

# Indukcija programirane stanične smrti tienopiridinskim derivatom

---

**Bravar, Michaela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:802230>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET  
I  
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**MICHAELA BRAVAR**

**INDUKCIJA PROGRAMIRANE STANIČNE SMRTI  
TIENOPIRIDINSKIM DERIVATOM**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina:  
2020./2021.**

**Mentor:**

**Izv.prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, mag. med. biochem.**

**Split, listopad 2021.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET  
I  
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**MICHAELA BRAVAR**

**INDUKCIJA PROGRAMIRANE STANIČNE SMRTI  
TIENOPIRIDINSKIM DERIVATOM**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina:  
2020./2021.**

**Mentor:**

**Izv.prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, mag. med. biochem.**

**Split, listopad 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet  
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA  
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno polje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Medicinska biokemija  
**Tema rada** odobrena je na 70. sjednici Vijeća studija Farmacije, 8. sjednici Vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 5. sjednici Vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** izv.prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, mag. med. biochem.  
**Pomoć pri izradi:** -

### INDUKCIJA PROGRAMIRANE STANIČNE SMRTI TIENOPIRIDINSKIM DERIVATOM

Michaela Bravar, broj indeksa 202

**Naslov rada:** Indukcija programirane stanične smrti tienopiridinskim derivatom

**Cilj:** Cilj ovog istraživanja jest dokazati djelovanje sintetski dobivenog inhibitora iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina na apoptozu stanica staničnih linija MCF7 karcinoma dojke i MDA-MB-231 trostruko negativnog karcinoma dojke. Pretpostavka je da će se nakon tretiranja tumorskih staničnih linija inhibitorom postotak stanica u ranoj, kasnoj te ranoj i kasnoj apoptozi ukupno, povećati.

**Materijali i metode:** Pomoću MTT-a došli smo do potrebne koncentracije inhibitora kojom smo tretirali stanice raka dojke staničnih linija MCF7 i MDA-MB-231 tijekom 48 sati. Nakon dodatka Annexina V i propidij jodida stanice su analizirane protočnim citometrom kojim smo dobili postotak stanica u ranoj i kasnoj apoptozi kod tretiranih i netretiranih stanica raka.

**Rezultati:** Prikazani su kao postotak rane i kasne apoptoze i preživjelih stanica. Djelovanje inhibitora na stanice stanične linije MCF7 pokazalo je smanjenje broja stanica u ranoj apoptozi u odnosu na kontrolu koje nadomješta statistički značajan porast stanica u kasnoj te ukupno ranoj i kasnoj apoptozi u odnosu na netretirane stanice. U ovom istraživanju inhibitor je pokazao blagi, ali statistički značajan porast postotka stanica MDA-MB-231, stanične linije trostruko negativnog raka dojke u ranoj apoptozi. Također inhibitor je pokazao značajni porast stanica u kasnoj te ukupno ranoj i kasnoj apoptozi proučavane stanične linije.

**Zaključci:** Novosintetizirani tieno[2,3-*b*]piridin doveo je do značajnog porasta postotka stanica karcinoma dojke koje ulaze u apoptozu. Djelovanje koje je pokazao taj inhibitor moglo bi biti značajno u liječenju trostruko negativnog raka dojke.

**Ključne riječi:** karcinom dojke, tienopiridinski derivat, apoptoza

**Rad sadrži:** 49 stranica, 17 slika, 10 tablica, 28 referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. doc. dr. sc. Ana Šešelja Perišin predsjednica
2. doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić član
3. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić član – mentor

**Datum obrane:**

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u knjižnicama Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia

**Scientific area:** Biomedical sciences

**Scientific field:** Pharmacy

**Course title:** Medicinal biochemistry

**Thesis subject** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 70 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology and Faculty Council of School of Medicine.

**Mentor:** Assoc. professor Vedrana Čikeš Čulić, PhD

**Technical assistance:** -

### INDUCTION OF PROGRAMMED CELL DEATH BY THIENOPYRIDINE DERIVATIVE

Michaela Bravar, index N<sup>o</sup> 202

**Diploma thesis title:** Induction of programmed cell death by thienopyridine derivative

**Objectives:** The aim of this study was to demonstrate the effect of a synthetically derived inhibitor from the thieno[2,3-*b*]pyridine group on cell apoptosis of MCF7 breast cancer cell line and MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell line. It is hypothesized that after the treatment of tumor cell lines with an inhibitor, the percentage of cells in early, late, and early and late apoptosis will increase.

**Materials and methods:** Using MTT, we obtained required concentration of inhibitor with whom we treated breast cancer cells of the MCF7 and MDA-MB-231 cell lines for 48 hours. After the addition of Annexin V and propidium iodide, the cells were analyzed by flow cytometer to obtain the percentage of cells in early and late apoptosis in treated and untreated cancer cells.

**Results:** They are presented as the percentage of early and late apoptosis and surviving cells. The effect of inhibitor on MCF7 cell line showed a decrease in the number of cells in early apoptosis compared to the control, which is compensated by the statistically significant increase in percentage of the cells in late and total early and late apoptosis compared to untreated cells. In this study, the inhibitor showed a mild, but statistically significant increase in the percentage of MDA-MB-231 cells, a triple-negative breast cancer cell line, in early apoptosis. The inhibitor also showed a significant increase in cells in late and total early and late apoptosis in observed cell lines.

**Conclusions:** Newly synthesized thieno[2,3-*b*]pyridine led to a significant increase in the percentage of breast cancer cells which enter into apoptosis. The action shown by this inhibitor could be significant in the treatment of triple-negative breast cancer.

**Key words:** breast cancer, thienopyridine derivative, apoptosis

**Thesis contains:** 49 pages, 17 figures, 10 tables, 28 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Assist. professor Ana Šešelja Perišin – PhD, chair person
2. Assist. professor Nikolina Režić Mužinić – PhD, member
3. Assoc. professor Vedrana Čikeš Čulić – PhD, supervisor

**Defence date:**

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Rak .....	2
1.2. Onkogeni .....	3
1.3. Tumor supresorski geni .....	5
1.4. Apoptoza .....	7
1.5. Rak dojke .....	9
1.6. Terapija raka dojke .....	11
1.7. Epidemiologija raka dojke u svijetu .....	12
1.8. Epidemiologija raka dojke u Hrvatskoj .....	13
1.9. Tienopiridinski derivati .....	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	15
2.1. Cilj istraživanja .....	16
2.2. Hipoteza .....	17
3. MATERIJALI I METODE .....	18
3.1. Stanične linije .....	19
3.1.1. MCF7 .....	19
3.1.2. MDA-MB-231 .....	20
3.2. Novosintetizirani inhibitor .....	21
3.3. Priprema staničnih linija .....	21
3.4. MTT .....	22
3.5. Postupak .....	22
3.6. Protočna citometrija .....	23
3.7. Statistička analiza .....	23
4. REZULTATI .....	24
4.1. MCF7 .....	25
4.2. MDA-MB-231 .....	30
5. RASPRAVA .....	35
6. ZAKLJUČCI .....	38
7. LITERATURA .....	40
8. SAŽETAK .....	44
9. SUMMARY .....	46
10. ŽIVOTOPIS .....	48

## POPIS KRATICA:

Apaf-1 – (engl. *apoptotic protease activating factor 1*); faktor aktivacije proteaze u apoptozi

Bcl-2 – (engl. *B-cell lymphoma 2*); protein gena BCL-2

Bid – (engl. *BH3-interacting domain death agonist*); član Bcl-2 obitelji proteina koji reguliraju permeabilnost mitohondrijske membrane

BRCA 1, BRCA2 – engl. *BReast CAncer gene*; geni čije su mutacije odgovorne za nasljednu sklonost za rak dojke

ced – (engl. *cell death protease*); kaspaze koje aktiviraju apoptozu

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

DAG – (engl. *diacylglycerol*); diacilglicerol

DMSO – (engl. *dimethyl sulfoxide*); dimetil sulfoksid

DMEM – (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*); medij za uzgoj stanica

EGF – (engl. *epidermal growth factor*); epidermalni faktor rasta

EGFR – (engl. *epidermal growth factor receptor*); receptor za epidermalni faktor rasta

EMA – (engl. *European Medicines Agency*); Europska agencija za lijekove

ERK – (engl. *extracellular signal-regulated kinases*); kinaza regulirana izvanstaničnim signalom

EU – Europska unija

Fas – receptor za FasL; jedan od promotora apoptoze

FDA – engl. *Food and Drug Administration*; Američka uprava za hranu i lijekove

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

GM3 – (engl. *Monosialodihexosylganglioside*); glikosfingolipid vezan za membranu u tkivima

HER 2 – (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*); receptor za humani epidermalni faktor rasta

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

IP3 – (engl. *Inositol 1,4,5-trisphosphate*); inozitol-trifosfat

Ki-67 – prognostički parametar u bolesnica s rakom dojke

MEK – (engl. *mitogen-activated protein kinase kinase enzyme*); enzim koji fosforilira protein kinazu aktiviranu mitogenima

miRNK – (engl. *microRNA*): mala nekodirajuća RNK

mTOR – (engl. *the mammalian target of rapamycin*); meta rapamicina kod sisavaca

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

PBS – (engl. *phosphate-buffered saline*); izotonična otopina fosfatnog pufera s NaCl

PIP2 – (engl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*); fosfatidil-inozitol 4,5-bisfosfat

P53 – gen za protein p53

p53 – tumor supresorski protein

Ras – (engl. *rat sarcoma*; protoonkogen); nazvan po otkriću transformirajućeg načela virusa štakorskog sarkoma

TNF – (engl. *tumor necrosis factor*); faktor tumorske nekroze, citokin



## **1. UVOD**

## 1.1. Rak

Rak je skup različitih bolesti koje se međusobno razlikuju prema svojoj biologiji, etiologiji, kliničkoj slici te načinu liječenja. Svim vrstama raka zajedničko je da nastaju iz stanica koje su izgubile sposobnost adekvatnog odgovaranja na brojne signale, procesom koji se naziva zloćudna pretvorba. Kao posljedica navedenog javlja se nekontrolirana dioba zloćudno preobražene stanice kojom nastaje nakupina stanica odnosno rak. Rak je u osnovi genska bolest, što se potvrđuje time da su promjene odgovorne za zloćudnu pretvorbu stanica uglavnom genske mutacije (1).

Kako bi pojednostavili i saželi kompleksnu sliku raka i različitih mutacija u različitim genima, Douglas Hanahan i Robert A. Weinberg su predstavili model po kojem se svaki rak u deset obilježja razlikuje od zdravoga tkiva. Ta obilježja kojima se rak razlikuje od zdravoga tkiva jesu:

- a) samodostatnost s obzirom na signale rasta
- b) neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast
- c) zaobilaženje programirane stanične smrti (apoptoze)
- d) neograničen potencijal umnažanja
- e) tumorska angiogeneza
- f) sposobnost tkivne invazije i presađivanje
- g) poremećen metabolizam
- h) sposobnost izbjegavanja imunskog odgovora
- i) genomska nestabilnost
- j) upala (1).

