

Citotoksično djelovanje tienopiridinskih derivata na stanice humanog karcinoma jajnika

Braica, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:171:159736>

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

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



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Andrea Braica

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE TIENOPIRIDINSKIH DERIVATA NA STANICE
HUMANOG KARCINOMA JAJNIKA**

Diplomski rad

Akadska godina:

2021./2022.

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, listopad 2022.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Andrea Braica

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE TIENOPIRIDINSKIH DERIVATA NA STANICE
HUMANOG KARCINOMA JAJNIKA**

Diplomski rad

Akadska godina:

2021./2022.

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, listopad 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Medicinski fakultet

Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA

Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti

Znanstveno polje: Farmacija

Nastavni predmet: Medicinska kemija i biologija

Tema rada je odobrena na 74. sjednici Vijeća studija Farmacije, 21. sjednici Vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 14. sjednici Vijeća medicinskog fakulteta

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Pomoć pri izradi: dr. sc. Sandra Marijan, mag. for. chem. mol. biol.

Citotoksično djelovanje tienopiridinskih derivata na stanice humanog karcinoma jajnika

Andrea Braica, broj indeksa 185

Cilj istraživanja: Cilj ovog istraživanja utvrditi je potencijalno citotoksično djelovanje derivata tieno[2,3-b]piridina na staničnoj liniji humanog karcinoma jajnika.

Materijali i metode: Citotoksičnost spojeva tieno[2,3-b]piridina, odnosno inhibitora 5, 6, 8 i 9 ispitivana je na SKOV-3 staničnoj liniji korištenjem MTT metode na temelju koje se određuje postotak metabolički aktivnih stanica. Učinak tieno[2,3-b]piridina ispitivan je u sedam različitih koncentracija nakon 4, 24, 48 i 72 sata inkubacije. Djelotvornost ispitivanih spojeva određena je spektrofotometrijski pri valjnoj duljini od 570 nm.

Rezultati: Rezultati su prikazani grafički u odnosu vremena inkubacije i postotka metabolički aktivnih stanica. Svi ispitivani spojevi pokazali su citotoksičnu aktivnost ovisnu o koncentraciji i vremenu inkubacije. Citotoksična aktivnost nije u svim slučajevima proporcionalna porastu koncentracije inhibitora i vremena inkubacije. Inhibitor 6 pokazao je najmanju citotoksičnost. Inhibitor 8 pokazao je najveću citotoksičnost i to pri koncentraciji od 5 $\mu\text{mol/L}$ nakon inkubacije od 72h gdje se postotak metabolički aktivnih stanica smanjio na oko 40 %. Također, vrijednosti IC₅₀ izmjerene kod inhibitora 8 iznosile su 8,276 $\mu\text{mol/L}$ nakon inkubacije od 24h, 5,68 $\mu\text{mol/L}$ nakon 48h, a 4,093 $\mu\text{mol/L}$ nakon 72h.

Zaključak: *In vitro* izlaganje stanica karcinoma jajnika derivatima tieno[2,3-b]piridina dovodi do smanjenja broja živih stanica. Citotoksični učinak ispitivanih spojeva ovisi o koncentraciji i vremenu inkubacije. U nekim slučajevima citotoksični učinak nije proporcionalan povećanju koncentracije i vremena inkubacije jer dolazi do blagog porasta metabolički aktivnih stanica zbog oporavka stanica. Najslabiji citotoksični učinak pokazao je inhibitor 6, a najjači inhibitor 8. Dobivenim rezultatima potvrđena je hipoteza ovog istraživanja. Potrebna su dodatna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja na životinjama kako bi se utvrdio mehanizam njihovog citotoksičnog učinka i potencijal za razvoj novih lijekova za liječenje karcinoma jajnika.

Ključne riječi: karcinom jajnika, tienopiridinski derivat, citotoksičnost

Rad sadrži: 45 stranica, 19 slika, 1 tablicu, 28 referenca

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu: 1. doc. dr. sc. Diana Gujinović, predsjednik
2. doc. dr. sc. Jasminka Omerović, član
3. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

Datum obrane: 7.10.2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici 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: Medical Chemistry and Biochemistry

Thesis subject: was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 74 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 14

Mentor: Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD

Technical assistance: Sandra Marijan, PhD

Cytotoxic effect of thienopyridine derivatives on human ovarian cancer cells

Andrea Braica, index number 185

The aim of the research: The aim of the research is to examine the potential cytotoxic effects of thieno[2,3-b]pyridine derivatives on human ovarian cancer cells.

Materials and methods: The cytotoxicity of thieno[2,3-b]pyridine compounds, i.e. inhibitors 5, 6, 8 and 9, was tested on the SKOV-3 cell line using the MTT method, based on which the percentage of metabolically active cells is determined. The effect of thieno[2,3-b]pyridine was examined in seven different concentrations after 4, 24, 48 and 72 hours of incubation. The effectiveness of the tested compounds was determined spectrophotometrically at a wavelength of 570 nm.

Results: The results are presented graphically in relation to the incubation time and the percentage of metabolically active cells. All tested compounds showed cytotoxic activity dependent on concentration and incubation time. Cytotoxic activity is not in all cases proportional to the increase in inhibitor concentration and incubation time. Inhibitor 6 showed the lowest cytotoxicity. Inhibitor 8 showed the highest cytotoxicity at a concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$ after incubation for 72 hours, where the percentage of metabolically active cells decreased to about 40 %. Also, the IC_{50} values measured for inhibitor 8 were 8.276 $\mu\text{mol/L}$ after 24h incubation, 5.68 $\mu\text{mol/L}$ after 48h, and 4.093 $\mu\text{mol/L}$ after 72h.

Conclusion: *In vitro* exposure of ovarian cancer cells to thieno[2,3-b]pyridine derivatives leads to a decrease in the number of live cells. The cytotoxic effect of the tested compounds depends on the concentration and incubation time. In some cases, the cytotoxic effect is not proportional to the increase in concentration and incubation time because there is a slight increase in metabolically active cells due to cell recovery. The weakest cytotoxic effect was shown by inhibitor 6, and the strongest by inhibitor 8. The obtained results confirmed the hypothesis of this research. Additional *in vitro* and *in vivo* animal studies are needed to determine their cytotoxic effect and the potential development of new drugs for the treatment of ovarian cancer.

Keywords: ovarian cancer, thienopyridine derivatives, cytotoxicity

Thesis contains: 45 pages, 19 figures, 1 table, 28 references

Original in: Croatian

Defence committee: 1. Assist. prof. Diana Gujinović, PhD, chair person
2. Assist. prof. Jasminka Omerović, PhD, member
3. Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, member-supervisor

Defence date: 7.10.2022.

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. KARCINOM	2
1.2. MOLEKULARNA PATOLOGIJA TUMORA	3
1.2.1. ONKOGENI	3
1.2.2. TUMOR-SUPRESORSKI GENI	5
1.3. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA U HRVATSKOJ	7
1.4. KARCINOM JAJNIKA	8
1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA	8
1.4.2. PATOHISTOLOGIJA	9
1.4.3. KLINIČKA SLIKA	10
1.4.4. DIJAGNOSTIKA I LIJEČENJE	10
1.5. TIENOPIRIDINSKI DERIVATI	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	14
2.1. HIPOTEZA	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. STANIČNA LINIJA	18
3.2. POSTUPAK	20
3.2.1. PRIPREMA STANICA	20
3.2.2. ODREĐIVANJE BROJA STANICA	20
3.2.3. TRETIRANJE STANICA TIENOPIRIDINSKIM DERIVATIMA	21
3.2.4. MTT METODA	24
3.2.5. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA	25
4. REZULTATI	26
4.1. INHIBITOR 5	27
4.2. INHIBITOR 6	28
4.3. INHIBITOR 8	29
4.4. INHIBITOR 9	30
5. RASPRAVA	31
6. ZAKLJUČAK	34
7. LITERATURA	36
8. SAŽETAK	40
9. SUMMARY	42
10. ŽIVOTOPIS	44

Zahvala

Zahvaljujem profesorici i mentorici Vedrani Čikeš Čulić na pomoći, strpljenju i uloženom trudu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Najveća hvala mojoj obitelji koja mi je pomogla ostvariti moje snove. Hvala na podršci, strpljenju i neizmjernoj ljubavi.

Hvala mojim prijateljima i kolegama što su bili uz mene u svakom trenutku i što su ovaj period života učinili lakšim i zabavnijim.

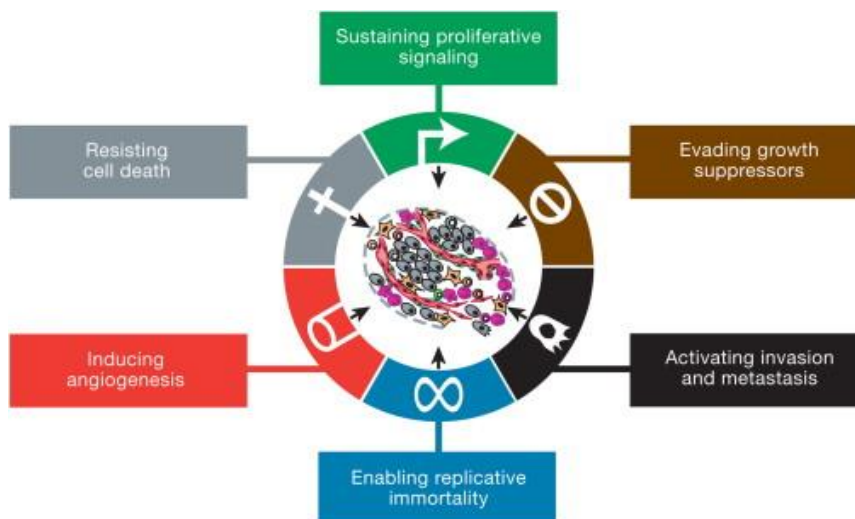
1. UVOD

1.1. KARCINOM

Novotvorine, neoplazme ili tumori izrazi su za patološke tvorbe koje nastaju kao posljedica prekomjerne proliferacije abnormalnih stanica. Rast novotvorina je nesvrhovit, autonoman, parazitarni, nepravilan i neorganiziran (1). U patologiji raka važno je razlikovati benigne (dobročudne) od malignih (zloćudnih) tumora (2). Benigni (dobročudni) tumori rastu polagano i ostaju ograničeni na organ u kojem su nastali te se ne šire po tijelu. Nakon kompletnog uklanjanja, ovakvi tumori ne recidiviraju pa u većini slučajeva imaju dobru prognozu. Maligni (zloćudni) tumori rastu mnogo brže od benignih tumora, razaraju normalno tkivo organa u kojem su nastali te se šire u okolna tkiva. Mogu se krvlju ili limfom proširiti u druge dijelove tijela odnosno metastazirati (grč. *metastasis* - promjena mjesta). Maligni tumori ne mogu se u potpunosti kirurški ukloniti pa recidiviraju nakon operacije (1).

