

Apoptotsko djelovanje tienopiridinskog derivata na stanice humanog karcinoma jajnika

Karanušić, Lara

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:171:330931>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
I
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Lara Karanušić

**APOPTOTSKO DJELOVANJE TIENOPIRIDINSKOG DERIVATA NA STANICE
HUMANOG KARCINOMA JAJNIKA**

Diplomski rad

Akadska godina:

2021./2022.

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
I
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Lara Karanušić

**APOPTOTSKO DJELOVANJE TIENOPIRIDINSKOG DERIVATA NA STANICE
HUMANOG KARCINOMA JAJNIKA**

Diplomski rad

Akadska godina:

2021./2022.

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, rujan 2022.

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 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, mag. med. biochem.
Pomoć pri izradi: -

APOPTOTSKO DJELOVANJE TIENOPIRIDINSKOG DERIVATA NA STANICE HUMANOG KARCINOMA JAJNIKA

Lara Karanušić, broj indeksa 222

Naslov rada: Apoptotsko djelovanje tienopiridinskog derivata na stanice humanog karcinoma jajnika

Cilj: Cilj ovog istraživanja jest dokazati djelovanje sintetski dobivenog inhibitora iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina na apoptozu stanica staničnih linija SK-OV-3 i OVCAR-3 humanog karcinoma jajnika. Pretpostavljeno 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 metode određena je optimalna koncentracija inhibitora kojom su tretirane stanice staničnih linija SK-OV-3 i OVCAR-3 humanog karcinoma jajnika tijekom 48 sati. Dodatkom aneksina V i propidij jodida stanice su analizirane protočnim citometrom kojim se dobije postotak stanica u ranoj i kasnoj apoptozi kod tretiranih i netretiranih stanica raka, a dobije se i grafički prikaz stanica.

Rezultati: Prikazani su kao postotak rane i kasne apoptoze i preživjelih stanica. Djelovanjem inhibitora ostvaren je statistički značajan porast apoptotskih stanica stanične linije SK-OV-3 u ranoj, kasnoj te ranoj i kasnoj apoptozi ukupno u odnosu na netretirane stanice. Slični rezultati zabilježeni su i za staničnu liniju OVCAR-3, gdje se također bilježi statistički značajan porast apoptotskih stanica u odnosu na netretirane stanice.

Zaključci: Novo-sintetizirani tieno[2,3-*b*]piridin doveo je do statistički značajnog porasta postotka stanica u ranoj, kasnoj te ranoj i kasnoj apoptozi ukupno u odnosu na netretirane stanice. Ovakvi rezultati nisu zanemarivi, a spoj je potencijalno važan za razmatranje i daljnje istraživanje u području liječenja karcinoma.

Ključne riječi: karcinom jajnika, tienopiridinski derivat, apoptoza

Rad sadrži: 52 stranica, 25 slika, 10 tablica, 26 referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. **Izv.prof.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić**
2. **prof. dr. sc. Anita Markotić**
3. **doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić**

Datum obrane: 30. rujna 2022. godine

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. 74 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: -

APOPTOTIC EFFECT OF THIENO-PYRIDINE DERIVATIVE ON HUMAN OVARIAN CARCINOMA CELLS

Lara Karanušić, index N^o 222

Diploma thesis title: Apoptotic effect of thieno-pyridine derivative on human ovarian carcinoma cells

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 in SK-OV-3 and OVCAR-3 cell lines of human ovarian cancer. 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 together will increase.

Materials and methods: Using MTT method, optimal concentration of inhibitor was determined with which ovarian cancer cells of SK-OV-3 and OVCAR-3 cell lines were treated for 48 hours. After adding annexin V and propidium iodide, the cells were analyzed by flow cytometer to obtain the percentage of cells in early, late and early and late apoptosis in total in treated and untreated cancer cells, and a graphical representation of the cells was also obtained.