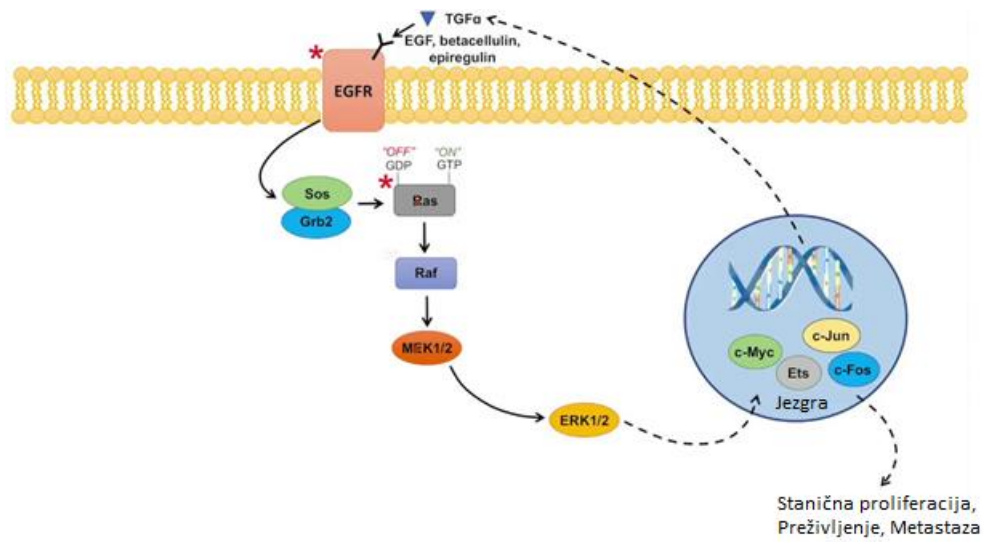
Proces nastanka raka od zdrave stanice jest složen i dugotrajan te se odvija u više koraka, a naziva se tumorskom progresijom. Sam nastanak i progresija raka povezani su sa promjenama u slijedu baza DNK, metilacijom DNK, modifikacijom histona, miRNK te aktivnošću telomeraza (1).

## 1.2. Onkogeni

Onkogeni kao promijenjena inačica normalnih staničnih gena, protoonkogeni, prvi su geni za koje se pokazalo da imaju središnju ulogu u nastanku raka. Protoonkogeni sudjeluju u regulaciji normalne stanične proliferacije i diferencijacije te su uključeni u prijenos signala putevima kojima se stanični rast, dioba, diferencijacija i preživljenje usklađuju s uvjetima u okolišu stanice. Takvi signali koje stanica prima često su u obliku malih molekula, čimbenika rasta koji se vežu za receptore na staničnoj membrani, što dovodi do prijenosa signala pomoću drugih molekula u stanici sve do transkripcijskih čimbenika koji potiču ekspresiju određenih gena. Vrlo čest način prijenosa signala unutar stanice jest fosforilacija proteina što je značajno jer se za mnoge protoonkogene pokazalo da su geni za tirozin-kinaze, proteine koji mogu fosforilirati tirozinske ogranke drugih proteina (2).

Promjena protoonkogeni koja uključuje povećanu aktivaciju njih samih ili njihovih proteinskih produkata dovodi do nastanka onkogeni što se naziva aktivacija onkogeni. Kao posljedica aktivacije onkogeni javlja se nekontrolirani rast i dioba stanice što dovodi do nastanka raka. Sama aktivacija onkogeni može se potaknuti na nekoliko načina: mutacijom u samome genu, povećanjem broja kopija gena (genska amplifikacija) i kromosomskom translokacijom (kromosomski poremećaj u kojem se dio kromosoma odlomi i premjesti na drugi kromosom). Prethodno navedeni načini aktivacije dovode do pojačane, odnosno deregulirane aktivnosti onkoproteina kao posljedica promjene u samoj transkripciji onkogeni ili promjene u strukturi samog proteina (2).

Važnu ulogu za nastanak raka ima Ras-Raf-MEK-ERK put prijenosa signala (Slika 1.). Ovaj put prijenosa započinje aktivacijom Ras pomoću EGFR receptora i nekih drugih receptora koji onda aktiviraju serin/treonin-kinazu Raf koja zatim aktivira MEK-kinazu. Signalni put se dalje nastavlja aktivacijom ERK-kinaze koja dalje aktivira različite transkripcijske čimbenike i neke druge proteine. U različitim tipovima raka mutirane su različite komponente ovog signalnog puta stoga je on bitna meta djelovanja različitih lijekova za rak kao što su sorafenib, vemurafenib, dabrafenib, trametinib i kobimetinib (2).



**Slika 1.** Prikaz Ras-Raf-MEK-ERK puta prijenosa signala (Preuzeto s: <https://www.youtube.com/watch?v=iIf2RbogiDw>, datum pristupa: 11.9.2021. )

Osim toga, Ras je uključen i u neke druge puteve prijenosa signala uključujući onaj koji dovodi do aktivacije proteina mTOR koji je ujedno i cilj djelovanja temsirolimusa i everolimusa, lijekova za rak. Samo razumijevanje različitih puteva prijenosa signala dovelo je do razvoja ciljanih lijekova poput brojnih monoklonalnih protutijela, inhibitora protein-kinaze i mnogih drugih (2).

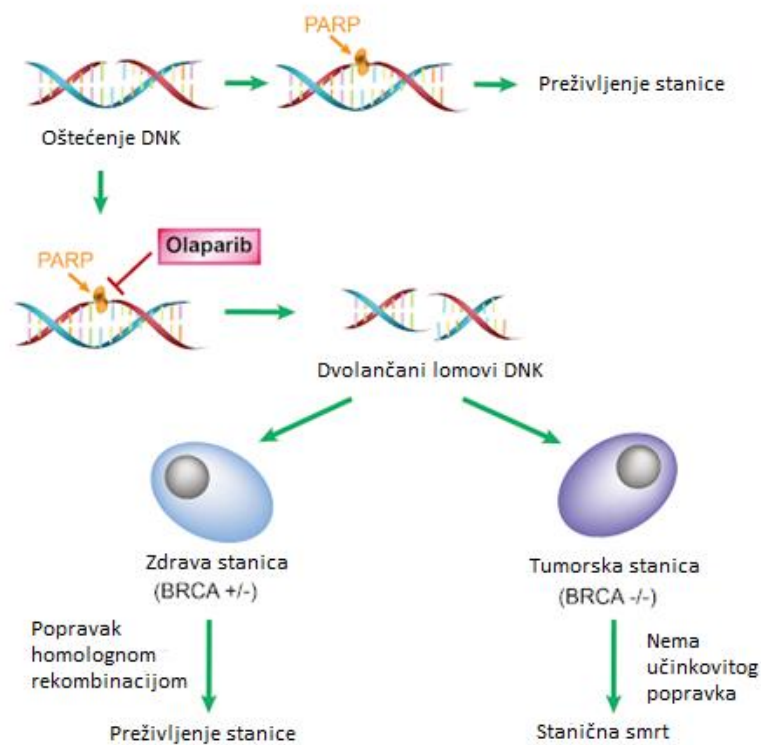
### 1.3. Tumor supresorski geni

Za tumor supresorske gene značajno je da gubitkom ili inaktivacijom njih samih, odnosno njihovih proteinskih produkata dolazi do nastanka raka, dok kod onkogenih aktivacija dovodi do nastanka raka. Do inaktivacije tumor supresorskih gena dolazi na nekoliko načina: mutacijom, metilacijom njihovih promotora te epigenetički (3). Epigenetička promjena termin je kojeg je uveo Conrad Waddington, a označava nasljedne promjene ekspresije gena koje nisu povezane s promjenama u slijedu baza DNK (4). Od posebne je važnosti tumor supresorski gen *P53* odnosno njegov proteinski produkt p53 koji je često mutiran u različitim tipovima raka u ljudi. Aktivirani p53 djeluje tako da zaustavlja stanicu u određenoj fazi staničnog ciklusa i potiče popravak oštećenja DNK te potiče apoptozu. Ako ovo djelovanje p53 izostane, oštećena DNK se replicira i povećava se vjerojatnost nastanka raka, tumorske angiogeneze te rezistencije na kemoterapiju i radioterapiju (3).

Iz toga se može zaključiti da narušeni mehanizam apoptoze i poremećaj u regulaciji staničnog ciklusa mogu biti povezani s nastankom raka. Stanični se ciklus sastoji od četiriju faza, a to su G1, S, G2 i M faza. Navedene faze sadrže kontrolne točke za regulaciju ulaska stanice u sljedeće faze što, među ostalim, ovisi i o oštećenosti DNK koja se nalazi u stanicama raka. Regulacija staničnog ciklusa ovisna je o ciklinima odnosno kinazama ovisnih o ciklinima i inhibitorima navedenih kinaza, a poremećaj te regulacije nužan je za progresiju raka (3). Ciklini imaju i neovisne uloge koje uključuju regulaciju popravka oštećenja DNK i transkripcijske programe koji usmjeravaju staničnu diferencijaciju, apoptozu i metabolizam (5).

U većini tipova raka stanična diferencijacija je djelomično ili potpuno blokirana, a povezana je s regulacijom staničnog ciklusa. Mutacije koje su u velikom broju prisutne u stanicama raka, posljedica su genomske nestabilnosti uzrokovane poremećajima u mehanizmima koji osiguravaju nisku razinu mutacija. Narušenost mehanizma popravka oštećenja stanične DNK dovodi do promjena u genima koji u njima sudjeluju te do genske nestabilnosti kao bitnog obilježja raka (3).

Neki od gena koji sudjeluju u popravku dvolančanih lomova DNK, a povezani su s nasljednim rakom dojke i jajnika jesu geni BRCA1 i BRCA2. Stanice kod kojih su ovi geni mutirani kao što su stanice raka oslanjaju se na druge mehanizme za popravak oštećenja DNK što je značajno za djelovanje mnogih lijekova. Neki od tih lijekova su PARP-inhibitori, kojima se takvi mehanizmi inhibiraju i s obzirom da su drugi geni za popravak oštećenja mutirani dolazi do smrti stanice (Slika 2.) (3, 6). Američka uprava za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) i Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) odobrile su četiri takva lijeka koja čine skupinu PARP inhibitora: olaparib, rukaparib, niraparib te talazoparib (6).



**Slika 2.** Sprječavanje popravka oštećene DNK djelovanjem lijekova PARP-inhibitora. (Preuzeto s: <http://182.92.230.50:82/drug/pharmacology/11-Olaparib-moa-01.png>, datum pristupa: 11.9.2021.)

## 1.4. Apoptoza

Apoptoza, odnosno programirana stanična smrt jest mehanizam kojim višestanični organizmi kontroliraju proliferaciju stanica i održavaju homeostazu tkiva eliminirajući štetne i nepotrebne stanice (7). Odličan primjer značajnosti programirane stanične smrti jest razvoj živčanog sustava sisavaca. Neuroni sisavaca nastaju u suvišku te preživljavaju isključivo oni koji mogu stvoriti pravilne veze s vlastitim ciljnim stanicama koje im luče čimbenike rasta kako bi se spriječila apoptoza i potaknulo preživljenje. Sve ostale čeka ista sudbina – stanična smrt. Kod stanica sa oštećenom DNK, programiranom staničnom smrti se mogu ukloniti stanice koje sadrže potencijalno štetne mutacije, uključujući i one s mutacijama koje mogu potencirati nastanak karcinoma (8).