Tumori su uzrokovani interakcijom između faktora okoliša (karcinogeni) i individualne (često genetske) predispozicije (3). Nastanak raka je proces koji se sastoji od više koraka i uključuje mutacije i selekciju stanica sa sve većim mogućnostima proliferacije, preživljavanja, širenja i metastaziranja (4). Douglas Hanahan i Robert A. Weinberg karakteristike raka podijelili su u šest glavnih grupa:

1. Stalni poticaj na staničnu proliferaciju
2. Izbjegavanje usporavanja proliferacije
3. Izbjegavanje apoptoze
4. Gubitak ograničenja proliferacije
5. Razvoj novog krvotoka
6. Invazija, metastaziranje i kolonizacija udaljenih organa (Slika 1) (5)



Slika1. Ključne značajke raka

Preuzeto s: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411001279#fig1>

Datum pristupa: 7.9.2022.

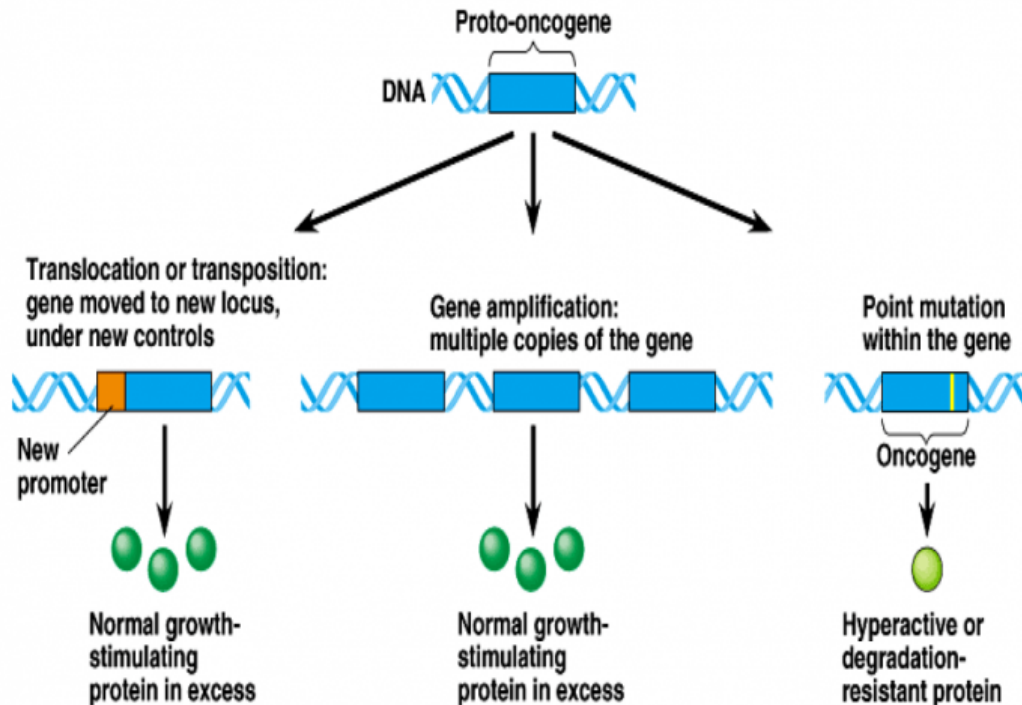
1.2. MOLEKULARNA PATOLOGIJA TUMORA

Maligna promjena stanica povezana je s genskim promjenama. Najvažnije genske promjene mogu se svrstati u četiri skupine: onkogeni, tumor-supresorski geni, geni koji sudjeluju u apoptozi i geni koji sudjeluju u popravku DNA (6).

1.2.1.ONKOGENI

Karcinom nastaje zbog promjena u najvažnijim regulacijskim genima koji su odgovorni za staničnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje (7). Onkogeni su mutacije normalnih staničnih gena koje nazivamo protoonkogeni. Protoonkogeni sudjeluju u regulaciji normalnog staničnog rasta i diobe (8, 6). Signali koje stanica prima iz okoliša često su u obliku molekula čimbenika rasta koji se vežu na receptore stanične membrane. Njihovo vezanje dovodi do aktivacije drugih molekula i prijenosa signala sve do transkripcijskih čimbenika koji dovode do ekspresije određenih gena. Jedan od najčešćih načina prijenosa signala je fosforilacija proteina i za brojne protoonkogene pokazano je da su geni tirozin-kinaze. Promjena protoonkogeni u onkogen naziva se aktivacijom onkogeni. Aktivacijom onkogeni dolazi do nekontroliranog rasta i diobe stanice, što uzrokuje rak (8).

Onkogeni mogu nastati na više načina: točkastom mutacijom, genskom amplifikacijom (povećanjem broja kopija gena) te translokacijom (Slika 2) (8,9).



Slika 2. Mehanizmi pretvorbe protoonkogeni u onkogeni

Preuzeto s: <https://biologyease.com/oncogenesproto-oncogenes-and-retroviral-oncogenes/>

Datum pristupa: 14.9.2022.

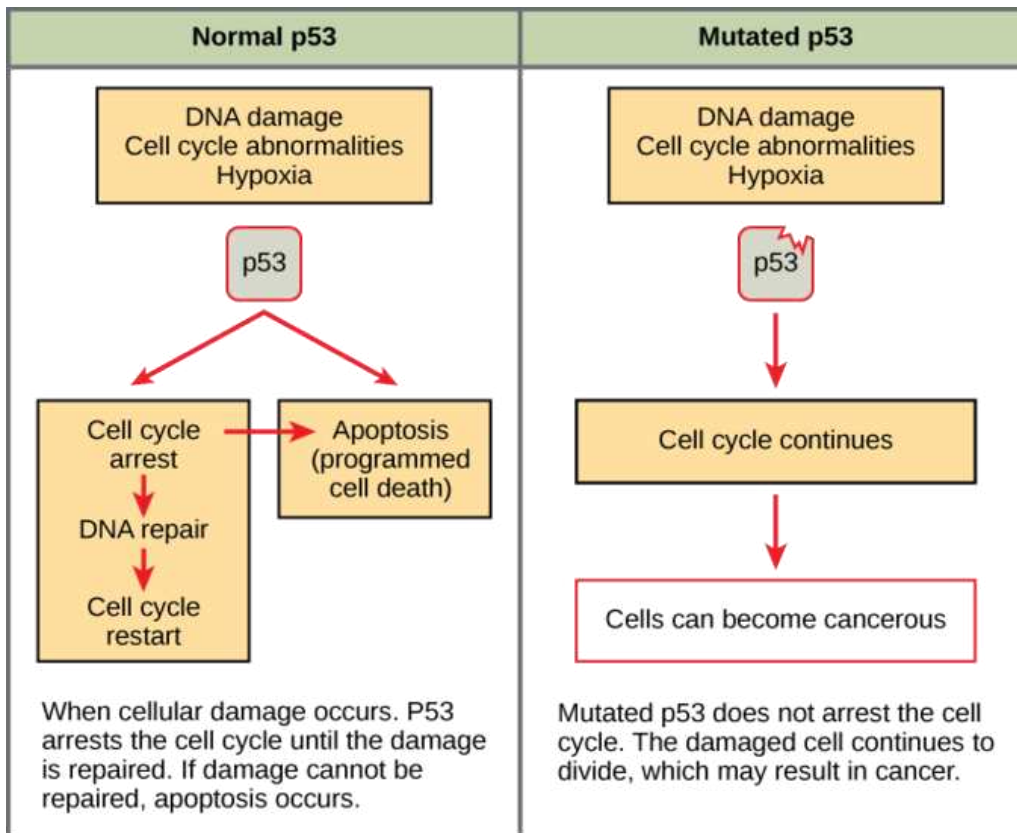
Proteini koji nastaju od onkogeni nazivaju se onkoproteinima (8). Nastali proteini mogu biti: čimbenici rasta, receptori za čimbenike rasta, signalne molekule, molekule koje vežu DNA i regulatori mitotičkog ciklusa (6). Svi mehanizmi pretvorbe protoonkogeni u onkogeni posljedično dovode do pojačane, neregulirane aktivnosti nastalog onkoproteina (8).

1.2.2. TUMOR-SUPRESORSKI GENI

Tumor-supresorski geni su geni koji zaustavljaju rast tumorskih stanica (10). Gubitkom ili inaktivacijom tih gena ili njihovih proteina može doći do nastanka raka i to procesom metilacije ili mutacije. Tumor-supresorski geni mogu imati različite funkcije u stanici (11). Dva najvažnija tumor-supresorska gena su *RB-1* i *TP53*. *RB-1* prvi je otkriveni tumor-supresorski gen, a povezan je s retinoblastomom, rijetkim tumorom dječje dobi. Može biti nasljedan (40 %) ili sporadičan (60 %), a u oba slučaja dolazi do gubitka tj. inaktivacije obaju alela gena *RB-1* (10, 11).

Gen *TP53* ima ključnu ulogu u nastanku brojnih tumora. Njegov proteinski produkt je transkripcijski čimbenik p53. On djeluje na dva načina: zaustavlja prelazak stanice iz G1-faze u S-fazu staničnog ciklusa i aktivira popravak oštećenja DNA te potiče apoptozu. Protein TP53, djelujući na stanični ciklus, omogućuje da se oštećena DNA popravi prije nego dođe do replikacije, a ako se ne može popraviti, stanica ulazi u apoptozu i umire. Ako gen *TP53* nedostaje ili je inaktivan, kontrola u staničnom ciklusu izostaje pa sve stanice, uključujući i stanice s oštećenom DNA, ulaze u S-fazu i podijele se čime se povećava vjerojatnost nastanka tumora (Slika 3). Iz primjera gena TP53 može se zaključiti kako nastanak raka može biti povezan s poremećajem apoptoze i poremećajem u kontroli staničnog ciklusa. Oba procesa regulirana su djelovanjem brojnih gena (10, 11).

U stanicama raka veliki broj mutacija posljedica je genomske nestabilnosti koja nastaje zbog poremećaja u različitim mehanizmima popravka oštećenja stanične DNA. Geni koji sudjeluju u popravku oštećene DNA homolognom rekombinacijom su BRCA1 i BRCA2. Ovi geni povezani su s nasljednim rakom dojke i jajnika. U stanicama raka geni BRCA1 i BRCA2 su mutirani pa se stanice oslanjaju na druge mehanizme popravka oštećenja DNA. Inhibicijom tih mehanizama npr. PARP-inhibitorima (lijekovi olaparib i rucaparib) stanica umire (11).