Results: They are represented as the percentage of early and late apoptosis and surviving cells. The effect of inhibitor resulted in a statistically significant increase in apoptotic cells of the SK-OV-3 cell line in early, late and early and late apoptosis in total compared to untreated cells. Similar results were obtained for the OVCAR-3 cell line, where a percentage of apoptotic cells after treatment was statistically significantly increased, comparing to the untreated cells.

Conclusions: The treatment of ovarian cancer cells with newly synthesized thieno[2,3-*b*]pyridine derivative led to a statistically significant increase in the percentage of cells in early, late and early and late apoptosis in total compared to untreated cells. These results are not negligible, and the compound is potentially important for the further investigation in the cancer therapy field.

Key words: ovarian cancer, thieno-pyridine derivative, apoptosis

Thesis contains: 52 pages, 25 figures, 10 tables, 26 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. **Izv.prof.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić**
2. **prof. dr. sc. Anita Markotić**
3. **doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić**

Defence date: September 30th, 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.

Zahvale

Velike zahvale mentorici izv.prof.dr.sc. Vedrani Čikeš Čulić na posvećenom vremenu i trudu pri izradi ovog diplomskog rada, uz nju je bilo puno lakše savladati izazove.

Također, zahvaljujem mojoj obitelji i prijateljima na pruženoj podršci tijekom studiranja.

Sadržaj

1.UVOD	1
1.1 KARCINOM	2
1.2 ONKOGENI	4
1.3 TUMOR-SUPRESORSKI GENI	6
1.4 APOPTOZA	8
1.5 KARCINOM JAJNIKA	12
1.5.1 EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA	12
1.5.2 KLINIČKA SLIKA I POSTAVLJANJE DIJAGNOZE	13
1.5.3 KLASIFIKACIJA	14
1.5.4 LIJEČENJE.....	15
1.6 TIENOPIRIDINSKI DERIVATI	16
2.CILJ ISTRAŽIVANJA	19
2.1 CILJ ISTRAŽIVANJA	20
2.2 HIPOTEZA	21
3. MATERIJALI I METODE	22
3.1 STANIČNE LINIJE	23
3.1.1 SK-OV-3	23
3.1.2 OVCAR-3	24
3.2 NOVOSINTETIZIRANI INHIBITOR	25
3.3 PRIPREMA STANIČNIH LINIJA	26
3.4 MTT	26
3.5 POSTUPAK	27
3.6 PROTOČNA CITOMETRIJA	28
3.7 STATISTIČKA ANALIZA	28
4. REZULTATI	29
4.1 SK-OV-3	30
4.2 OVCAR-3	34
5. RASPRAVA	38
6. ZAKLJUČCI	41
7. LITERATURA	43
8. SAŽETAK	46
9.SUMMARY	48
10. ŽIVOTOPIS	50

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

BRCA 1, BRCA 2 – (engl. *BReast CAncer gene*); geni čije su mutacije odgovorne za nasljednu sklonost za rak dojke

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

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DAG – (engl. *diacylglycerol*); diacilglicerol

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

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

Fas – receptor za FasL; jedan od promotora apoptoze

FBS- fetalni goveđi serum

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

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

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

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

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

MTT- 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijev bromid

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

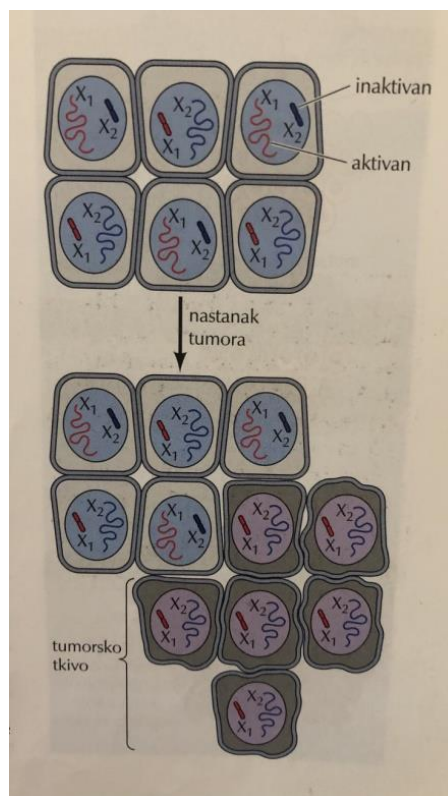
TNF – (engl. tumor necrosis factor); faktor tumorske nekroze, citokin