Programirana stanična smrt je proces koji obuhvaća niz staničnih promjena koji naposljetku dovode do raspadanja stanice u komadiće okružene membranom, koji se nazivaju apoptotičkim tjelešcima. Proces započinje fragmentacijom DNK zbog kidanja među nukleosomima, zatim se kromatin kondenzira, a jezgra raspada u male komadiće te završava raspadom same stanice u apoptotička tjelešca. Te fragmente i stanična tjelešca fagocitiraju i uklanjaju makrofagi i susjedne stanice prepoznajući fosfatidilserin. Signal u obliku fosfatidilserina, koji se inače nalazi u unutarnjem sloju membrane stanice, apoptozom dospijeva na staničnu površinu kako bi ga receptori fagocita prepoznali i uklonili taj fragment (8).

Proučavanjem razvoja *C. elegans* znanstvenik Robert Horvitz otkrio je tri gena koja su značajna za regulaciju i izvršavanje apoptoze: *ced-3* i *ced-4* kao geni koji potiču apoptozu te *ced-9* koji je negativni regulator apoptoze i potiče preživljenje normalnih i zdravih stanica. U stanicama sisavaca *ced-4* i njegov homolog vežu se na kaspaze što dovodi do njihove aktivacije, a one su proteaze koje kidaju različite proteine u stanici izvršavajući apoptozu. Proces započinje aktivacijom kaspaze-9 djelovanjem citokroma c koji se otpušta iz mitohondrija te njezinim vezanjem na Apaf-1 čime uz citokrom c nastaje kompleks naziva apoptosom. Kaspaza-9 dalje aktivira efektorske kaspaze, kaspazu-3 i kaspazu-7 što dovodi do apoptoze. Gen *ced-9* kao inhibitor stanične smrti u *C. elegans* srodan je genu *Bcl-2* koji ima sličnu funkciju u sisavaca. Članovi porodice Bcl-2 svoje djelovanje ostvaruju u mitohondrijima koji vrše nadzor nad programiranom staničnom smrti. Osim citokromom c kaspaze su regulirane i djelovanjem porodice proteina inhibitora apoptoze (engl. *inhibitor of apoptosis*, IAP) koje interakcijom s kaspazama koče apoptozu. Za njihovu inhibiciju zaslužni su inhibitori

IAP koji se nalaze u mitohondrijima, a uloga im je spriječiti aktivaciju kaspaza djelovanjem IAP-a (8).

Prethodno opisan proces apoptoze jest dio unutarnjeg ili intrinzičnog puta, a osim njega postoji i ekstrinzični put apoptoze. Polipeptidi koji ekstrinzičnim putem signaliziraju apoptozu članovi su porodice čimbenika tumorske nekroze (TNF). Oni se vežu na receptore porodice TNF od kojih je najpoznatiji receptor Fas. Nakon vezanja dolazi do trimerizacije receptora koji sadrži adaptorske molekule koje vežu i aktiviraju kaspazu-8, a ona zatim kida i aktivira efektorske kaspaze kaspazu-3 i kaspazu-7 te potiče staničnu smrt. U nekim je stanicama potrebna amplifikacija signala te aktivacija kaspaze-8 dovodi do kidanja i aktivacije samo-BH3 proteina naziva Bid koji dalje uzrokuje permeabilizaciju mitohondrija i aktivaciju kaspaze-9. Na ovaj se način dodatno pojačava kaskada kaspaza koja završava aktivacijom efektorskih kaspaza i smrću stanice. Stanična smrt potaknuta aktivacijom polipeptida Fas odgovorna je za smrt ciljnih stanica imunološkog sustava poput stanica karcinoma ili stanica koje su zaražene virusom te uklanjanje suviška limfocita na kraju imunološkog odgovora (8).



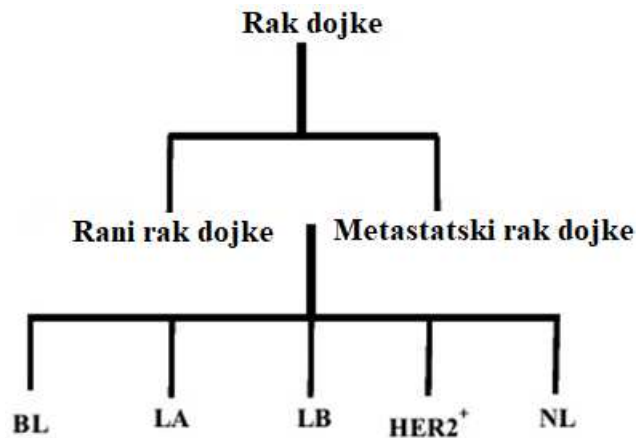
## 1.5. Rak dojke

Rak dojke jest najčešći tumor u žena u razvijenim zemljama svijeta. To je heterogena bolest u koju su uključeni različiti genetski i okolišni čimbenici (9,10). Čimbenici koji povećavaju rizik od nastanka raka dojke jesu: starija životna dob, pozitivna porodična anamneza, starija životna dob pri prvom porođaju, nerotkinje, rana menarha i kasna menopauza, izloženost zračenju tijekom života, debljina, primjena oralnih kontraceptiva, primjena hormonske nadomjesne terapije, dijagnoza dobroćudnih parenhimatoznih bolesti dojke i mnogi drugi čimbenici rizika (9). Također mutacije u genima supresorima tumora BRCA 1 i BRCA 2 značajno su povezane s razvojem raka dojke i jajnika do 70. godine (11).

Sama klinička slika tumora dojke najčešće se očituje kao bezbolan čvor u dojci. Osim toga moguća je pojava smečkasto-krvavog iscjetka, uvlačenje bradavica, otekline, navlačenje kože i upala u području tumora. Posebnu kliničku sliku ima upalni rak dojke koji se prikazuje upaljenom, crvenom, otečenom dojkom i kožom poput kore naranče, što je posljedica širenja raka u limfatične prostore dojke i kože s posljedičnim znakovima upale. Koristeći se današnjim dijagnostičkim tehnikama kao što su mamografija, ultrazvuk ili MR pregled dojki te redovitom samokontrolom dojki i inspeksijsko-palpacijskim pregledom liječnika, rak dojke mogao bi se otkriti u pretkliničkom stadiju (9).

Dijagnoza raka započinje kliničkim pregledom i anamnezom kojom se pokušava odrediti vrijeme pojave simptoma i znakova raka dojke te duljinu njihova trajanja i izloženost pojedinim čimbenicima rizika. Neki od pregleda i pretraga jesu vizualna inspekcija, mamografija, ultrazvučni pregled te magnetna rezonanca ovisno o dobi i anamnezi pacijentice (9).

Klasifikacija raka ima za cilj pružiti točnu dijagnozu bolesti i predviđanje ponašanja tumora kako bi se olakšalo donošenje onkoloških odluka (12). Ovisno o imunohistokemijskim i genskim obilježjima, tumore dojke dijelimo na luminalne tumore tipa A i B, HER2 pozitivne te trostruko negativne (Slika 3.) (9).



**Slika 3.** Podjela raka dojke ovisno o imunohistokemijskim i genskim obilježjima (13).

Luminalni tumori tipa A karakterizirani su visokom razinom estrogenskih i progesteronskih receptora, Ki-67 manjim od 20% i HER2 negativnošću za razliku od luminalnih tumora tipa B koje karakterizira razina progesteronskih receptora niža od 20% ili Ki-67 viši od 20%, ili HER2 pozitivnost. Tu su i trostruko negativni koje obilježava nedostatak estrogenske, progesteronske i HER2 pozitivnosti, a ujedno ih karakterizira najlošija prognoza za isti stadij bolesti (9).

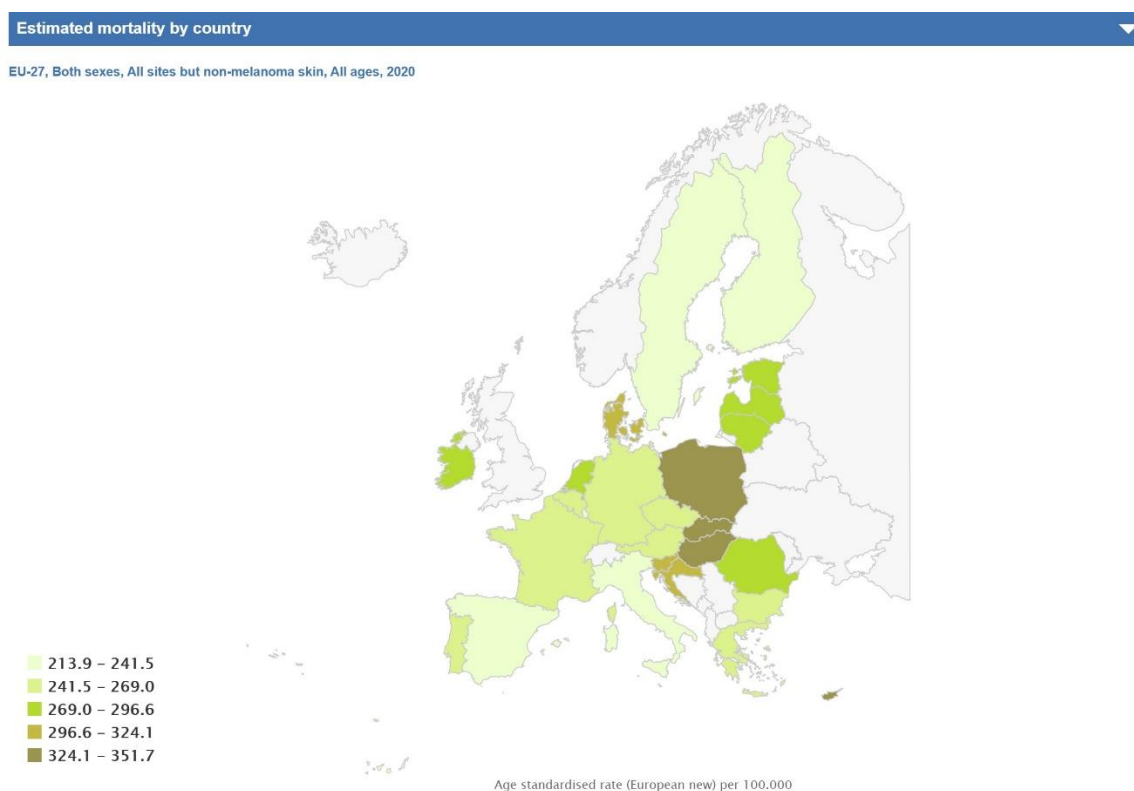
## 1.6. Terapija raka dojke

Liječenje karcinoma dojke uvjetovano je stupnjem proširenosti. Za lokalni rak dojke cilj je izlječenje, a kod proširenog raka dojke nastoji se osigurati maksimalno kvalitetan i dug život. Kod liječenja lokalnog, primarno operabilnog raka dojke započinje se kirurškim zahvatom kojim se nastoji ukloniti primarni tumor i moguće presadnice u području limfnih čvorova aksile. Nakon zahvata i patohistološkog opisa tumora, procjenjuje se stupanj vjerojatnosti ponovne pojave lokalnog recidiva ili diseminacije karcinoma dojke. Kod onih pacijentica sa srednjim i visokim stupnjem ponovne pojave tumora potrebno je uvesti adjuvantu terapiju, a to može biti radioterapija, kemoterapija, hormonska terapija te imunoterapija, ovisno o stanju nakon operacije. Za razliku od liječenja lokalnog, primarno neoperabilnog raka dojke, gdje se primjenjuje neoadjuvantna terapija koja obuhvaća kemoterapiju, radioterapiju, imunoterapiju ili hormonsku terapiju kako bi se smanjila veličina primarnog tumora prije samog kirurškog zahvata. Liječenje metastatske bolesti obuhvaća različite terapijske opcije kao što su kemoterapija, hormonska terapija, anti HER2 imunoterapija, uzimanje lijekova tirozin-kinazni inhibitori, inhibitori ciklin ovisnih kinaza 4 i 6, radioterapija te provođenje potporne simptomatske terapije, kako bi se osiguralo maksimalno moguće preživljenje (9).

