic metastases response to stereotactic body radiation therapy combined with irinotecan. *Radiother Oncol.* 2016 May. 119(2):229-35.
- [42] M. Akram, M. Iqbal, M. Daniyal, A. Ullah Khan. Awareness and current knowledge of breast cance. *Biol Res.* 2017. 50: 33.
- [43] X. Dai, T. Li, Z. Bai, Y. Yang, X. Liu, J. Zhan, B. Shi. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res.* 2015. 5(10): 2929–2943.

- [44] M. Nagahashi, J. Tsuchida, K. Moro, M. Hasegawa, K. Tatsuda, I. A. Woelfel, K. Takabe, T. Wakai. High levels of sphingolipids in human breast cancer. *J Surg Res*. 2016 August. 204(2):435-444.
- [45] M. Nagahashi, A. Yamada, H. Miyazaki, J. C. Allegood, J. Tsuchida, T. Aoyagi, Wei-Ching Huang, K. P. Terracina, B. J. Adams, O. M. Rashid, S. Milstien, T. Wakai, S. Spiegel, K. Takabe. Interstitial Fluid Sphingosine-1-Phosphate in Murine Mammary Gland and Cancer and Human Breast Tissue and Cancer Determined by Novel Methods. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2016 June. 21(1-2): 9–17.
- [46] A. Datta, S. Y. Loo, B. Huang, L. Wong, S.S.L. Tan, T. Z. Tan, S. C. Lee, J. P. Thiery, Y. C. Lim, W.P. Yong, Y. Lam, A. P. Kumar, C. T. Yap. SPHK1 regulates proliferation and survival responses in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2014 August. 5(15): 5920–5933.
- [47] E. Ruckhäberle, T. Karn, C. Denkert, S. Loibl, B. Ataseven, T. Reimer, S. Becker, U. Holtrich, A. Rody, S. Darb-Esfahani, V. Nekljudova, G. von Minckwitz. Predictive value of sphingosine kinase 1 expression in neoadjuvant treatment of breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 18 August. 139(10):1681-1689.
- [48] E. Ruckhäberle, U. Holtrich, K. Engels, L. Hanker, R. Gätje, D. Metzler, T. Karn, M. Kaufmann, A. Rody. Acid ceramidase 1 expression correlates with a better prognosis in ER-positive breast cancer. *Climacteric*. 2009 December. 12(6):502-13.
- [49] S. Wang, Y. Liang, W. Chang, B. Hu, Y. Zhang. Triple Negative Breast Cancer Depends on Sphingosine Kinase 1 (SphK1)/Sphingosine-1-Phosphate (S1P)/Sphingosine 1-Phosphate Receptor 3 (S1PR3)/Notch Signaling for Metastasis. *Med Sci Monit*. 2018; 24: 1912–1923.
- [50] C. Watson, J. S. Long, C. Orange, C. L. Tannahill, E. Mallon, L. M. McGlynn, S. Pyne, N. J. Pyne, J. Edwards. High Expression of Sphingosine 1-Phosphate Receptors, S1P1 and S1P3, Sphingosine Kinase 1, and Extracellular Signal-Regulated Kinase-1/2 Is Associated with Development

of Tamoxifen Resistance in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Patients. *Am J Pathol.* 2010 November. 177(5): 2205–2215.

[51] S. Schiffmann, J. Sandner, K. Birod, I. Wobst, C. Angioni, E. Ruckhäberle, M. Kaufmann, H. Ackermann, J. Lötsch, H. Schmidt, G. Geisslinger, S. Grösch. Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue. *Carcinogenesis.* 2009 May. (30): 745–752.

[52] T. S. Tirodkar, P. Lu, A. Bai, M. J. Scheffel, S. Gencer, E. Garrett-Mayer, A. Bielawska, B. Ogretmen, C. Voelkel-Johnson. Expression of Ceramide Synthase 6 Transcriptionally Activates Acid Ceramidase in a c-Jun N-terminal Kinase (JNK)-dependent Manner. *J Biol Chem.* 2015 May. 290(21): 13157–13167.