Slika 3. Funkcija normalnog i mutiranog gena *TP53*

Preuzeto s:

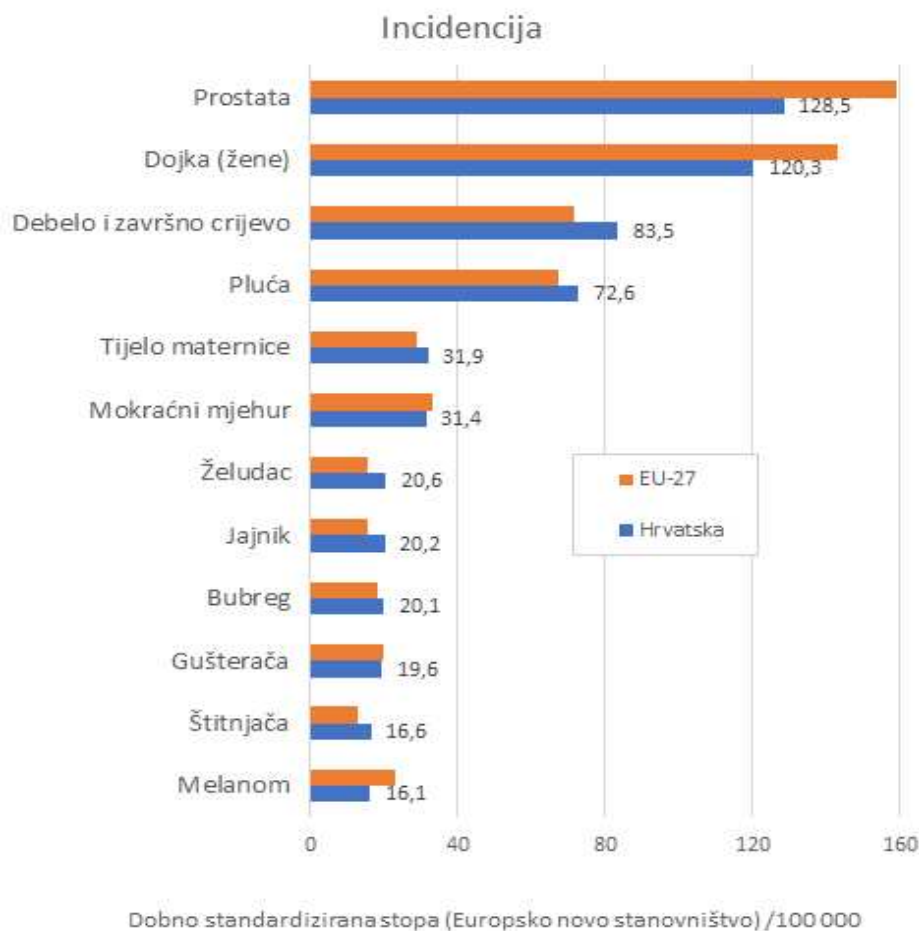
https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_and_General_Biology/Book%3A_General_Biology_%28Boundless%29/10%3A_Cell_Reproduction/10.04%3A_Cancer_and_the_Cell_Cycle/10.4B%3A_Tumor_Suppressor_Genes

Datum pristupa: 15.9.2022.

1.3. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA U HRVATSKOJ

Karcinomi su jedan od vodećih javnozdravstvenih problema suvremenog društva. Na razini Europske Unije najčešće dijagnosticirana zloćudna bolest je rak dojke, potom rak debelog i završnog crijeva, rak prostate te rak pluća. Najčešći uzroci smrti su rak pluća, a slijede ga rak debelog i završnog crijeva, rak dojke te rak gušterače (12).

Uspoređujući s drugim zemljama, Hrvatska je po ukupnoj incidenciji raka na razini prosjeka zemalja Europske unije (15. ukupno) dok je po smrtnosti od raka na 5. mjestu ukupno. Najčešći novodijagnosticirani rak u Hrvatskoj 2020. godine bio je rak debelog i završnog crijeva (3706 slučajeva), zatim rak pluća (3235) i rak dojke (2894) (Slika 4). Najveći uzrok smrti bio je rak pluća (2984), rak debelog i završnog crijeva (2320) i rak dojke (832) (12).



Slika 4. Incidencija raka u Hrvatskoj u 2020. godini

Preuzeto s: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>

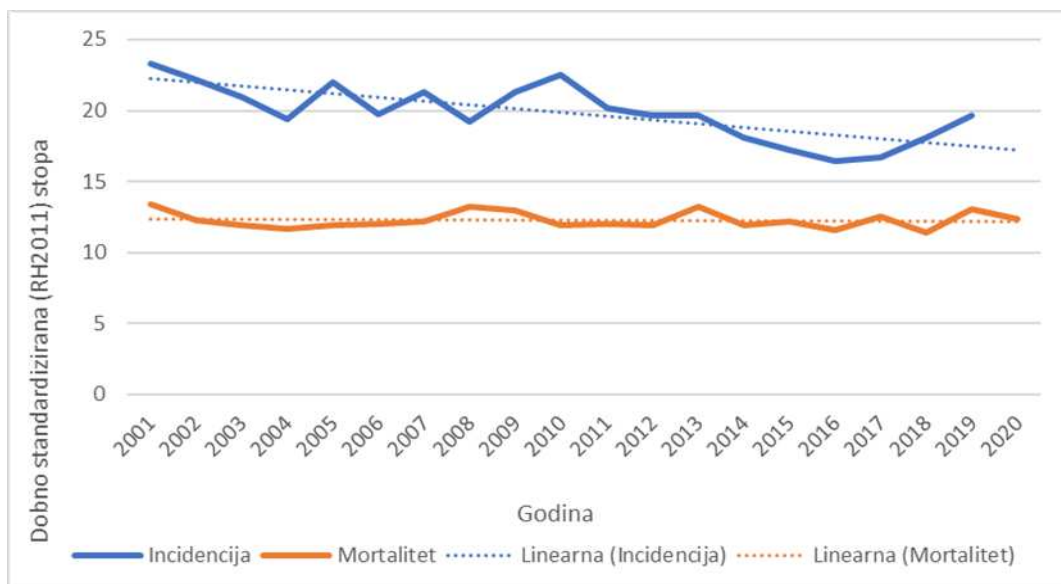
Datum pristupa 9.9.2022.

1.4. KARCINOM JAJNIKA

1.4.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Karcinom jajnika je prema učestalosti treći ginekološki karcinom kod žena u svijetu, nakon karcinoma tijela i vrata maternice. Po smrtnosti nalazi se na drugom mjestu (13). Otprilike polovica žena kojima je dijagnosticiran karcinom jajnika ima 63 godine ili više (14). Uglavnom pogađa žene u perimenopauzi i postmenopauzi. Veću opasnost predstavljaju neradañje, rađanje u kasnijoj životnoj dobi ili kasnija menopauza. Osobna ili obiteljska anamneza s rakom endometrija, dojke ili debelog crijeva također povećava opasnost od obolijevanja (15). U nekim slučajevima nastanak karcinoma povezan je s mutacijom gena BRCA1 i BRCA2 (16). Potisnuta ovulacija je zaštitni čimbenik, a takav zaključak donešen je na temelju hipoteze o etiologiji nastanka ove bolesti. Jedna od hipoteza je neprekidna ovulacija. Nakon svakog ovulacijskog ciklusa dolazi do stalnog popravka epitela čime se povećava vjerojatnost spontane mutacije stanica epitela jajnika i posljedično nastanak zloćudnih promjena (13).

U Hrvatskoj od karcinoma jajnika godišnje obolijeva između 400 i 500 žena, a svake godine umire preko 300 žena. Kao i u drugim europskim zemljama, stopa incidencije karcinoma jajnika je u padu, a to se pripisuje sve većoj upotrebi oralnih kontraceptiva i smanjenoj upotrebi hormonske nadomjesne terapije (13) (Slika 5).



Slika 5. Trend incidencije i mortaliteta od raka jajnika u Hrvatskoj, 2001.-2020.

Preuzeto s: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/svjetski-dan-borbe-protiv-raka-jajnika-2/>

Datum pristupa: 9.9.2022.

1.4.2. PATOHISTOLOGIJA

Tumori jajnika se, prema strukturama iz kojih nastaju, mogu podijeliti u tri glavne skupine: tumori pokrovnog epitela jajnika, tumore specijalizirane strome jajnika i tumore spolnih stanica. U jajnicima se također mogu naći metastaze tumora drugih organa (17) (Slika 6). Različiti tipovi tumora mogu se razlikovati po faktorima rizika, stanicama odakle potječu, molekularnom sastavu, kliničkim značajkama i liječenju (18). Tumor epitelnih stanica jajnika je najčešći (oko 90 %), a on uključuje serozni, mucinozni, endometrioidni, svijetlostanični te tumor prijelaznog epitela (17, 18). Serozni karcinom je najčešći maligni tumor jajnika, a češći je kod žena koje nisu rađale (19).

Table 1. Epidemiology of Ovarian Cancer Types¹			
Cell type	Frequency of ovarian cancer	Cancer histology	Mean age or age range of diagnosis
Epithelial	65%-70%	Serous adenocarcinoma	56 years
		Mucinous adenocarcinoma	52 years
		Endometrioid adenocarcinoma	50 years
		Clear cell carcinoma	49-55 years
		Carcinosarcoma (mixed)	66 years
Germ cell	15%-20%	Dysgerminoma	10-30 years
		Yolk sac tumor (endodermal sinus)	
		Immature teratoma	
		Choriocarcinoma	
Sex cord stroma	5%-10%	Granulosa cell–adult	Perimenopause
		Granulosa cell–juvenile	< 30 years
		Sertoli-Leydig cell	25 years
Other (metastasis)	< 5%	Krukenberg tumor Brenner tumor Metastasis	Variable

Slika 6. Klasifikacija tumora jajnika

Preuzeto s: <https://www.contemporaryobgyn.net/view/clues-to-the-origins-of-ovarian-cancer>

Datum pristupa: 16.9.2022.

Tumori jajnika mogu se podijeliti i prema stupnju diferencijacije, odnosno stadiju tumora. Najčešće korišteni sustavi ocjenjivanja bili su oni koje je predložila Međunarodna federacija ginekologije i opstetricije (engl. *International Federation of Gynaecology and Obstetrics* - FIGO), Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization* - WHO) i Ginekološka onkološka grupa (engl. *Gynecologic Oncology Group* - GOG) (20).

Prema FIGO klasifikaciji razlikujemo četiri klinička stadija:

- a) Stadij I – tumor ograničen na jedan ili oba jajnika
- b) Stadij II – tumor jajnika se proširio i na organe zdjelice
- c) Stadij III – tumor jednog ili oba jajnika koji se proširio na peritoneum izvan zdjelice i/ili u retroperitonealne limfne čvorove
- d) Stadij IV – tumor koji ima udaljene metastaze (17).

1.4.3. KLINIČKA SLIKA

Simptomi raka su nespecifični i pojavljuju se kasno pa se rak jajnika u oko 70 % pacijentica otkriva u III i IV stadiju FIGO klasifikacije. Uglavnom se radi o nespecifičnim simptomima vezanim za gastrointestinalni i urinarni trakt kao što su nelagodnost u trbuhu, napuhnutost, bol, čest poriv za mokrenjem. Kasnije se javljaju opća slabost, kaheksija, anemija, bol u zdjelici (15, 21).

1.4.4. DIJAGNOSTIKA I LIJEČENJE

Tumor jajnika dijagnosticira se uzimanjem onkološke anamneze i kliničkim pregledom. Prvi koraci u dijagnosticiranju tumora jajnika su ginekološki pregled, bimanualna palpacija i ultrazvučni pregled. Određuju se i tumorski biljezi Ca125, inhibin B, LDH, α -fetoprotein, β -HCG, androgen i kortizol. Potrebno je i pomoću MSCT-a odrediti proširenost bolesti. Točna dijagnoza i stadij bolesti određuje se isključivo patohistološkim pregledom materijala (dio ili čitav jajnik) (21).