Brojni lijekovi koji se upotrebljavaju u kemoterapiji za liječenje karcinoma dojke djeluju na različite načine i mogu se osim kao monoterapija uzimati i u različitim kombinacijama. Neki lijekovi koji se primjenjuju u kombinacijama jesu ciklofosamid, doksorubicin ili epirubicin, 5-fluorouracil, metotreksat, paklitaksel ili docetaksel, monoklonsko antitijelo transtuzumab i antimetabolit 2-deoksi-d-glukoza (14).

## 1.7. Epidemiologija raka dojke u svijetu

Teoriji da je rak dijelom posljedica djelovanja različitih okolnih čimbenika doprinosi činjenica da se incidencija raka razlikuje diljem svijeta te se mijenja tijekom vremena, a osim toga useljenici u nekoj zemlji poprimaju određene okolišne čimbenike rizika zemlje u koju su se doselili (15). U razvijenim zemljama rak je po učestalosti drugi uzrok smrti, nakon kardiovaskularnih bolesti. Karcinom dojke jest najčešće dijagnosticirana zloćudna bolest. Prema procjenama u zemljama članicama EU, više od 355.000 žena će se u 2020. godini suočiti s dijagnozom karcinoma dojke, a to je 13,3% svih dijagnoza karcinoma (Slika 4.) (16).



**Slika 4.** Dobno-standardizirane stope (europsko stanovništvo) mortaliteta od raka u EU-27 zemlje. (Preuzeto s: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>, datum pristupa: 15.9.2021.)

## **1.8. Epidemiologija raka dojke u Hrvatskoj**

U Hrvatskoj od raka dojke obolijeva četvrtina žena novooboljelih od raka. Prema posljednjim podacima Registra za rak u Hrvatskoj je u 2017. godini zabilježeno 2767 novooboljelih žena, a u 2019. godini umrle su 752 žene. Rak se dojke najčešće javlja u žena iznad 50 godina, ali u najnovije vrijeme povećava se učestalost obolijevanja žena u četrdesetim, tridesetim te dvadesetim godinama. Sve žene u Hrvatskoj od 50 do 69 godina obuhvaćene su Nacionalnim programom ranog otkrivanja raka dojke. Taj program obuhvaća mogućnost obavljanja mamografskog pregleda dojki svake dvije godine putem poziva za besplatnu mamografiju koji je ženama dostavljen na kućnu adresu. Time se nastoji smanjiti smrtnost od karcinoma dojke za 25% do 30% te otkriti rak u početnom stadiju kako bi se poboljšala kvaliteta života pacijentica oboljelih od raka dojke (17).

## 1.9. Tienopiridinski derivati

Ranija istraživanja u kojima se ispitivalo djelovanje antikancerogenih spojeva odnosno derivata tieno[2,3-*b*]piridina dokazala su značajni utjecaj na povećanje postotka apoptoze stanica raka dojke i stanica raka prostate. Istraživanje učinka 3-amino-5-okso-*N*-naftifil-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamida na stanice karcinoma dojke iz stanične linije MDA-MB-321 te na stanice karcinoma prostate iz stanične linije Du-145 pokazalo je citotoksičnost toga spoja za stanice ovih staničnih linija. Možemo pretpostaviti da je povećanje broja stanica koje su se nalazile u apoptozi i smanjenje postotka subpopulacije matičnih stanica karcinoma posljedica povećane ekspresije GM3 na staničnim linijama MDA-MB-231. Ova je pretpostavka u skladu sa nedavnim otkrićem da GM3 posreduje apoptozu potaknutu cisplatinom u stanicama ljudskog karcinoma debelog crijeva. Poznato je da GM3 inhibira tirozin kinaze povezane s receptorima epidermalnog čimbenika rasta i čimbenika rasta fibroblasta (EGF i FGF receptorima) koji nakon aktivacije fosforilacijom potiču staničnu proliferaciju. Osim toga FGF može dovesti do povećanja aktivnosti fosfolipaze C- $\delta$  i dovesti do povećane stanične proliferacije. Djelovanjem ispitivanog derivata tieno[2,3-*b*]piridina smanjuje se produženo djelovanje fosfolipaze C- $\delta$ , a samim time smanjena je i proliferacija stanica (18).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

## 2.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je dokazati djelovanje sintetski dobivenog (*E*)-3-amino-5-(3-3-bromofenil)akriloil)-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-6-metiltieno[2,2-*b*]piridin-2-karboksamid inhibitora (inhibitor 8) na apoptozu različitih staničnih linija humanog karcinoma dojke.

Učinak inhibitora 8 na apoptozu humanih linija karcinoma dojke ispitivat će se na staničnim linijama karcinoma dojke MCF7 i MDA-MB-231.



## **2.2. Hipoteza**

Inhibitor 8 ima pro-apoptotski učinak na ispitivane humane stanične linije karcinoma dojke: MCF7 i MDA-MB-231.

### **3. MATERIJALI I METODE**

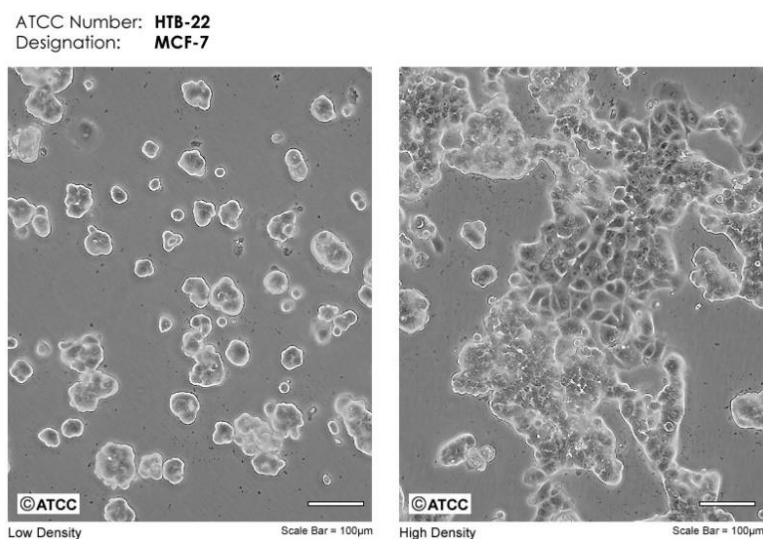
## 3.1. Stanične linije

### 3.1.1. MCF7

**Tablica 2.** Prikaz karakteristika MCF7 stanične linije.

(Podaci prilagođeni i preuzeti s: [www.lgcstandards-atcc.org](http://www.lgcstandards-atcc.org), datum pristupa: 27.9.2021.)

<b>Organizam</b>	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
<b>Vrsta stanice</b>	epitelna stanica
<b>Tkivo</b>	dojka; mliječna žlijezda
<b>Forma proizvoda</b>	smrznuto
<b>Morfologija</b>	epitelna
<b>Obilježje kulture</b>	adherentna
<b>Bolest</b>	adenokarcinom



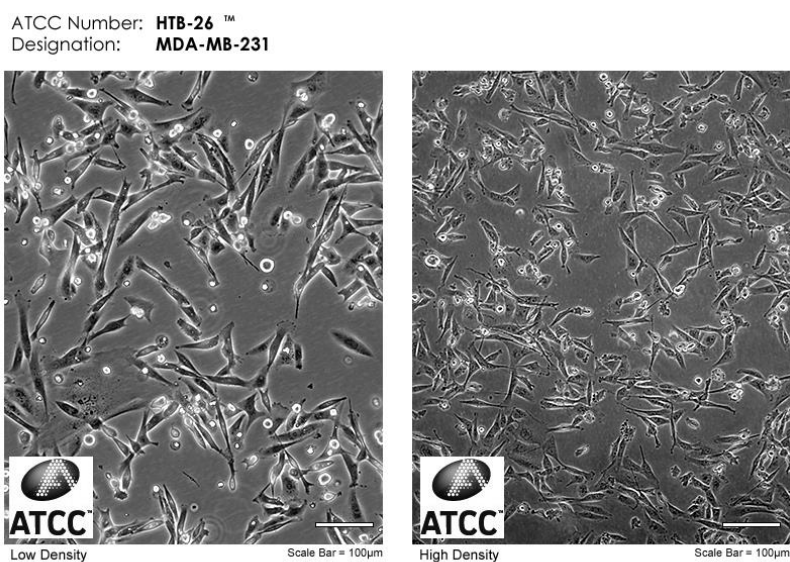
**Slika 5.** Stanične linije karcinoma dojke MCF7.  
(Preuzeto sa: [www.lgcstandards-atcc.org](http://www.lgcstandards-atcc.org), datum pristupa: 27.9.2021.)

### 3.1.2. MDA-MB-231

**Tablica 1.** Prikaz karakteristika MDA-MB-231 stanične linije.

Podaci prilagođeni i preuzeti s: [www.lgcstandards-atcc.org](http://www.lgcstandards-atcc.org), datum pristupa: 27.9.2021.)

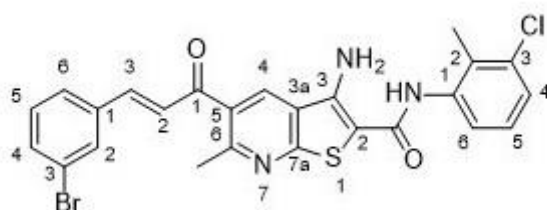
<b>Organizam</b>	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
<b>Tkivo</b>	dojka; mliječna žlijezda
<b>Vrsta stanice</b>	epitelna stanica
<b>Forma proizvoda</b>	smrznuto
<b>Morfologija</b>	epitelna
<b>Obilježje kulture</b>	adherentna
<b>Bolest</b>	adenokarcinom



**Slika 6.** Stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231.  
(Preuzeto sa: [www.lgcstandards-atcc.org](http://www.lgcstandards-atcc.org), datum pristupa: 27.9.2021.)

### 3.2. Novosintetizirani inhibitor

Novosintetizirani spoj (Slika 7.) pripada skupini derivata tieno[2,3-*b*]piridina odnosno antikancerogenih spojeva kako su pokazala provedena istraživanja dokazavši značajni utjecaj na povećanje apoptoze stanica raka dojke i stanica raka prostate (18). Ovaj inhibitor iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina otkriven je računalnim modeliranjem.