1.UVOD

1.1 KARCINOM

Karcinom je zajednički naziv za skup bolesti različite etiologije, biologije te kliničke slike. Zajedničko obilježje svih vrsta karcinoma jest proces pretvorbe zdravih stanica u zloćudno promijenjene stanice. Takve stanice gube sposobnost odgovora na signale koji su u skladu s ispravnim funkcioniranjem organizma. Karcinomske stanice nekontrolirano rastu i dijele se šireći se u zdrava tkiva preko krvožilnog ili limfatičkog sustava. Većina karcinoma se može svrstati u jednu od tri glavne skupine, ovisno o tome iz koje vrste stanica je karcinom nastao. Skupine su sljedeće: karcinomi, sarkomi te leukemije i limfomi. Karcinomi su zloćudne bolesti epitelnih stanica, sarkomi su solidni tumori vezivnih tkiva, a leukemije i limfomi nastaju iz krvotvornih stanica i iz stanica imunološkog sustava (1).

Jedna od temeljnih značajki karcinoma jest klonalnost, pojam koji označava nastanak karcinoma iz jedne zdrave stanice koja zbog mutacije započinje abnormalno proliferirati. Ova teorija je pokazana analizom inaktivacije X-kromosoma. Poznato je da se u zdravim tkivima heterozigotne žene nalazi ekspresija obaju alela jednog kromosoma, odnosno u nekim stanicama je ekspresiran jedan, a u drugim stanicama drugi alel. To je posljedica inaktivacije X-kromosoma tijekom embrionalnog razvoja. Suprotno tome, u karcinomskom tkivu nalazi se ekspresija samo jednog alela heterozigotnih gena, iz čega je moguće potvrditi teoriju monoklonalnosti (1).



Slika 1. Klonalnost tumora.

(Preuzeto iz: Geoffrey M. Cooper, R.E.Hausman; Rak. U: Gordan Lauc, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. Datum preuzimanja: 5.9.2022.)

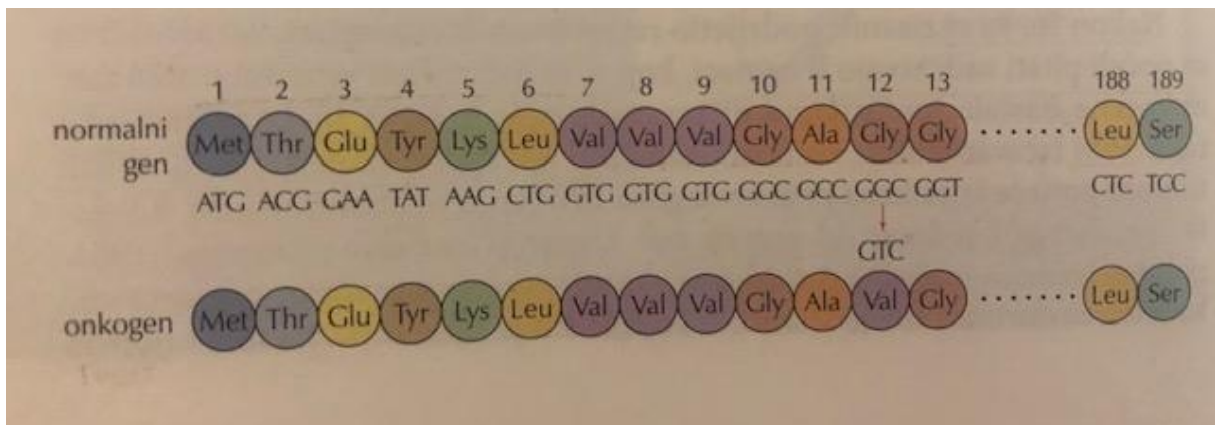
Nastanak raka dijeli se u nekoliko faza: inicijacija karcinoma, prekomjerni rast monoklonske populacije, progresija tj. nakupljanje dodatnih mutacija te klonska selekcija (2).