## 8. POPIS SLIKA

SLIKA 1. Sunitha Reddy M., Krishna Reddy P., Kishore Reddy A.. Biomarkers- Burgeoning Tools in Early Cancer Detection. Kishore reddy et al., Int. J. Rev. Life. Sci., 1(2), 2011, 45-55. Modificirano.

SLIKA 2. Yusuf A. Hannun, Lina M. Obeid. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 February. 9(2):139-50. Modificirano.

SLIKE 3.,4. Web stranica: <http://www.chemspider.com>

SLIKA 5. James R Van Brocklyn, Joseph B Williams. The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: Oxidative stress and the seesaw of cell survival and death. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2012 September.163(1):26-36.

SLIKA 6. Web stranica: <https://www.lipidhome.co.uk/lipids/sphingo/cer-1-p/index.htm>

SLIKA 7. Yusuf A. Hannun, Lina M. Obeid. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 February. 9(2):139-50.

SLIKA 8. Besim Ogretmen. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. Nat Rev Cancer. 2018 January. 18(1):33-50.

## 9. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

Prezime/Ime	Peruč Marta
Adresa	Braće Bačića 5, 51 000 Rijeka
Država	Hrvatska
Telefonski broj	051/ 637 – 074
Broj mobilnog telefona	091 9444 654
E-mail	peruc.marta@gmail.com mperuc@uniri.hr
Datum rođenja	20. siječnja, 1999.

### OBRAZOVANJE

10/2017. - danas	Biotehnologija i istraživanje lijekova, Sveučilište u Rijeci Istaknuti kolegiji: Stanična i molekularna biologija, Analitička kemija, Organska kemija, Biokemija, Imunologija
09/2013. – 06/2017.	Prva sušačka hrvatska gimnazija u Rijeci

### RADNO ISKUSTVO

Datum	07/2020 – 09/2020
Radno mjesto	Prodavač
Ime i adresa poslodavca	MASS SHOES d.o.o. Lijepe naše 6, 49290 Klanjec (Hrvatska)
Datum	06/2019 - 09/2019
Radno mjesto	Konobar
Ime i adresa poslodavca	T.D. SQUASH d.o.o. Janka Polića Kamova 103, 51000 Rijeka (Hrvatska)
Datum	06/2018 – 09/2018
Radno mjesto	Prodavač
Ime i adresa poslodavca	MASS SHOES d.o.o. Lijepe naše 6, 49290 Klanjec (Hrvatska)
Datum	06/2018
Radno mjesto	Prodavač
Ime i adresa poslodavca	Sport vision d.o.o. Bani 75A, 10000 Zagreb (Hrvatska)
Datum	08/2017 – 09/2017
Radno mjesto	Blagajnik



Ime i adresa poslodavca	Müller trgovina Zagreb d.o.o. Betinska ulica 1, 10010 Zagreb (Hrvatska)
Datum	08/2016
Radno mjesto	Promotor
Ime i adresa poslodavca	Weber Escal d.o.o. Zastavnice 38a, 10251 Hrvatski Leskovarac (Hrvatska)

## OSOBN VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Materinski jezik	Hrvatski
Strani jezici	Engleski – razina B2 Francuski – razina A1 Talijski – razina A1
Računalne vještine i kompetencije	Osnove rada na računalu, poznavanje rada u MS Office-u (Word, Excel, Power Point) i kemoinformatičkim programima (Avogadro, ChemAxon, Gamess, Pymol,...)
Poslovne i komunikacijske vještine	Dobre komunikacijske i organizacijske vještine stečene tijekom rada i obrazovanja, uporna i redovita u izvršavanju zadataka, željna iskustva i upotpunjavanja svojega znanja, spremna na timski rad
Sport	Fitness (od 2019.) Ples (od 2012. do 2014.) Plivanje (aktivno bavljenje od 2005. do 2012.)
Hobi	<i>Nail artist</i> (manikura, izrada trajnog laka i crtanje na noktima)
Vozačka dozvola	B kategorija