**Slika 7.** Novosintetizirani inhibitor, (*E*)-3-amino-5-(3-3-bromofenil)akriloil)-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-6-metiltieno[2,2-*b*]piridin-2-karboksamid

Taj spoj je primijenjen na staničnim linijama MDA-MB-231 te MCF7 kako je opisano u postupku. Pripremljen je otapanjem u dimetil sulfoksidu (engl. *dimethyl sulfoxide*, DMSO) kako bismo dobili otopinu 100  $\mu$ M koncentracije. U ovom je istraživanju korištena koncentracija inhibitora od 2  $\mu$ M (za liniju MDA-MB-231) i 9  $\mu$ M (za liniju MCF7), a dobivena je tako što smo inhibitor 8 razrijedili izotoničnim fosfatnim puferom, PBS-om.

### 3.3. Priprema staničnih linija

Stanice iz staničnih linija MCF7 i MDA-MB-231 nakon odmrzavanja uzgajane su unutar vlažnog inkubatora na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub> u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) mediju. U medij se dodaje 10%-tni fetalni goveđi serum pa su stanicama osigurani svi potrebni hranjivi sastojci te 1%-tna otopina antibiotika (EuroClone, Milano, Italija) kako bi se spriječila infekcija stanične kulture.

### 3.4. MTT

Pomoću rezultata dobivenih MTT testom odredili smo koncentraciju kojom ćemo tretirati stanice kako bismo ispitali djelovanje inhibitora 8 na apoptozu odabranih staničnih linija, MCF7 i MDA-MB-231. Test MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) upotrebljava se za procjenu metaboličke aktivnosti živih stanica, a temelji se na enzimskoj redukciji svjetlo obojene soli tetrazolija u formazan intenzivne ljubičasto-plave boje, koji se može odrediti spektrofotometrijski. Unutar optimiziranih uvjeta dobivena vrijednost apsorbancije izravno je proporcionalna broju živih stanica (19).

### 3.5. Postupak

Nakon inkubacije usisali smo hranjivi medij iz petrijeve zdjelice u kojoj su se nalazile stanice i dodali smo tripsin kako bi se stanice odvojile od podloge. Zatim smo podjednak broj stanica nasadili na ploče sa šest jažica te dodali DMEM i ostavili da djeluje preko noći.

Idući smo dan uklonili hranjivi medij iz jažica, a stanice su bile adherirane za dno. Inhibitor 8 smo razrijedili dodatkom DMEM-a te u svaku jažicu dodali 2 ml 2  $\mu$ M (ili 9  $\mu$ M) otopine inhibitora 8. U tri jažice je dodan čisti DMEM medij i te su stanice služile kao kontrola. Nakon toga smo petrijeve zdjelice ponovno stavili u inkubator i ostavili ih unutar inkubatora 48 sati. Stanice su zatim odvojene od podloge djelovanjem tripsina, isprane pomoću fosfatnog pufera (PBS) te resuspendirane u 100ml pufera za vezivanje. Nakon toga smo dodali 5  $\mu$ l Annexin V-fluorescein izotiocijanata (FITC) i 5  $\mu$ l propidij jodida (PI) (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit, BioLegend, San Diego, SAD ). Na površini zdrave stanice, s unutarnje i vanjske strane, nalaze se asimetrično raspoređeni lipidi. Jedan od tih lipida je i fosfatidilserin (PS) koji se u zdravoj stanici nalazi na citoplazmatskoj strani stanične membrane. Tijekom apoptoze raspored lipida na površini stanice se mijenja te fosfatidilserin postaje izražen na vanjskoj strani stanične membrane. Annexin V jest protein koji se veže na fosfatidilserin, stoga se kad je stanica u apoptozi, a fosfatidiserin s vanjske strane membrane, Annexin V može vezati za taj lipid. Osim za stanice u apoptozi Annexin V se veže i za stanice u nekrozi s obzirom da je raspored lipida na njihovoj membrani narušen. Zato osim tog proteina za obilježavanje stanica upotrebljavamo i PI koji ulazi u stanice u nekrozi, ali se ne veže za stanice koje se nalaze u apoptozi (20). PI djeluje tako što se selektivno veže na nukleinske kiseline unutar stanice nakon što stanična membrana izgubi integritet. Takva kombinacija

obilježavanja stanica aneksinom V konjugiranim s FITC-om i PI omogućava razlikovanje živih stanica (Annexin-V- i PI-), stanica u ranoj (Annexin-V+ i PI-) i kasnoj (Annexin-V+ i PI+) apoptozi (21).

Stanice su inkubirane na sobnoj temperaturi, u mraku tijekom 15 minuta, potom su analizirane protočnim citometrom (BD Accuri C6, BD Biosciences) kojim smo mjerili fluorescenciju obojenih uzoraka. Postotak stanica koje su se nalazile u apoptozi analiziran je pomoću Flow Logic Software-a i izražen je kao broj pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica, a njihova je vrijednost postavljena kao 100% (22).

### **3.6. Protočna citometrija**

Protočni citometar je sofisticirani uređaj pomoću kojeg možemo mjeriti različite fizičke karakteristike stanice, kao što su veličina i unutarnja građa stanice prilikom prolaska kroz citometar. Rad ovog uređaja temelji se na raspršenju svjetla i fluorescenciji tvari kojom smo obilježili ispitivane stanice. Raspršenje koje detektira citometar povezano je sa strukturnim i morfološkim značajkama, a fluorescirajuće zračenje je proporcionalno količini fluorescirajuće tvari vezane za određenu komponentu stanice (23).

Fluidnost kao komponenta protočnog citometra usmjerava tekućinu koja sadrži stanice prema fokusiranom izvoru svjetlosti. Optička ekscitacija fokusira izvor svjetlosti na stanice odnosno čestice te prolaskom stanice kroz izvor svjetlosti uređaj detektira različita raspršenja i različitu jakost fluorescencije koji se kasnije interpretiraju pomoću grafova u računalnom programu (23).

### **3.7. Statistička analiza**

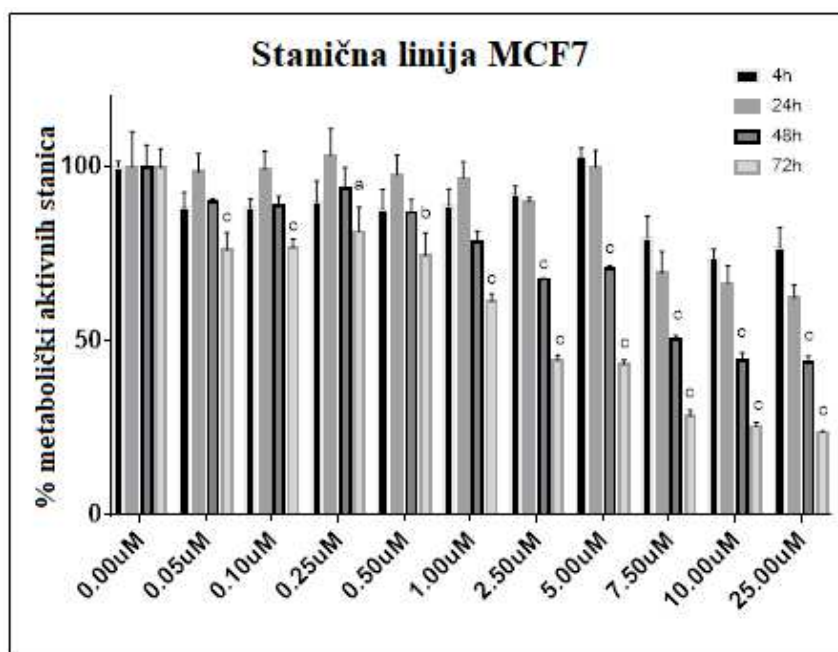
Podaci dobiveni protočnom citometrijom analizirani su programom GraphPad Prism v.7.0 (San Diego, SAD), a obrađeni su student t-testom sa statističkom značajnošću  $P < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**



## 4.1. MCF7

Pomoću rezultata dobivenih MTT testom odredili smo koncentraciju kojom ćemo tretirati stanice za testiranje djelovanja inhibitora 8 na apoptozu stanične linije MCF7. Koncentracija inhibitora koju smo upotrijebili jest 9,006  $\mu\text{g/ml}$  (Slika 8., Tablica 3.) koja se pokazala najznačajnijom putem MTT metode.



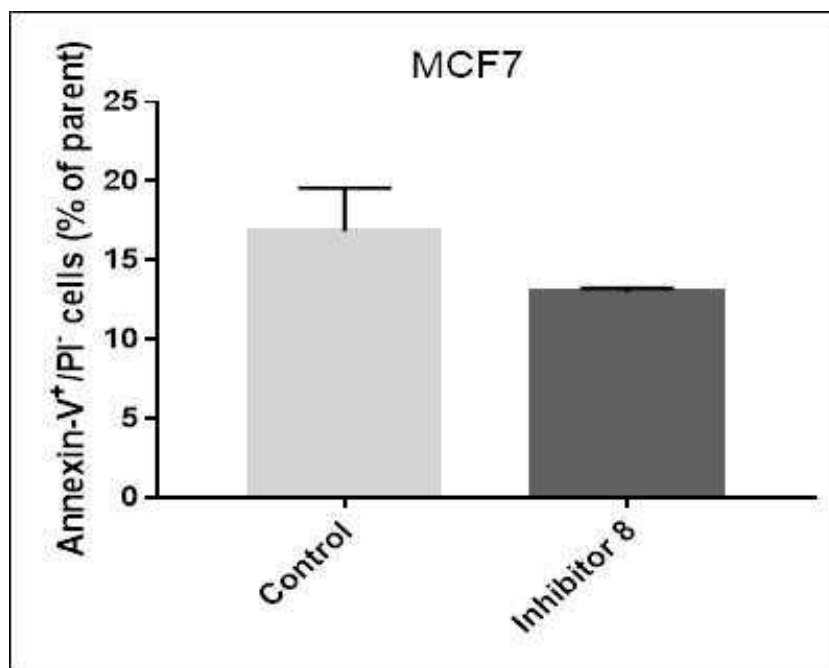
**Slika 8.** Citotoksična aktivnost inhibitora 8 na staničnu liniju MCF7, a – označava  $P < 0,05$ , b – označava  $P < 0,01$ , c – označava  $P < 0,001$

**Tablica 3.** Koncentracije inhibitora 8 dobivene MTT metodom.

	4h	24h	48h	72h
<b>IC50 (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	53,81	30,71	<b>9,006</b>	2,312

IC50 – koncentracija koja je uzrokovala apoptozu 50% stanica tretiranih inhibitorom 8

Postotak stanica tretiranih s inhibitorom 8 u ranoj apoptozi nije pokazao statistički značajan porast u odnosu na netretirane stanice karcinoma (Slika 9., Tablica 4.) što se nadomješta porastom stanica koje se nalaze u kasnoj te ukupno ranoj i kasnoj apoptozi (Slika 10., Slika 11.).