Ovisno o tvarima koje uzrokuju rak tj. karcinogenima, karcinomi se dijele se u više skupina: genski uvjetovani, uzrokovani kemijskim karcinogenima te karcinomi uzrokovani virusima. Osnovna obilježja karcinoma su:

1. samodostatnost s obzirom na signale rasta;
2. neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast;
3. zaobilaženje programirane stanične smrti;
4. neograničen potencijal umnožavanja;
5. tumorska angiogeneza te sposobnost tkivne invazije i presađivanja (2).

1.2 ONKOGENI

Stanični geni koji dovode do nastanka karcinoma nazivaju se onkogeni, a nastaju izmjenom protoonkogenata. Spomenuti geni sudjeluju u staničnoj signalizaciji i regulaciji svih procesa važnih za stanični rast, diobu, diferencijaciju te preživljenje. Za mnoge protoonkogene se pokazalo da su geni za tirozin-kinaze, a to su proteini ključni u fosforilaciji tirozinskih ostataka proteina. Procesima transkripcije i translacije od onkogenata se sintetiziraju onkoproteini, molekule ključne u razvoju karcinoma. Više je načina aktivacije onkogenata, među koje se ubrajaju mutacija u samom genu (npr. Ras onkogen), amplifikacija onkogenata (npr. ERBB2 tj. HER2) te kromosomska translokacija (npr. onkogen MYC) (3).



Slika 2. Točkaste mutacije u onkogenima Ras

(Preuzeto iz: Geoffrey M. Cooper, R.E.Hausman. U: Gordan Lauc, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.

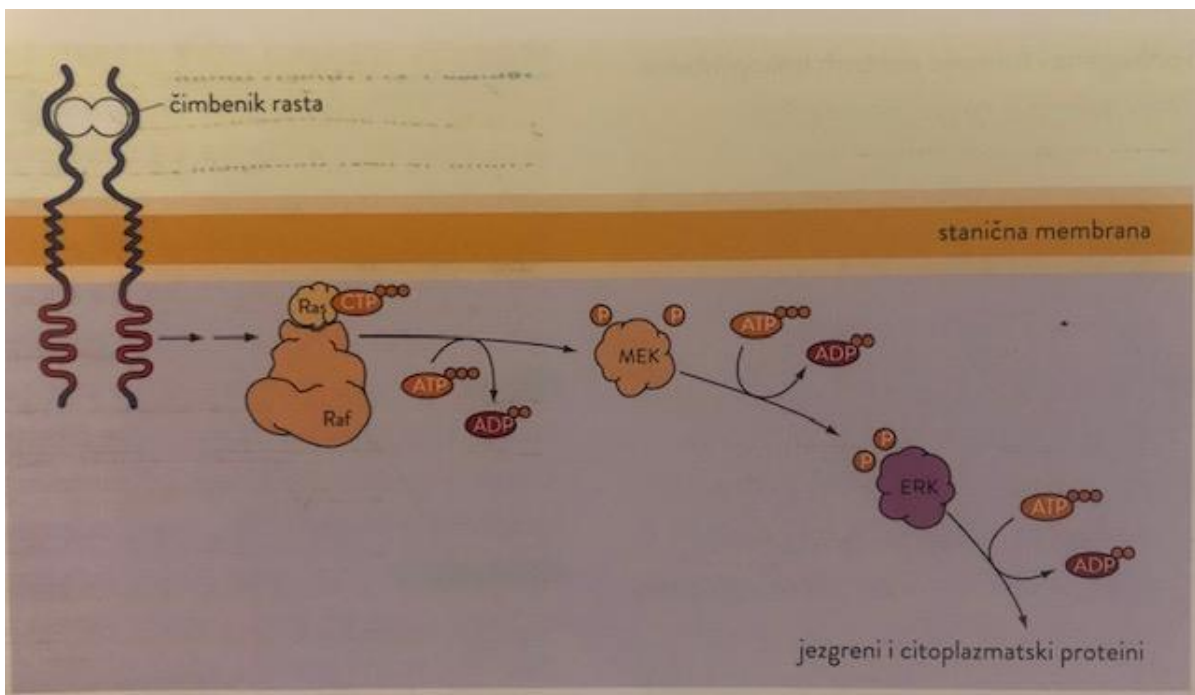
Datum preuzimanja: 5.9.2022.)