Tumor jajnika liječi se kirurškim zahvatom, kemoterapijom, imunoterapijom, PARP inhibitorima te hormonskom terapijom. S obzirom na opće stanje pacijentice, ako bolest nije jako uznapredovala (I, II i početni III stadij FIGO klasifikacije), liječenje se može započeti kirurškim zahvatom nakon kojeg slijedi onkološko liječenje. Radikalnim kirurškim zahvatom

cilj je ukloniti sve vidljive tumorske tvorbe u zdjelici i abdomenu kako bi se postiglo bolje ukupno preživljenje.

Ako je u pitanju uznapredovali stadij bolesti (III stupanj), prvo se kreće s neoadjuvantnom kemoterapijom kako bi se smanjila tumorska masa prije kirurškog zahvata (21).

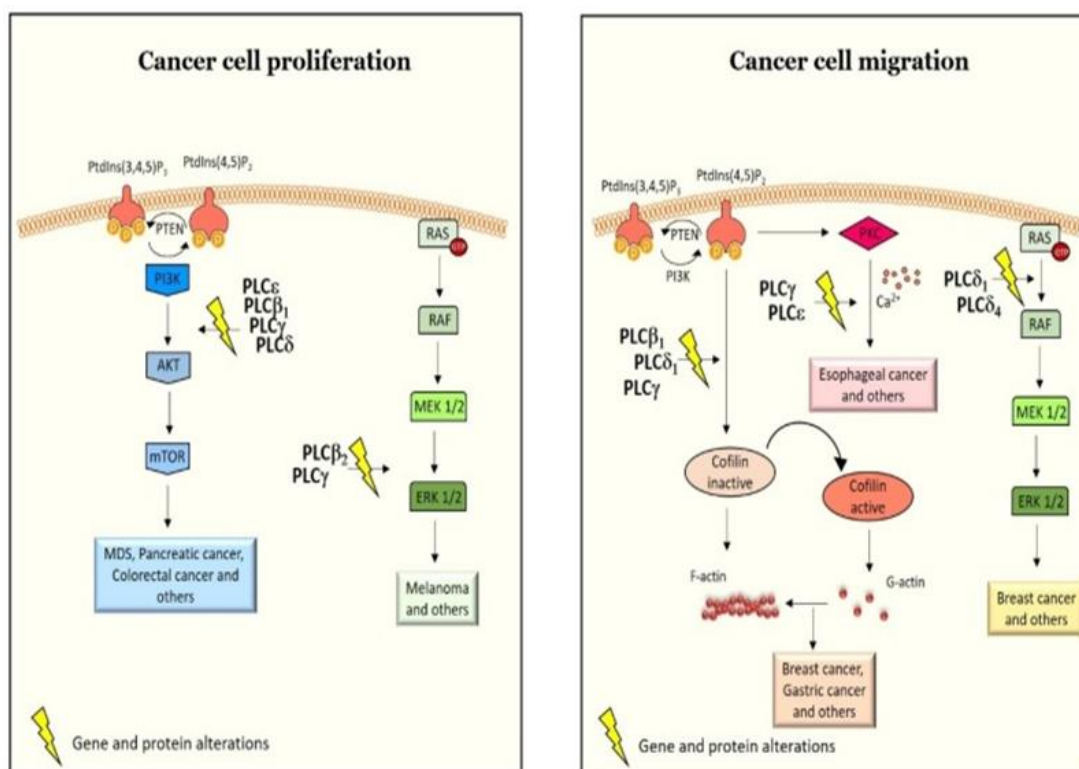
Nakon kirurškog zahvata započinje se kemoterapija ili kemoimunoterapija. Rak jajnika je tumor koji ima 80 %-tnu razinu odgovora na terapiju sa spojevima platine pa zlatni standard liječenja raka jajnika predstavljaju upravo spojevi platine (cisplatin, karboplatin) i taksana (paklitaksel). Ova kombinacija predstavlja prvolinijsku terapiju koja se daje u trodnevnim ili tjednim intervalima u šest do osam ciklusa. Uz ovu terapiju ili kasnije, u terapiji održavanja, može se davati bevacizumab jer takva kombinacija dovodi do produljenja vremena do povrata bolesti (21). Bevacizumab je rekombinantno humanizirano monoklonsko protutijelo koje se veže na VEGF (krvožilni endotelni faktor rasta) i sprječava njegovo vezanje za receptor. VEGF potiče angiogenezu, a prekomjerno je izražen u epitelnim karcinomima jajnika (22). Ako se bolest vrati u intervalu kraćem od šest mjeseci od posljednjeg ciklusa prvolinijske terapije, govori se o platina-rezistentnom recidivu, a ako se bolest vrati nakon šest mjeseci od posljednjeg ciklusa, govori se o platina-osjetljivom recidivu. Ako pacijentica s platina-osjetljivim recidivom ima mutaciju BRCA1 ili BRCA2 gena potrebno je liječenje PARP-inhibitorom (21). PARP enzim je ključan u popravku oštećene DNA. Korištenjem PARP-inhibitora (olaparib, rucaparib, niraparib) u BRCA mutiranim tumorskim stanicama istovremeno se ciljaju dva puta popravka DNA i to rezultira dubokom citotoksičnošću za tumorske stanice (23). Za neoperabilne ili metastatske oblike raka jajnika koristi se imunoterapija koristeći lijekove pembrolizumab i dostarlimab. Hormonska terapija (tamoksifen, letrozol, anastrozol, eksemestan) može se koristiti u liječenju seroznih tumora ako se ponovno pojave (24).

Pacijentice liječene od raka jajnika moraju redovito raditi kontrole kod ginekologa i kliničkog onkologa. Ako se sumnja na povrat bolesti, potrebno je napraviti i radiološke i laboratorijske pretrage. U prvoj godini praćenja, kontrole je potrebno raditi svaka tri mjeseca, u drugoj godini svaka četiri, a nakon toga dvaput godišnje (21).

1.5. TIENOPIRIDINSKI DERIVATI

Fosfolipaza C- γ (PLC) je potencijalna ciljna molekula za terapiju karcinoma jer regulira pokretljivost i proliferaciju stanica (25). Aktivirani PLC izoenzimi međusobno su povezani s nekoliko putova kao što je put PI3K/Akt/mTOR, RAS/RAF/MAPK/ERK put i JAK/STAT put koji su glavni regulatori rasta i proliferacije u stanicama raka (Slika 7) (26).

Djelotvornost tieno[2,3-*b*]piridina otkrivena je na osnovu računalnog modeliranja metodom vHTS (engl. *virtual high throughput screen*). 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 tog spoja. Primjena tieno[2,3-*b*] piridina uzrokovalo je ograničenje rasta stanica raka, promjene u izgledu plazma membrane, povećanje populacije stanica u G2/M fazi staničnog ciklusa i smanjenje pokretljivosti. Ovi učinci više su u skladu s inhibicijom izoformi PLC- δ 1 i PLC- δ 2, što ih čini najvjerojatnijim ciljem za ovu klasu spojeva, međutim, vrlo je moguće da su pogođeni i drugi biomolekularni ciljevi (27).



Slika 7. Djelovanje fosfolipaze C

Preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7177890/>

Datum pristupa: 11.9.2022.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja utvrditi je potencijalno citotoksično djelovanje tienopiridinskih derivata na staničnoj liniji humanog karcinoma jajnika mjereno MTT metodom. Citotoksičnost tienopiridinskih derivata ispitivana je na staničnoj liniji SKOV-3.

2.1. HIPOTEZA

Tienopiridinski derivati pokazuju citotoksično djelovanje na staničnu liniju SKOV-3 humanog karcinoma jajnika.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. STANIČNA LINIJA

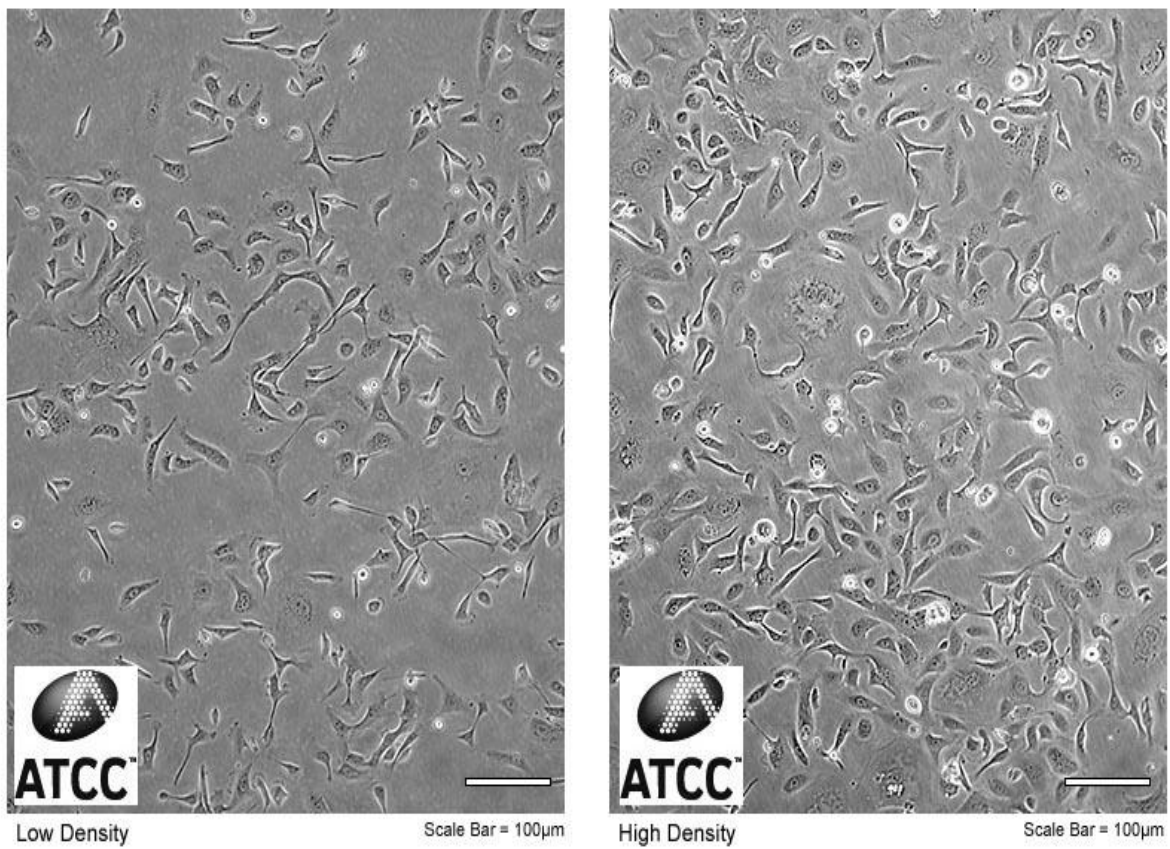
U istraživanju je korištena stanična linija SKOV-3. To su stanice epitelne morfologije izolirane iz jajnika 64-godišnje bjelkinje s rakom jajnika. Karakteristike SKOV-3 linije prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz karakteristika stanične linije SKOV-3

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	Jajnik
Format proizvoda	Smrznuto
Morfologija	Epitelna stanica
Tip rasta	Adherentan
Bolest	Adenokarcinom
Dob	64
Spol	Žena
Etnicitet	Bijela rasa

Preuzeto s: [file:///C:/Users/andre/Downloads/HTB-77%20Product%20Sheet%20-%20SKOV-3%20\[SKOV-3%3B%20SKOV3\].pdf](file:///C:/Users/andre/Downloads/HTB-77%20Product%20Sheet%20-%20SKOV-3%20[SKOV-3%3B%20SKOV3].pdf) Datum pristupa: 12.9.2022.