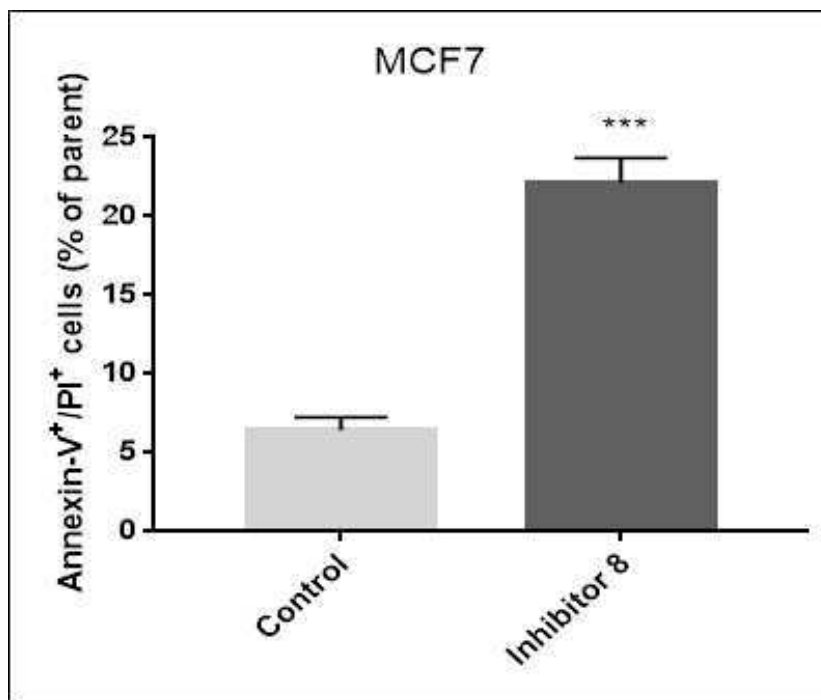


**Slika 9.** Grafički prikaz stanica tretiranih inhibitorom 8 i netretiranih stanica iz stanične linije MCF7 u ranoj apoptozi.

**Tablica 4.** Učinak inhibitora 8 na ranu apoptozu stanične linije MCF7 u odnosu na kontrolu.

<b>RANA APOPTOZA INHIBITOR 8</b>			
Značajan?	<i>P</i>	prosjeak kontrola	prosjeak inhibitor 8
Ne	0,070	16,86	12,99

Postotak stanica tretiranih s inhibitorom 8 u kasnoj apoptozi je značajno porastao u odnosu na netretirane stanice (s 6,42 % na 22,09 %,  $P = 0,0001$ ) (Slika 10., Tablica 5.).

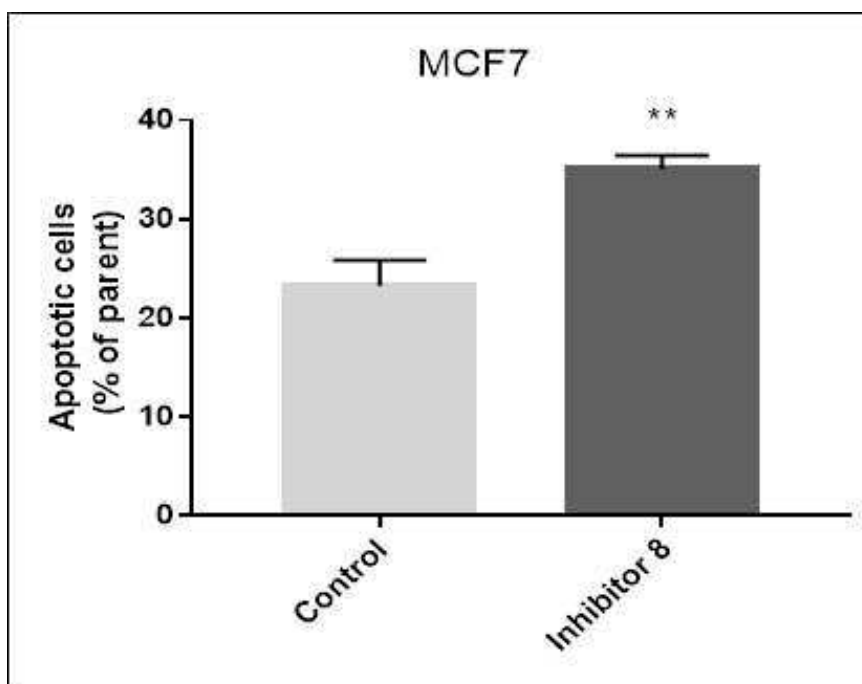


**Slika 10.** Grafički prikaz stanica tretiranih inhibitorom 8 i netretiranih stanica iz stanične linije MCF7 u kasnoj apoptozi, \*\*\* - označava  $P < 0,001$ .

**Tablica 5.** Učinak inhibitora 8 na kasnu apoptozu stanične linije MCF7 u odnosu na kontrolu.

<b>KASNA APOPTOZA INHIBITOR 8</b>			
Značajan?	<i>P</i>	prosjek kontrola	prosjek inhibitor 8
Da	0,0001	6,42	22,09

Ukupni postotak stanica u ranoj i kasnoj apoptozi tretiranih s inhibitorom 8 također je zabilježio porast u odnosu na netretirane stanice (s 23,28 % na 35,07 %,  $P = 0,002$ ) (Slika 11., Tablica 6.).

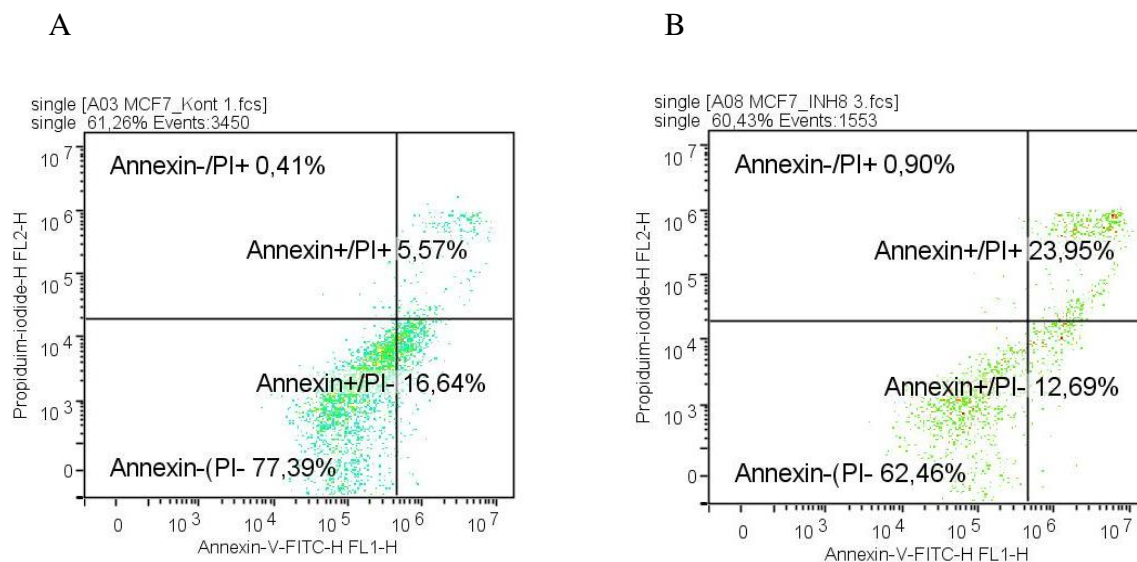


**Slika 11.** Grafički prikaz stanica tretiranih inhibitorom 8 i netretiranih stanica iz stanične linije MCF7 u ranoj i kasnoj apoptozi, \*\* - označava  $P < 0,01$ .

**Tablica 6.** Učinak inhibitora 8 na kasnu i ranu apoptozu stanične linije MCF7 u odnosu na kontrolu.

<b>RANA I KASNA APOPTOZA INHIBITOR 8</b>			
Značajan?	<i>P</i>	prosjeak kontrola	prosjeak inhibitor 8
Da	0,002	23,28	35,07

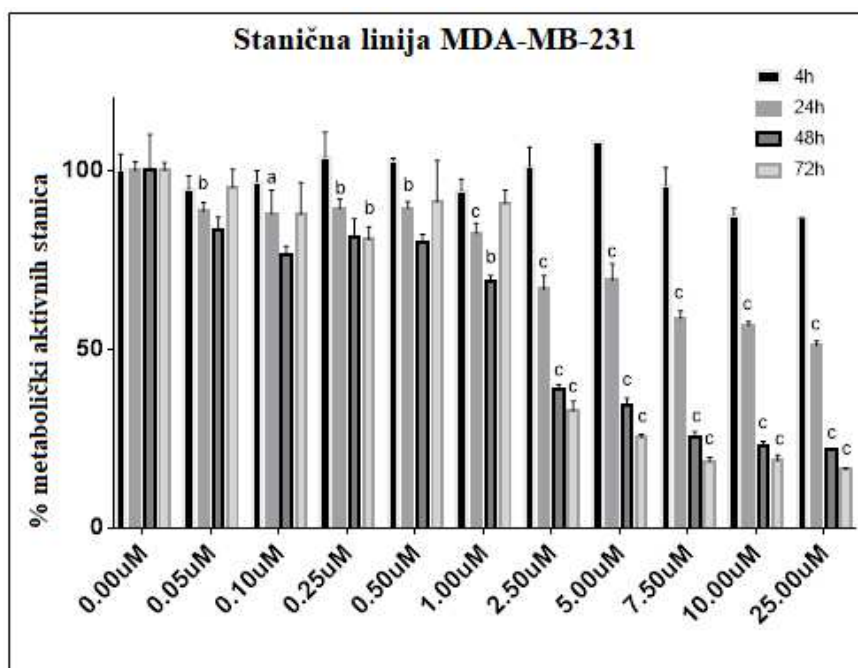
Protočnim citometrom smo dobili točkaste dijagrame koji nam slikovito prikazuju subpopulacije stanica MCF7 kontrole i stanica tretiranih inhibitorom 8 koje se nalaze u ranoj apoptozi, kasnoj apoptozi te one koje nisu u apoptozi (Slika 12.).



**Slika 12.** Točkasti dijagrami stanica MCF7 kontrole (A) i stanica tretiranih inhibitorom 8 (B).

## 4.2. MDA-MB-231

Pomoću rezultata dobivenih MTT testom odredili smo koncentraciju kojom ćemo tretirati stanice za testiranje djelovanja inhibitora 8 na apoptozu stanične linije MDA-MB-231. Koncentracija inhibitora koju smo upotrijebili jest 2,082  $\mu\text{g/ml}$  (Slika 13., Tablica 7.), a pokazala se najznačajnijom putem MTT metode.