ATCC Number: **HTB-77™**
Designation: **SK-OV-3 [SKOV-3]**



Slika 8. Stanična linija SKOV-3

Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/htb-77#detailed-product-images>

Datum pristupa: 12.9.2022.

3.2. POSTUPAK

3.2.1. PRIPREMA STANICA

Stanična linija SKOV-3 nakon odmrzavanja uzgojena je u McCoy's 5A mediju u inkubatoru na 37°C uz 5 % CO₂ i 100 %-tnu vlažnost. U medij se dodaje i fetalni goveđi serum (FBS) te otopina antibiotika. Tako pripremljene stanice ostave se u petrijevoj zdjelici preko noći kako bi se stanice uhvatile za podlogu. Stanice koje su se adherirale za podlogu isperu se PBS-om (fosfatni pufer) kako bi se uklonio medij. Nakon toga, stanice se tretiraju tripsinom jer je to enzim koji cijepa peptidne veze omogućujući odvajanje stanica od njihove podloge i presađivanje.

3.2.2. ODREĐIVANJE BROJA STANICA

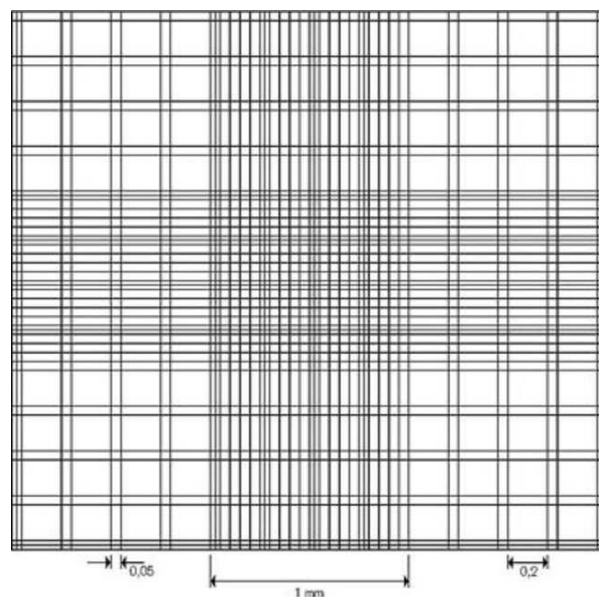
Broj stanica određuje se pomoću Bürker - Türkove komorice (Slika 9). Prethodno pripremljene stanice pomiješaju se s Trypan Blue bojom koja omogućuje razlikovanje živih i mrtvih stanica pod mikroskopom. Mrtve stanice obojene su plavo jer imaju oštećenu membranu, a žive stanice ostaju neobojene jer imaju očuvanu membranu. Broje se samo žive stanice tj. one koje nisu obojene. U komoricu se prenese pripremljena suspenzija stanica i boje i potom se žive stanice broje unutar 5 kvadratića (Slika 10). Ukupan broj stanica odredi se prema formuli: $N \times 10 \times 10^4$ stanica/mL gdje N predstavlja broj živih stanica prebrojen u komorici, 10 predstavlja faktor razrjeđenja, a 10^4 volumen komorice.



Slika 9. Bürker – Türkova komorica

Preuzeto s: <https://in.vwr.com/store/product/2991822/counting-chambers-burker>

Datum pristupa: 12.9.2022.



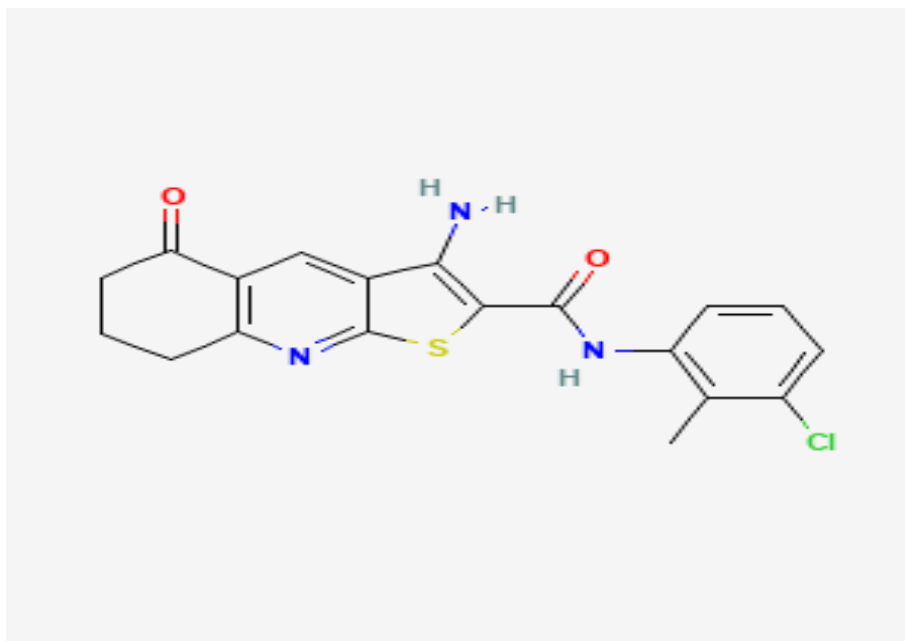
Slika 10. Komorica za brojanje stanica

Preuzeto s: <https://www.fishersci.se/shop/products/buerker-tuerk-counting-chambers-2/10297390>

Datum pristupa: 12.9.2022.

3.2.3. TRETIRANJE STANICA TIENOPRIDINSKIM DERIVATIMA

Nakon postupka brojanja stanica, jednak broj stanica prenese se na četiri ploče s 96 jažica i ostavi preko noći kako bi se stanice vezale za podlogu. Nakon toga, stanice se tretiraju spojevima tieno[2,3-b]piridina (Inhibitori 5, 6, 8 i 9) u koncentraciji od 0,05; 0,2; 0,5, 1; 2,5; 5 i 10 $\mu\text{mol/L}$ (svaki nanesen u triplikatu) i ostave se u inkubatoru na 4, 24, 48 i 72 sata. Prve tri te posljednjih devet jažica ne sadrže inhibitore pa one predstavljaju kontrolu.

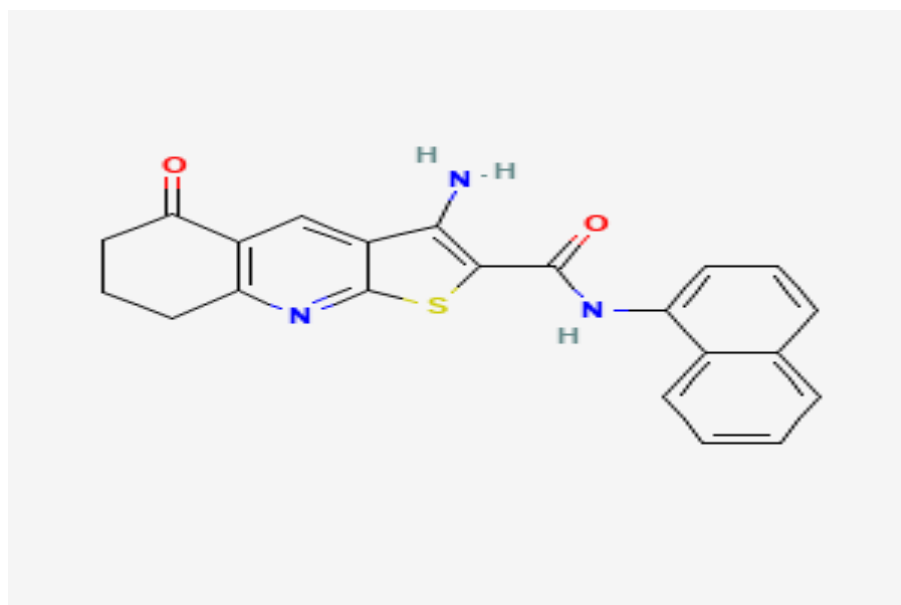


Slika 11. Inhibitor 5

3-amino-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b]kinolin-2-karboksamid

Preuzeto s: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1387536#section=3D-Conformer>

Datum pristupa: 13.9.2022.

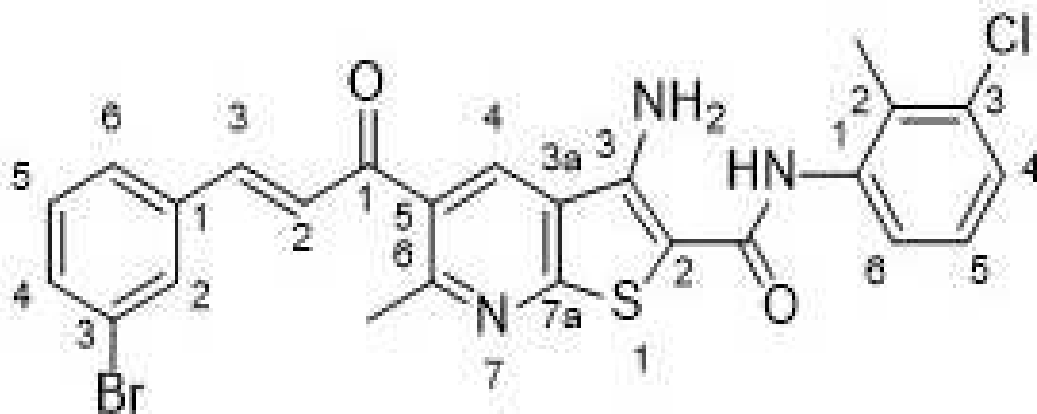


Slika 12. Inhibitor 6

3-amino-*N*-(naftalen-1-il)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b]kinolin-2-karboksamid

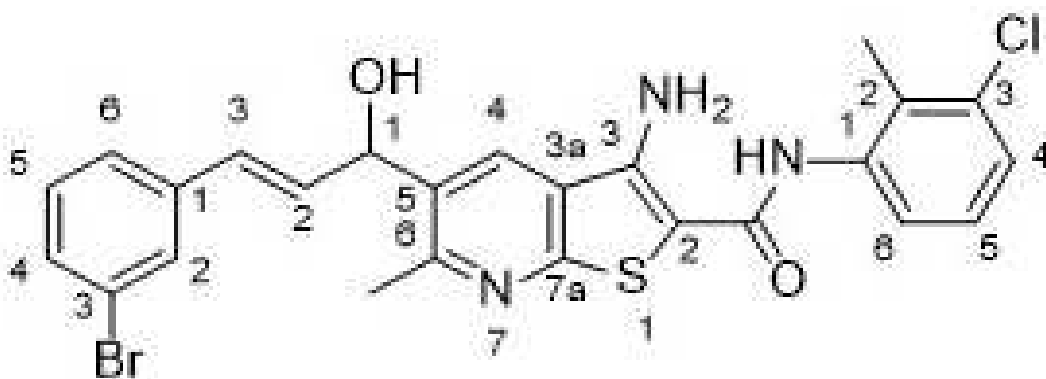
Preuzeto s: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1420003#section=2D-Structure>

Datum pristupa: 13.9.2022.