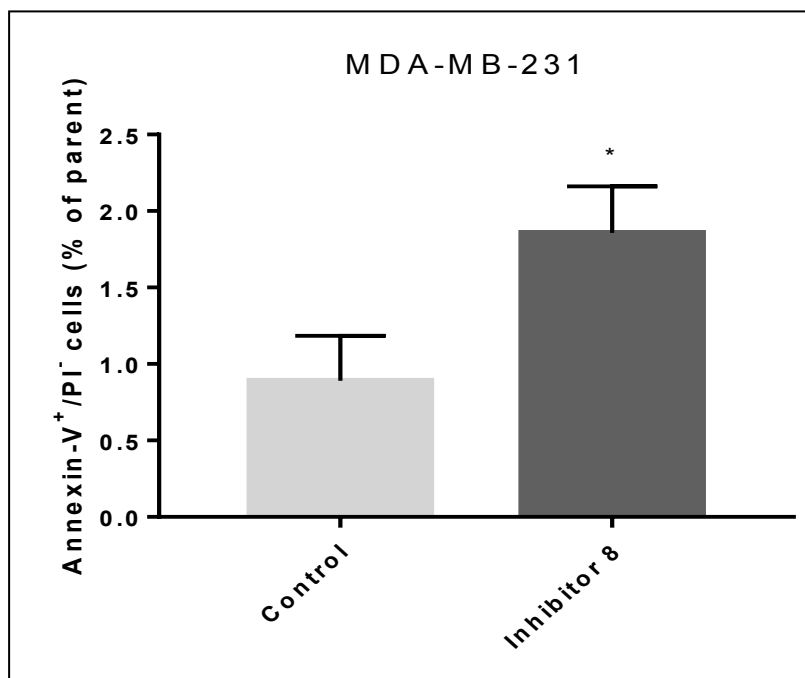
**Slika 13.** Citotoksična aktivnost inhibitora 8 na staničnu liniju MCF7, a – označava  $P < 0,05$ , b – označava  $P < 0,01$ , c – označava  $P < 0,001$

**Tablica 7.** Koncentracije inhibitora 8 dobivene MTT metodom.

	4h	24h	48h	72h
<b>IC50 (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	138	12,02	<b>2,082</b>	2,188

IC50 – koncentracija koja je uzrokovala apoptozu 50% stanica tretiranih inhibitorom 8

Postotak stanica tretiranih s inhibitorom 8 u ranoj apoptozi je značajno porastao u odnosu na netretirane stanice (s 2,86 % na 5,50 %,  $P = 0,0168$ ) (Slika 14., Tablica 8.).

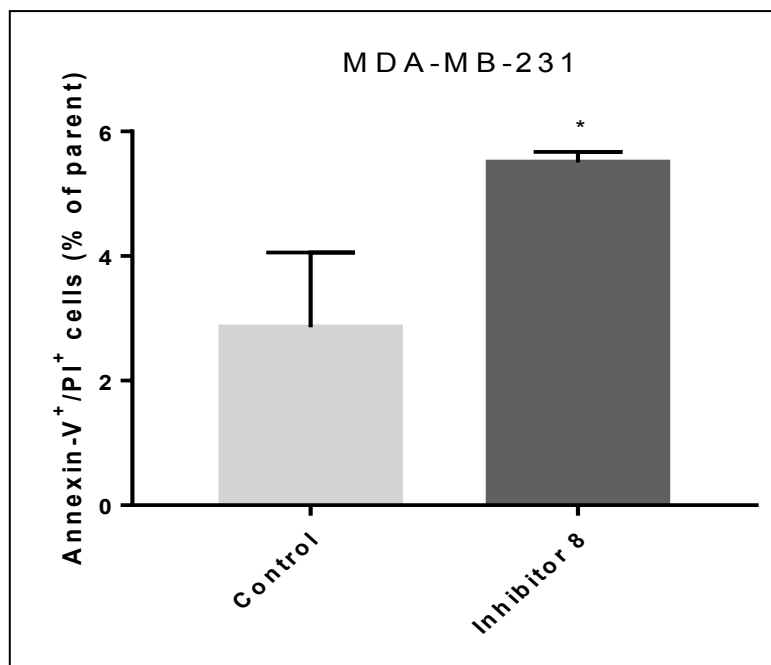


**Slika 14.** Grafički prikaz stanica tretiranih inhibitorom 8 i netretiranih stanica iz stanične linije MDA-MB-231 u ranoj apoptozi., \* - označava  $P < 0,05$ .

**Tablica 8.** Učinak inhibitora 8 na ranu apoptozu stanične linije MDA-MB-231 u odnosu na kontrolu.

RANA APOPTOZA INHIBITOR 8			
Značajan?	<i>P</i>	prosjek kontrola	prosjek inhibitor 8
Da	0,017	2,86	5,50

Zabilježen je značajan porast postotka stanica u kasnoj apoptozi tretiranih s inhibitorom 8 u odnosu na netretirane stanice (s 2,86 % na 16,51 %,  $P = 0,0194$ ) (Slika 15., Tablica 9.).



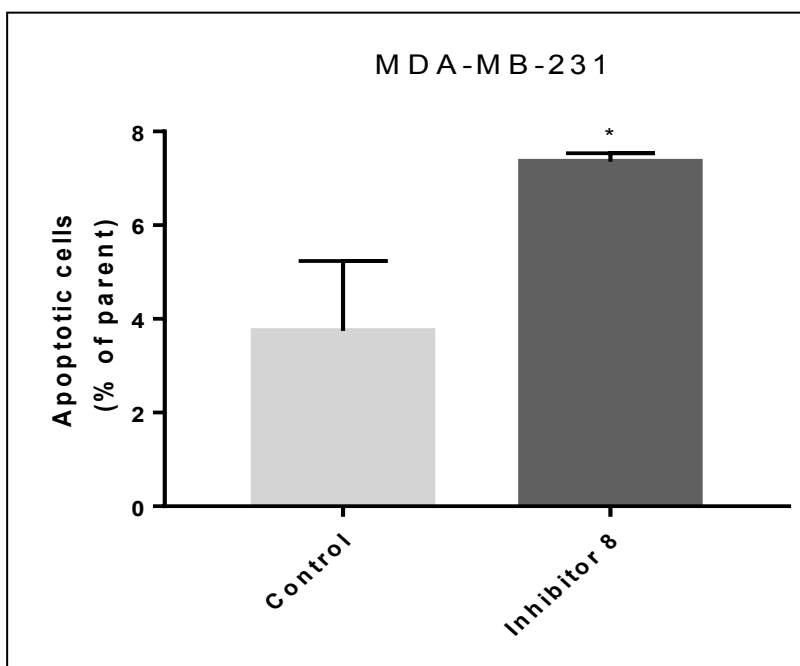
**Slika 15.** Grafički prikaz stanica tretiranih inhibitorom 8 i netretiranih stanica iz stanične linije MDA-MB-231 u kasnoj apoptozi., \* - označava  $P < 0,05$ .

**Tablica 9.** Učinak inhibitora 8 na kasnu apoptozu stanične linije MDA-MB-231 u odnosu na kontrolu.

<b>KASNA APOPTOZA INHIBITOR 8</b>			
Značajan?	<i>P</i>	prosjeck kontrola	prosjeck inhibitor 8
Da	0,019	2,86	16,51



Ukupni postotak stanica u ranoj i kasnoj apoptozi tretiranih s inhibitorom 8 također je zabilježio porast u odnosu na netretirane stanice (s 3,74 % na 7,36 %,  $P = 0,014$ ) (Slika 16., Tablica 10.).



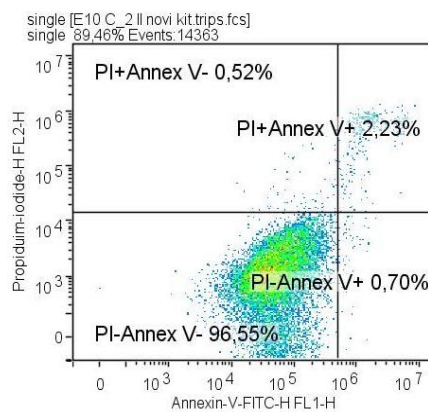
**Slika 16.** Grafički prikaz stanica tretiranih inhibitorom 8 i netretiranih stanica iz stanične linije MDA-MB-231 u ranoj i kasnoj apoptozi., \* - označava  $P < 0,05$ .

**Tablica 10.** Učinak inhibitora na kasnu apoptozu stanične linije MDA-MB-231 u odnosu na kontrolu.

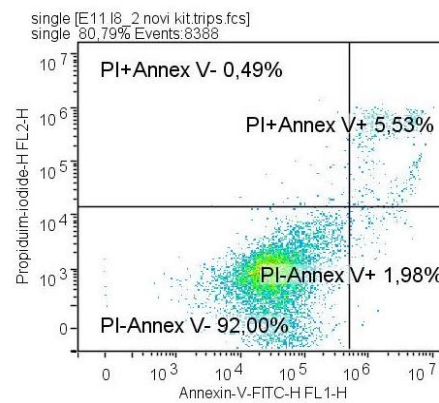
RANA I KASNA APOPTOZA INHIBITOR 8			
Značajan?	<i>P</i>	prosjeak kontrola	prosjeak inhibitor 8
Da	0,014	3,74	7,36

Protočnim citometrom smo dobili točkaste dijagrame koji nam slikovito prikazuju subpopulacije stanica MDA-MB-231 kontrole i stanica tretiranih inhibitorom 8 koje se nalaze u ranoj apoptozi, kasnoj apoptozi te one koje nisu u apoptozi (Slika 17.).

A



B



**Slika 17.** Točkasti dijagrami stanica MDA-MB-231 kontrole (A) i stanica tretiranih inhibitorom 8 (B).

## **5. RASPRAVA**

Rak nastaje iz stanica koje su izgubile sposobnost adekvatnog odgovora na brojne signale te se kao posljedica javlja nekontrolirana dioba zloćudno preobraženih stanica (1). Europa čini 9% ukupne svjetske populacije, ali ima 25% udjela u globalnom teretu raka. Procjenjuje se da je u Europi 2018. godine bilo 3,91 milijuna novih slučajeva raka (isključujući rak kože bez melanoma) i 1,93 milijuna smrtnih slučajeva od raka. Najveću pojavnost ima rak dojke u žena (523.000 slučajeva), zatim kolorektalni rak (500.000), rak pluća (470.000) i rak prostate (450.000) (24).

Apoptozom, odnosno procesom programirane stanične smrti organizmi kontroliraju proliferaciju stanica i održavaju homeostazu tkiva (7).

Cilj ovog istraživanja bio je dokazati djelovanje sintetski dobivenog inhibitora na apoptozu MDA-MB-23 i MCF7 staničnih linija humanog karcinoma dojke. Novosintetizirani inhibitor pripada skupini tienopiridinskih derivata za čije su članove provedenim istraživanjima dokazana antikancerogena svojstva, posebice njihovo djelovanje na stanice tumora dojke (25). Povećana ekspresija GM3 na staničnim linijama MDA-MB-231 dovela je do povećanja postotka stanica koje su se nalazile u apoptozi. Poznato je da GM3 inhibira tirozin kinaze povezane s receptorima epidermalnog faktora rasta i faktora rasta fibroblasta (EGF i FGF receptorima) koji se nalaze u ispitivanim stanicama. Kada ljudski embrionalni fibroblasti prijanjaju, povećavaju signalizaciju koja dovodi do aktivacije FGF receptora putem fosforilacije tirozina i na taj način potiču staničnu proliferaciju u uvjetima bez seruma odnosno bez dodatka FGF-a (18). Djelovanjem derivata tieno[2,3-*b*]piridina smanjuje se produženo djelovanje fosfolipaze C, a samim time smanjena je i proliferacija stanica s obzirom da je tada aktivnost protein kinaze C kao ključne molekule u staničnoj signalizaciji ograničena (18,26). Fosfolipaze C mogu hidrolizirati polifosfoinozimid PIP<sub>2</sub> čime nastaju dva važna sekundarna glasnika IP<sub>3</sub> i DAG. Oni dalje potiču aktivaciju protein kinaze C i oslobađanje iona kalcija iz unutarstaničnih zaliha (27). Unutarstanični glasnik IP<sub>3</sub> se zatim odvaja od membrane i stupa u interakciju sa specifičnim receptorima čime se regulira oslobađanje iona kalcija, dok DAG ostaje vezan za membranu kako bi posredovao aktivaciju protein kinaze C nakon otpuštanja kalcija (28). To predstavlja ključni događaj u staničnoj signalizaciji kod različitih vrsta tumora jer je protein kinaza C uključena u proliferaciju, migraciju, diferencijaciju i rast stanica (26).