Slika 13. Inhibitor 8

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



Slika 14. Inhibitor 9

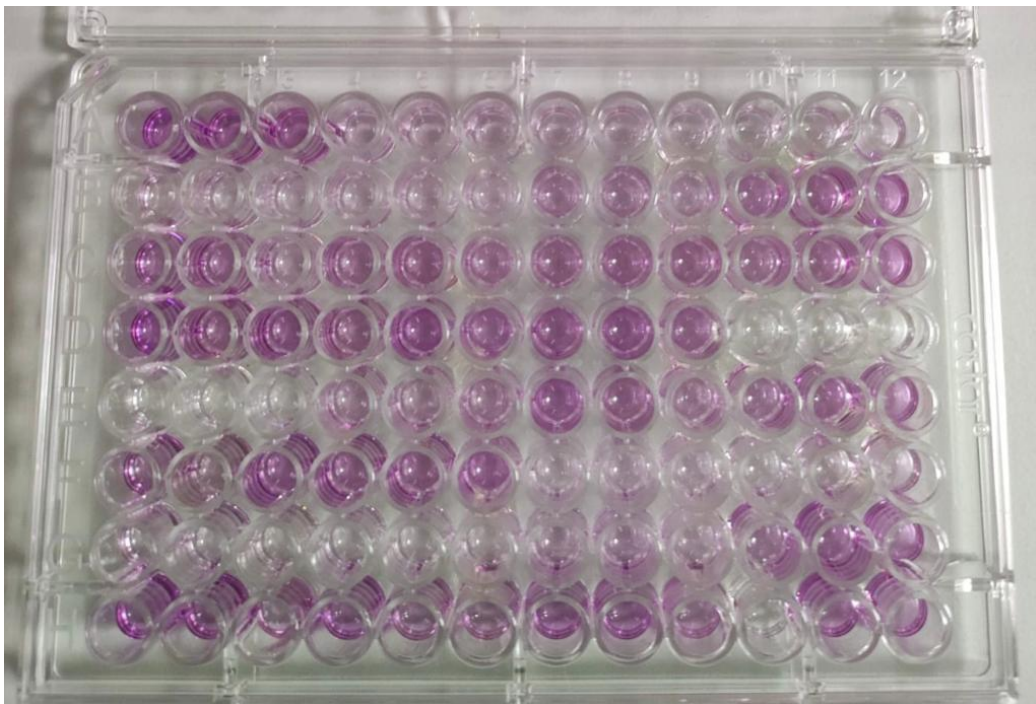
(E)-3-amino-5-(3-(3-bromofenil)-1-hidroksialil)-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-6-metiltieno[2,3-*b*]piridin-2-karboksamid

3.2.4. MTT METODA

MTT je kolorimetrijska metoda kojom se mjeri preživljenje i proliferacija stanica. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) upotrebljava se za mjerenje staničnog metabolizma, a temelji se na redukciji žuto obojenog tetrazolina u ljubičasto obojen spoj formazan. Samo žive, metabolički aktivne stanice stvaraju ljubičasto obojenje, a mrtve stanice gube tu sposobnost.

Nakon tretiranja stanica s inhibitorima 5, 6, 8 i 9, stanicama se doda MTT i inkubiraju se na 37°C 2 sata. Nakon toga, medij se ukloni, doda se DMSO (dimetilsulfoksid), inkubiraju se na 37°C 10 minuta uz treskanje te nastaje ljubičasto obojenje. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 570 nm. Količina nastalog formazana, odnosno intenzitet obojenja, proporcionalan je broju živih stanica.

Citotoksična aktivnost korištenih tienopiridinskih derivata na karcinomskim stanicama jajnika iskazuje se omjerom apsorbancije tretiranih stanica i apsorbancije stanica koje nisu tretirane (kontrola).



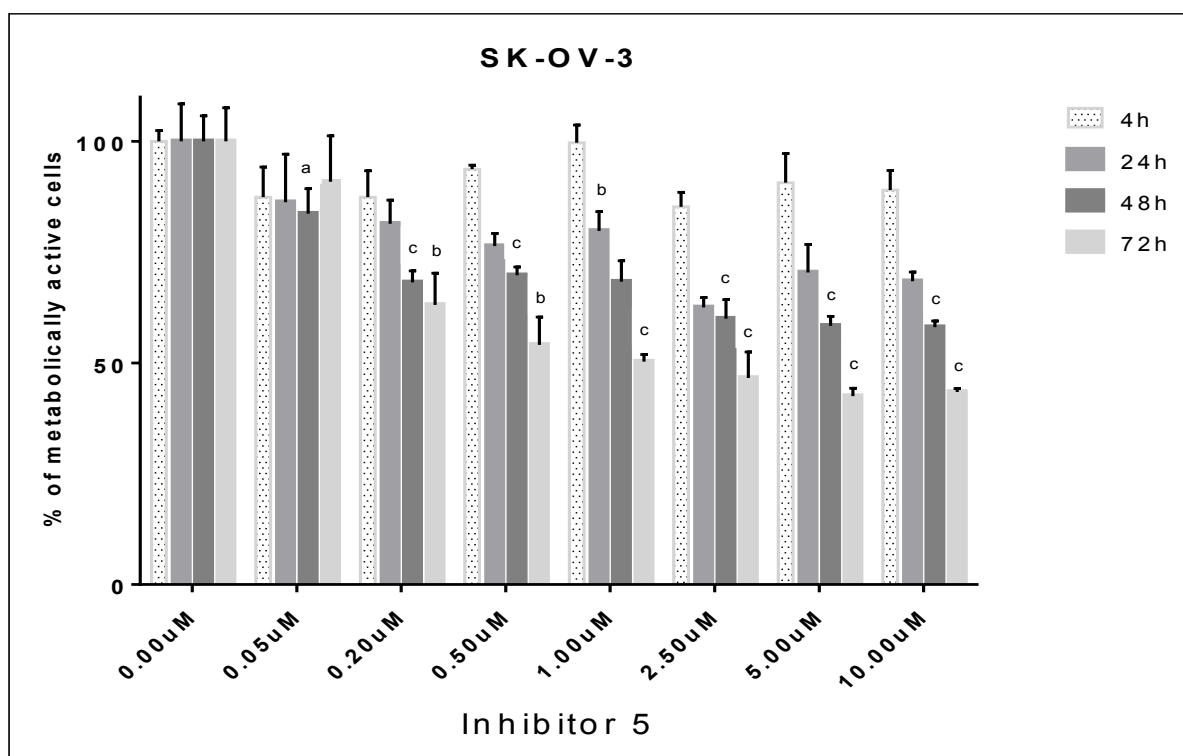
Slika 15. Ljubičasto obojenje nakon dodavanja DMSO

3.2.5. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA

Dobiveni rezultati analizirani su statističkim programom GraphPad Prism 7.0 (San Diego, CA, SAD) sa statističkom značajnošću $P < 0,05$. Rezultati su prikazani grafički.

4. REZULTATI

4.1. INHIBITOR 5

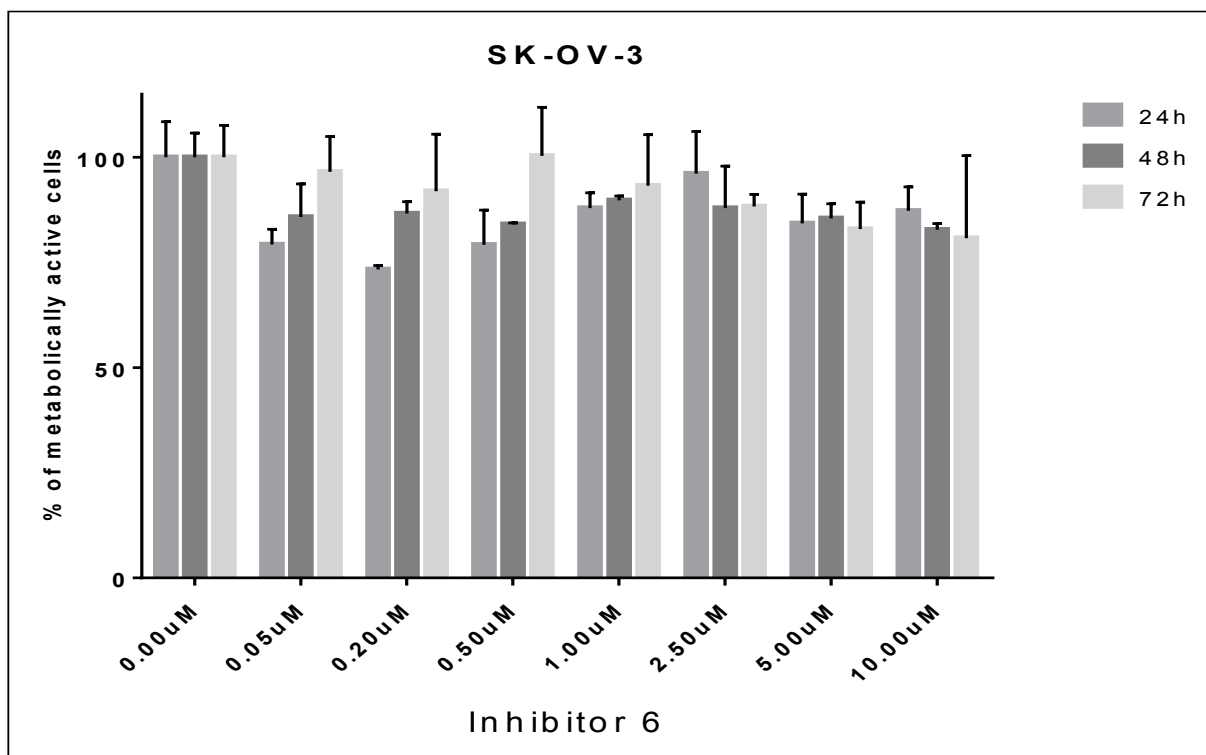


	4h	24h	48h	72h
IC50 (uM)	ND	ND	5,464	1,501

Slika 16. Citotoksičnost inhibitora 5 na SKOV-3 staničnu liniju raka jajnika (IC50-koncentracija derivata koji inhibira rast stanica za 50 %; ND-ne može se odrediti; statistički značajna razlika; a-P<0,05, b-P<0,01, c-P<0,001)

Inhibitor 5 pokazuje značajnu citotoksičnost već nakon 24 sata inkubacije i to u koncentraciji od 0,20 $\mu\text{mol/L}$ gdje se postotak metabolički aktivnih stanica smanji na oko 80 %. Povećanjem koncentracije inhibitora ne povećava se citotoksični učinak u svim uvjetima. IC50 pri 4 i 24 sata inkubacije ne može se odrediti, dok pri 48h iznosi 5,464 $\mu\text{mol/L}$, a pri 72h 1,501 $\mu\text{mol/L}$. Maksimalna citotoksičnost postignuta je nakon 72h inkubacije pri čemu je postotak metabolički aktivnih stanica pao na oko 45 %.