Pomoću rezultata dobivenih MTT testom odredili smo koncentraciju kojom ćemo tretirati stanice za testiranje djelovanja inhibitora 8 na apoptozu odabranih staničnih linija. Upotrebile su koncentracije od 2  $\mu$ M za staničnu liniju MDA-MB-231 i 9  $\mu$ M za staničnu

liniju MCF7, a tretman je trajao 48 h. Primjena inhibitora 8 na stanice stanične linije MCF7 pokazala je da nema učinka na ranu apoptozu, ali da postoji značajno povećanje postotka stanica koje se nalaze u kasnoj te ukupno ranoj i kasnoj apoptozi. Također inhibitor 8 je pokazao blagi, ali statistički značajan porast postotka stanica MDA-MB-231, stanične linije trostruko negativnog raka dojke u ranoj, kasnoj te ukupno ranoj i kasnoj apoptozi. Ovim istraživanjem dokazali smo učinak novosintetiziranog tieno[2,3-*b*]piridina na povećanje postotka apoptotskih stanica karcinoma dojke. Ovakav rezultat mogao bi predstavljati novi terapijski pristup u liječenju trostruko negativnog raka dojke.

## **6. ZAKLJUČCI**

- a) *In vitro* izlaganje stanica karcinoma dojke MCF7 i MDA-MB-231 novosintetiziranom inhibitoru 8 dovodi do smanjenja preživljenja ispitivanih tumorskih stanica.
- b) Postotak stanica MCF7 tretiranih s inhibitorom 8 u ranoj apoptozi manji je u odnosu na netretirane stanice te stanične linije.
- c) Postotak stanica MCF7 tretiranih inhibitorom 8 u kasnoj apoptozi statistički je značajno porastao u odnosu na netretirane stanice.
- d) Postotak stanica MDA-MB-231 tretiranih s inhibitorom 8 u ranoj apoptozi je porastao u odnosu na netretirane stanice.
- e) Postotak stanica MDA-MB-231 tretiranih inhibitorom 8 u kasnoj apoptozi statistički je značajno porastao u odnosu na netretirane stanice.
- f) Postotak stanica MCF7 I MDA-MB-231 tretiranih inhibitorom 8 u apoptozi (ukupno ranoj i kasnoj) statistički je značajno porastao u odnosu na netretirane stanice.

## **7. LITERATURA**



1. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Biologija raka: Genska osnova raka. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 1–2.
2. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Biologija raka: Onkogeni. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 2–6.
3. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Biologija raka: Tumorsupresorski geni. In: Raič A, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 6–10.
4. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *J Cell*. 2012;150:12-27.
5. Wood DJ, Endicott JA. Structural insights into the functional diversity of the CDK-cyclin family. *Open Biol*. 2018;8:180112.
6. Slade D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. *Genes Dev*. 2020;34:360-394.
7. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16:2129-44.
8. Cooper, M.G. HER. Stanični ciklus: Regulacija programirane stanične smrti. In: Gordan Lauc, editor. Stanica. 3rd ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. p. 580–2.
9. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Biologija raka: Rak dojke. In: A.Raič, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 193–202.
10. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalboladi S i sur. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol*. 2020;84:106535.
11. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast cancer epidemiology, prevention, and screening. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;151:1-32.
12. Tsang JYS, Tse GM. Molecular classification of breast cancer. *Adv Anat Pathol*. 2020;27:27-35.
13. Fisusi FA, Akala EO. Drug combinations in breast cancer therapy. *Pharm Nanotechnol*. 2019;7:3-23.
14. Shamsi M, Islamian JP. Breast cancer: early diagnosis and effective treatment by drug delivery tracing. *Nucl Med Rev Cent East Eur*. 2017;20:45-48.

15. Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health*. 2019;9:217-222.
16. HZJZ. Odjel za programe probira raka dojke [internet]. 2021 [citirano 15. rujna 2021.] <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prewencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>
17. HZJZ. Incidencija i mortalitet od raka u EU-27 zemljama za 2020. godinu [internet]. 2020 [citirano 15. rujna 2021.] <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prewencija-nezaraznih-bolesti/odjel-za-programe-probira-raka-dojke/>
18. Mastelić A, Čikeš Čulić V, Režić Mužinić N, Vuica-Ross M, Barker D, Leung EY i sur. Glycophenotype of breast and prostate cancer stem cells treated with thieno[2,3-b]pyridine anticancer compound. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:759-769.
19. Grela E, Kozłowska, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochem*. 2018;120:303-311.
20. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of apoptosis and necrosis by Annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;087288.
21. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184:39-51.
22. BD Pharmingen. Technical Data Sheet. BD Pharmingen; p. 1–3.
23. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2015;1128876.
24. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram, Dyba T, Randi G, Bettio M i sur. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*. 2018;103:356-387.
25. Zafar A, Sari S, Leung E, Pilkington LI, van Rensburg M, Barker D i sur. GPCR modulation of thieno[2,3-b]pyridine anti-proliferative agents. *Molecules*. 2017;22:2254.
26. Mertelli AM, Evangelisti C, Nyakern M, Manzoli FA. Nuclear protein kinase C. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761:542-51.
27. Obeng EO, Rusciano I, Marvi MV, Fazio A, Ratti S, Follo MY i sur. Phosphoinositide-dependent signaling in cancer: a focus on phospholipase C izozymes. *Int J Mol Sci*. 2020;21:2581.

28. Lyon AM, Tesmer JJG. Structural insights into phospholipase C- $\beta$  function. *Mol Pharmacol.* 2013;84:488-500.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj:** Cilj ovog istraživanja jest dokazati djelovanje sintetski dobivenog inhibitora iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina na apoptozu stanica staničnih linija MCF7 karcinoma dojke i MDA-MB-231 trostruko negativnog karcinoma dojke. Pretpostavka je da će se nakon tretiranja tumorskih staničnih linija inhibitorom postotak stanica u ranoj, kasnoj te ranoj i kasnoj apoptozi ukupno, povećati.

**Materijali i metode:** Pomoću MTT-a došli smo do potrebne koncentracije inhibitora kojom smo tretirali stanice raka dojke staničnih linija MCF7 i MDA-MB-231 tijekom 48 sati. Nakon dodatka Annexina V i propidij jodida stanice su analizirane protočnim citometrom kojim smo dobili postotak stanica u ranoj i kasnoj apoptozi kod tretiranih i netretiranih stanica raka.

**Rezultati:** Prikazani su kao postotak rane i kasne apoptoze i preživjelih stanica. Djelovanje inhibitora na stanice stanične linije MCF7 pokazalo je smanjenje broja stanica u ranoj apoptozi u odnosu na kontrolu koje nadomješta statistički značajan porast stanica u kasnoj te ukupno ranoj i kasnoj apoptozi u odnosu na netretirane stanice. U ovom istraživanju inhibitor je pokazao blagi, ali statistički značajan porast postotka stanica MDA-MB-231, stanične linije trostruko negativnog raka dojke u ranoj apoptozi. Također inhibitor je pokazao značajni porast stanica u kasnoj te ukupno ranoj i kasnoj apoptozi proučavane stanične linije.

**Zaključci:** Novosintetizirani tieno[2,3-*b*]piridin doveo je do značajnog porasta postotka stanica karcinoma dojke koje ulaze u apoptozu. Djelovanje koje je pokazao taj inhibitor moglo bi biti značajno u liječenju trostruko negativnog raka dojke.

## 9. SUMMARY

**Diploma thesis title:** Induction of programmed cell death by thienopyridine derivative

**Objectives:** The aim of this study was to demonstrate the effect of a synthetically derived inhibitor from the thieno[2,3-*b*]pyridine group on cell apoptosis of MCF7 breast cancer cell line and MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell line. It is hypothesized that after the treatment of tumor cell lines with an inhibitor, the percentage of cells in early, late, and early and late apoptosis will increase.

**Materials and methods:** Using MTT, we obtained required concentration of inhibitor with whom we treated breast cancer cells of the MCF7 and MDA-MB-231 cell lines for 48 hours. After the addition of Annexin V and propidium iodide, the cells were analyzed by flow cytometer to obtain the percentage of cells in early and late apoptosis in treated and untreated cancer cells.

**Results:** They are presented as the percentage of early and late apoptosis and surviving cells. The effect of inhibitor on MCF7 cell line showed a decrease in the number of cells in early apoptosis compared to the control, which is compensated by the statistically significant increase in percentage of the cells in late and total early and late apoptosis compared to untreated cells. In this study, the inhibitor showed a mild, but statistically significant increase in the percentage of MDA-MB-231 cells, a triple-negative breast cancer cell line, in early apoptosis. The inhibitor also showed a significant increase in cells in late and total early and late apoptosis in observed cell lines.

**Conclusions:** Newly synthesized thieno[2,3-*b*]pyridine led to a significant increase in the percentage of breast cancer cells which enter into apoptosis. The action shown by this inhibitor could be significant in the treatment of triple-negative breast cancer.

## **10. ŽIVOTOPIS**



**Osnovni podaci:**

**Ime i prezime:** Michaela Bravar

**Datum rođenja:** 19.04.1997.

**Mjesto rođenja:** Pula 52100 , Republika Hrvatska

**Državljanstvo:** hrvatsko

**e-adresa:** michaela.bravar88@gmail.com

**Obrazovanje:**

2016. - 2021. Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija

2012. - 2016. Opća gimnazija, Pula

2004. – 2012. Osnovna Škola Centar, Pula

**Radno iskustvo:**

**ožujak 2020. – svibanj 2020./travanj 2021. – srpanj 2021.** Ispomoć u proizvodnji u Galenskom laboratoriju Ljekarni Splitsko-dalmatinske županije

**veljača 2021. – rujan 2021.** Stručno osposobljavanje u Ljekarni Splitsko-dalmatinske županije, Ljekarna „Sućidar“, te u Galenskom i Analitičkom laboratoriju Ljekarni Splitsko-dalmatinske županije.

**Znanja i vještine:**

- Engleski jezik
- Talijanski jezik
- Rad u programima Microsoft Office i Esculap 2000

**Ostale aktivnosti:**

Članica Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske, CPSA

- volonter na Humanitarnoj božićnoj fritulijadi 2016.-2019.
- sudionik na Kongresu CPSA-e svibanj 2019., pod temom Koža – ogledalo zdravlja
- sudionik na Professional days CPSA-e studeni 2020.

Sudionik međunarodnog skupa "Praktična znanja za studente" 2018. i 2019. godine