4.2. INHIBITOR 6

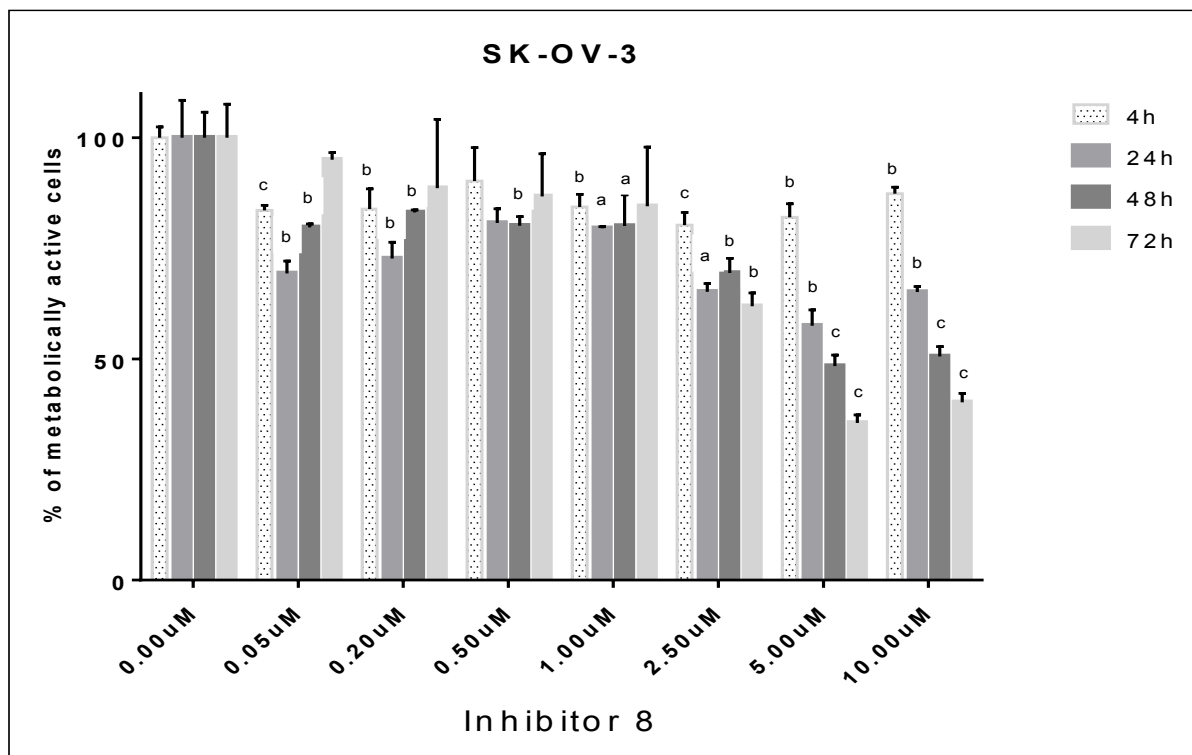


	24h	48h	72h
IC50 (µM)	ND	ND	ND

Slika 17. Citotoksičnost inhibitora 6 na SKOV-3 staničnu liniju raka jajnika (IC50-koncentracija derivata koji inhibira rast stanica za 50 %; ND-ne može se odrediti; statistički značajna razlika; a-P<0,05, b-P<0,01, c-P<0,001)

IC50 ne može se odrediti tj. u niti jednom slučaju nije došlo do smanjenja postotka metabolički aktivnih stanica za 50 % i više. Najveća citotoksičnost zabilježena je pri koncentraciji od 0,20 µmol/L nakon inkubacije od 24 sata, a iznosila je oko 70 %.

4.3. INHIBITOR 8



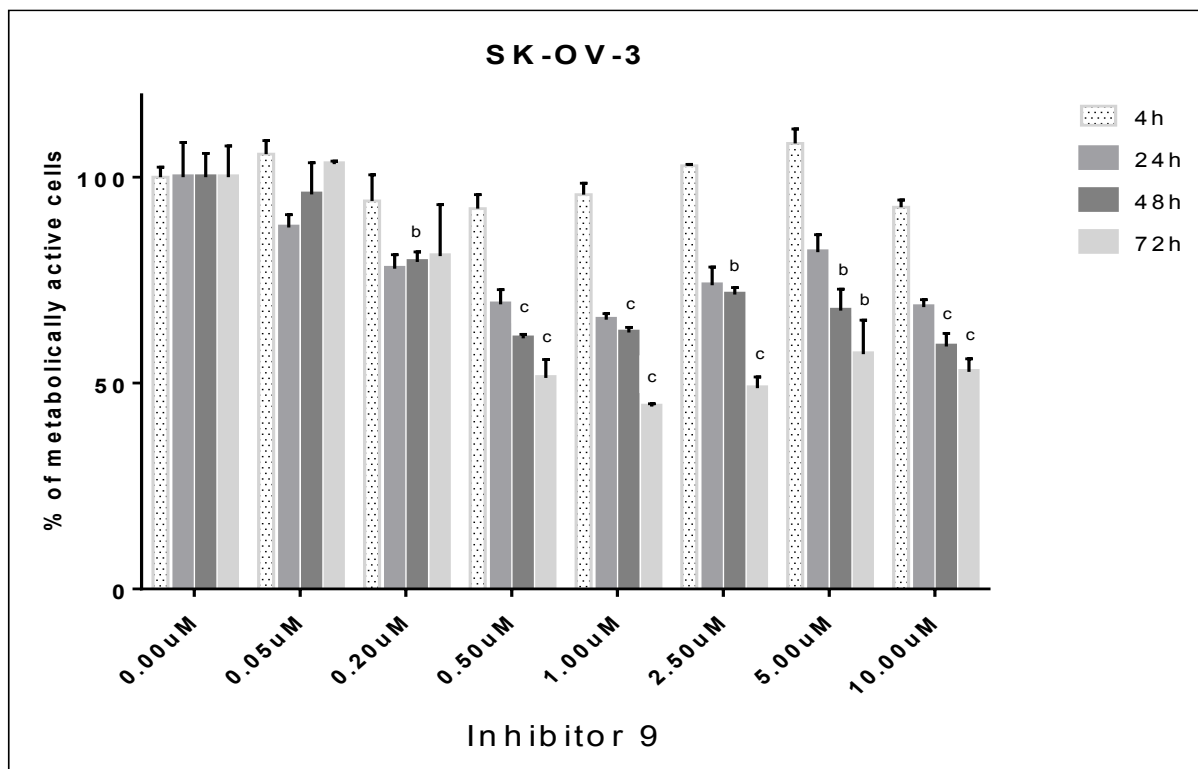
	4h	24h	48h	72h
IC50 (µM)	ND	8,276	5,68	4,093

Slika 18. Citotoksičnost inhibitora 8 na SKOV-3 staničnu liniju raka jajnika

(IC50-koncentracija derivata koji inhibira rast stanica za 50 %; ND-ne može se odrediti; statistički značajna razlika; a-P<0,05, b-P<0,01, c-P<0,001)

Značajna citotoksična aktivnost pokazana je nakon 24 sata inkubacije, pri koncentraciji od 0,05 µmol/L, a iznosila je oko 70 %. IC50 je nakon inkubacije od 24h iznosio 8,276 µmol/L, nakon 48h 5,68 µmol/L, a nakon 72h 4,093 µmol/L. IC50 nakon 4h inkubacije nije se mogao odrediti. Pri koncentraciji od 5 i 10 µmol/L postotak metabolički aktivnih stanica se smanjuje proporcionalno povećanju vremena inkubacije, osim pri inkubaciji od 4h. Najveća citotoksičnost postignuta je pri koncentraciji od 5 µmol/L, nakon inkubacije od 72h, a iznosila oko 40 %.

4.4. INHIBITOR 9



	4h	24h	48h	72h
IC50 (μM)	ND	ND	7,5	2,374

Slika 19. Citotoksičnost inhibitora 9 na SKOV-3 staničnu liniju karcinoma jajnika (IC50-koncentracija derivata koji inhibira rast stanica za 50 %; ND-ne može se odrediti; statistički značajna razlika; a-P<0,05, b-P<0,01, c-P<0,001)

Značajna citotoksična aktivnost pokazana je pri koncentraciji od 0,20 μmol/L, nakon 24h inkubacije, a iznosila je oko 80 %. IC50 ne može se odrediti za inkubaciju od 4h i 24h. Nakon vremena inkubacije od 48h IC50 iznosio je 7,5 μmol/L, a od 72h 2,374 μmol/L. Najveći postotak smanjenja metabolički aktivnih stanica postignut je pri koncentraciji od 1 μmol/L nakon 72 sata inkubacije, a iznosi oko 45 %.

5. RASPRAVA

Rak je naziv za skup različitih bolesti koje se međusobno razlikuju po svojoj etiologiji, biologiji i kliničkoj slici. Rak nastaje od zdravih stanica organizma procesom zloćudne pretvorbe. Stanica gubi sposobnost adekvatnog odgovaranja na brojne signale pa dolazi do nekontrolirane diobe zloćudnih stanica kojom nastaje nakupina takvih stanica koju nazivamo rakom. Možemo reći da je rak u osnovi genska bolest jer su promjene, koje su odgovorne za zloćudnu preobrazbu stanica, uglavnom genske mutacije. Proces nastanka raka je složen, dugotrajan i odigrava se u više koraka (28). U 2020. godini u zemljama EU zabilježeno je 2,7 milijuna novih slučajeva raka, a 1,3 milijuna slučajeva smrti. Hrvatska je po ukupnoj incidenciji raka na razini prosjeka zemalja EU. Najčešće dijagnosticirana zloćudna bolest je rak dojke, a najčešći uzrok smrti je rak pluća (12).

Karcinom jajnika je prema učestalosti treći ginekološki karcinom kod žena u svijetu, a po smrtnosti se nalazi na drugom mjestu (13). Prema strukturama iz kojih nastaje, može se podijeliti na tumore epitela jajnika, tumore specijalizirane strome jajnika i tumore spolnih stanica. Najčešći je tumor epitelnih stanica (17, 18). Prema FIGO klasifikaciji postoje četiri klinička stadija tumora jajnika (17). Tumor jajnika liječi se kirurškim zahvatom, kemoterapijom, imunoterapijom i PARP-inhibitorima (21).

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi potencijalno citotoksično djelovanje tienopiridinskih derivata na staničnim linijama humanog karcinoma jajnika. U prijašnjim istraživanjima dokazana je citotoksičnost tieno[2,3-b]piridina na stanice karcinoma dojke iz stanične linije MDA-MB-321 te na stanice karcinoma prostate iz stanične linije Du-145. Ovi spojevi inhibitori su fosfolipaze C, molekule koja regulira pokretljivost i proliferaciju stanica (27).

U ovom istraživanju ispitivani spojevi tieno[2,3-b]piridina bili su inhibitor 5, 6, 8 i 9, a istraživanje je provedeno na SKOV-3 staničnoj liniji korištenjem MTT metode. Svi korišteni spojevi pokazali su citotoksičnu aktivnost ovisnu o koncentraciji i vremenu inkubacije. Porast koncentracije i vremena inkubacije ne prati nužno i porast citotoksičnosti. Kod inhibitora 6 vrijednost IC₅₀ nije se mogla odrediti te je taj spoj pokazao najmanju citotoksičnost. Kod svih ostalih spojeva vrijednost IC₅₀ mogla se odrediti nakon 48h i 72h. Nakon 4h inkubacije nijedan spoj nije pokazao značajnu citotoksičnost. Najveću citotoksičnu aktivnost pokazao je inhibitor 8 pri koncentraciji od 5 μmol/L, nakon inkubacije od 72h gdje se postotak metabolički aktivnih stanica smanjio na oko 40 %. Također, vrijednosti IC₅₀ izmjerene kod inhibitora 8 iznosile su 8,276 μmol/L nakon inkubacije od 24h, 5,68 μmol/L nakon 48h, a 4,093 μmol/L nakon 72h.

Na temelju *in vitro* dobivenih rezultata dokazano je citotoksično djelovanje tienopiridinskih derivata (inhibitor 5, 6, 8 i 9) na staničnu liniju SKOV-3 karcinoma jajnika. Citotoksična aktivnost (smanjenje postotka metabolički aktivnih stanica) korištenih spojeva ovisi o koncentraciji i vremenu inkubacije. Tienopiridinski derivati pokazali su veliki potencijal za dodatna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja kojima bi se utvrdio mehanizam njihovog citotoksičnog učinka te potencijalno uvrštavanje u razvoj novih lijekova za liječenje karcinoma jajnika.

6. ZAKLJUČAK

- I. *In vitro* izlaganje stanica karcinoma jajnika (stanična linija SKOV-3) derivatima tieno[2,3-b]piridina (inhibitor 5, 6, 8 i 9) dovodi do smanjenja metabolički aktivnih stanica.
- II. Citotoksični učinak tieno[2,3-b]piridina ovisi o koncentraciji i vremenu inkubacije.
- III. U nekim slučajevima citotoksična aktivnost, odnosno smanjenje broja stanica raka, nije proporcionalna povećanju koncentracije i vremena inkubacije.
- IV. U nekim slučajevima dolazi do blagog porasta metabolički aktivnih stanica zbog oporavka stanica.
- V. Inhibitor 6 pokazao je najmanji citotoksični učinak i vrijednost IC50 nije se mogla odrediti.
- VI. Najveći citotoksični učinak pokazao je inhibitor 8 nakon 72h inkubacije.
- VII. Prema dobivenim rezultatima potvrđena je hipoteza ovog istraživanja.

7. LITERATURA

1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, urednici. Patologija. Četvrto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 149-151.
2. Cooper MG, Hausman RE. Rak. U: Lauc G, urednici. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 725.-726.
3. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, urednici. Patologija. Četvrto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 157.
4. Cooper MG, Hausman RE. Rak. U: Lauc G, urednici. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 728.
5. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, urednici. Patologija. Četvrto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 164.
6. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, urednici. Patologija. Četvrto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 183.
7. Cooper MG, Hausman RE. Rak. U: Lauc G, urednici. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 739.
8. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, urednici. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 4.-6.
9. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, urednici. Patologija. Četvrto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 184.
10. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, urednici. Patologija. Četvrto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str 185.-186.
11. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, urednici. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 8.-10.
12. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija i mortalitet od raka u EU-27 zemljama za 2020. godinu [Internet]. 2020 [citirano 9. rujna 2022.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>

13. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Svjetski dan borbe protiv raka jajnika [Internet]. 2022 [citirano 9. rujna 2022.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/svjetski-dan-borbe-protiv-raka-jajnika-2/>
14. American cancer society. Key statistics for ovarian cancer [Internet]. 2022 [citirano 9. rujna 2022.]. Dostupno na: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/key-statistics.html>
15. MSD priručnik dijagnostike i terapije. Rak jajnika [Internet]. [citirano 9. rujna 2022.]. Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/ginekologija/ginekoloski-tumori/rak-jajnika>
16. Roett MA, Evans P. Ovarian cancer: an overview. *Am Fam Physician*. 2009;80(6):609-16.
17. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Bolesti ženskog spolnog sustava. U: Raič A, urednici. *Patologija*. Četvrto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 621-622.
18. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16061.
19. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Bolesti ženskog spolnog sustava. U: Raič A, urednici. *Patologija*. Četvrto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 623.
20. Cho KR, Shih IeM. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:287-313.
21. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Tumori ženskog spolnog sustava. U: Raič A, urednici. *Klinička onkologija*. 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 185.-188.
22. Haunschild CE, Tewari KS. Bevacizumab use in the frontline, maintenance and recurrent settings for ovarian cancer. *Future Oncol*. 2020;16(7):225-246.
23. Jiang X, Li X, Li W, Bai H, Zhang Z. PARP inhibitors in ovarian cancer: Sensitivity prediction and resistance mechanisms. *J Cell Mol Med*. 2019;23(4):2303-2313.
24. CancerNet. Ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer: Types of treatment [Internet]. 2021 [citirano 16. rujna 2022.]. Dostupno na: <https://www.cancer.net/cancer-types/ovarian-fallopian-tube-and-peritoneal-cancer/types-treatment>

25. Reynisson J, Court W, O'Neill C, Day J, Patterson L, McDonald E i sur. The identification of novel PLC-gamma inhibitors using virtual high throughput screening. *Bioorg Med Chem.* 2009;17(8):3169-3176.
26. Owusu Obeng E, Rusciano I, Marvi MV, Fazio A, Ratti S, Follo MY i sur. Phosphoinositide-Dependent Signaling in Cancer: A Focus on Phospholipase C Isozymes. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7):2581.
27. 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.
28. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. *Biologija raka. U: Raič A, urednici. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 3-4.*

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Cilj ovog istraživanja utvrditi je potencijalno citotoksično djelovanje derivata tieno[2,3-b]piridina na staničnoj liniji humanog karcinoma jajnika.

Materijali i metode:

Citotoksičnost spojeva tieno[2,3-b]piridina, odnosno inhibitora 5, 6, 8 i 9 ispitivana je na SKOV-3 staničnoj liniji korištenjem MTT metode na temelju koje se određuje postotak metabolički aktivnih stanica. Učinak tieno[2,3-b]piridina ispitivan je u sedam različitih koncentracija nakon 4, 24, 48 i 72 sata inkubacije. Djelotvornost ispitivanih spojeva određena je spektrofotometrijski pri valjnoj duljini od 570 nm.

Rezultati:

Rezultati su prikazani grafički u odnosu vremena inkubacije i postotka metabolički aktivnih stanica. Svi ispitivani spojevi pokazali su citotoksičnu aktivnost ovisnu o koncentraciji i vremenu inkubacije. Citotoksična aktivnost nije u svim slučajevima proporcionalna porastu koncentracije inhibitora i vremena inkubacije. Inhibitor 6 pokazao je najmanju citotoksičnost. Inhibitor 8 pokazao je najveću citotoksičnost i to pri koncentraciji od 5 $\mu\text{mol/L}$ nakon inkubacije od 72h gdje se postotak metabolički aktivnih stanica smanjio na oko 40 %. Također, vrijednosti IC₅₀ izmjerene kod inhibitora 8 iznosile su 8,276 $\mu\text{mol/L}$ nakon inkubacije od 24h, 5,68 $\mu\text{mol/L}$ nakon 48h, a 4,093 $\mu\text{mol/L}$ nakon 72h.

Zaključak:

In vitro izlaganje stanica karcinoma jajnika derivatima tieno[2,3-b]piridina dovodi do smanjenja broja živih stanica. Citotoksični učinak ispitivanih spojeva ovisi o koncentraciji i vremenu inkubacije. U nekim slučajevima citotoksični učinak nije proporcionalan povećanju koncentracije i vremena inkubacije jer dolazi do blagog porasta metabolički aktivnih stanica zbog oporavka stanica. Najslabiji citotoksični učinak pokazao je inhibitor 6, a najjači inhibitor 8. Dobivenim rezultatima potvrđena je hipoteza ovog istraživanja. Potrebna su dodatna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja na životinjama kako bi se utvrdio mehanizam njihovog citotoksičnog učinka i potencijal za razvoj novih lijekova za liječenje karcinoma jajnika.

9. SUMMARY

The aim of the research:

The aim of the research is to examine the potential cytotoxic effects of thieno[2,3-b]pyridine derivatives on human ovarian cancer cells.

Materials and methods:

The cytotoxicity of thieno[2,3-b]pyridine compounds, i.e. inhibitors 5, 6, 8 and 9, was tested on the SKOV-3 cell line using the MTT method, based on which the percentage of metabolically active cells is determined. The effect of thieno[2,3-b]pyridine was examined in seven different concentrations after 4, 24, 48 and 72 hours of incubation. The effectiveness of the tested compounds was determined spectrophotometrically at a wavelength of 570 nm.

Results:

The results are presented graphically in relation to the incubation time and the percentage of metabolically active cells. All tested compounds showed cytotoxic activity dependent on concentration and incubation time. Cytotoxic activity is not in all cases proportional to the increase in inhibitor concentration and incubation time. Inhibitor 6 showed the lowest cytotoxicity. Inhibitor 8 showed the highest cytotoxicity at a concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$ after incubation for 72 hours, where the percentage of metabolically active cells decreased to about 40 %. Also, the IC_{50} values measured for inhibitor 8 were 8.276 $\mu\text{mol/L}$ after 24h incubation, 5.68 $\mu\text{mol/L}$ after 48h, and 4.093 $\mu\text{mol/L}$ after 72h.

Conclusion:

In vitro exposure of ovarian cancer cells to thieno[2,3-b]pyridine derivatives leads to a decrease in the number of live cells. The cytotoxic effect of the tested compounds depends on the concentration and incubation time. In some cases, the cytotoxic effect is not proportional to the increase in concentration and incubation time because there is a slight increase in metabolically active cells due to cell recovery. The weakest cytotoxic effect was shown by inhibitor 6, and the strongest by inhibitor 8. The obtained results confirmed the hypothesis of this research. Additional *in vitro* and *in vivo* animal studies are needed to determine their cytotoxic effect and the potential development of new drugs for the treatment of ovarian cancer.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Andrea Braica

Datum rođenja: 18.6.1996.

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Gabra Rajčevića 17, 20 000 Dubrovnik, Republika Hrvatska

e-mail: andrea.braica@gmail.com

OBRAZOVANJE

2003.-2011. Osnovna škola Lapad, Dubrovnik

2004.-2009. Umjetnička škola Luke Sorkočevića, Dubrovnik

2011.-2015. Biskupijska klasična gimnazija Ruđera Boškovića, Dubrovnik

2015.-2016. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek

2016.-2022. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, smjer Farmacija

21.veljače - 26.kolovoza 2022. - stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Lučac te u Galenskom i Analitičkom laboratoriju Ljekarni Splitsko-dalmatinske županije.

Znanja i vještine:

-Engleski jezik

-Rad u programu Microsoft Office i Esculap 2000