Neki od onkogenata nađenih u humanim tumorima homolozi su onkogenata ranije nađenih u retrovirusima, a neki su po prvi put otkriveni analizom humanih karcinoma. Najčešći onkogeni u ljudskim karcinomima su geni obitelji ras: rasH, rasK, rasN, a iste nije moguće naći u normalnim humanim stanicama (3).

U konačnici se sintezom onkoproteina i njihovim djelovanjem omogućuje karcinomskoj stanici da uspješno izbjegne programiranu staničnu smrt (3).

Unutar svake stanice postoje putevi prijenosa signala, a onkoproteini su sastavni dijelovi toga puta. Onkoproteini mogu biti čimbenici rasta, receptori za čimbenike rasta, unutarstanični signalni proteini, transkripcijski čimbenici i regulator staničnog ciklusa, ciklin D1 (3).

Za nastanak raka važna je uloga Ras-Raf-MEK-ERK puta prijenosa signala. Mutacije nastaju u različitim dijelovima ove kaskade, a neki od antitumorskih lijekova koji na nju djeluju su sorafenib, vemurafenib, trametinib te kobimetinib. Mutacije gena Ras dovode do rezistencije na terapiju cetuksimabom i panitumumabom. Ras također dovodi do aktivacije proteina mTOR, koji je meta djelovanja antitumorskih lijekova everolimusa i temsirolimusa. Razvijeni su i inhibitori protein-kinaza imatinib, sorafenib, sunitinib i dr. te monoklonalna protutijela trastuzumab, cetuksimab i dr. (3).



Slika 3. Ras-Raf-MEK-ERK put prijenosa signala.

(Preuzeto iz: Geoffrey M. Cooper, R.E.Hausman. U: Gordan Lauc, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.

Datum preuzimanja: 5.9.2022.)

1.3 TUMOR-SUPRESORSKI GENI

Tumor-supresorski geni su geni koji imaju suprotnu ulogu u odnosu na onkogene, oni normalno inhibiraju proliferaciju stanice i nastanak karcinoma. U većini tumorskih tkiva ovi su geni nestali ili su inaktivirani, što posljedično dovodi do poremećene proliferacije karakteristične za ta tkiva. Prvo otkriće tumor-supresorskog gena nastalo je istraživanjem retinoblastoma, rijetkog tumora oka kod djece. Iako se bolest nasljeđuje autosomno dominantno, sam gen nije dostatan za pretvorbu stanice u karcinomsku. Ono što je kasnije otkriveno jest to da je za nastanak karcinomske stanice potreban gubitak funkcije obaju alela tumor-supresorskog gena (Rb). Daljnjim analizama spoznato je da je riječ o deleciji kromosoma 13q14, čime se moglo zaključiti da tumor nastaje zbog gubitka (a ne aktivacije) gena Rb. Do nestanka ili inaktivacije Rb dolazi i u drugim karcinomima, primjerice karcinomu mjehura, dojke i pluća (4).

Drugi otkriveni tumor-supresorski gen bio je p53, često inaktiviran u nizu karcinoma, primjerice u leukemiji, sarkomu, limfomu i dr. Proteinski produkt tog gena aktivira se zbog oštećenja DNA, a u konačnici zaustavlja stanicu u određenoj fazi staničnog ciklusa, aktivira popravak DNA te potiče apoptozu. U slučaju nedostatka p53, oštećena stanica neometano ulazi u diobu pri čemu se vjerojatnost za nastanak karcinoma povećava (4).

Gen	Vrsta raka
APC	karcinom debeloga i završnoga crijeva
BRCA1	karcinom dojke i jajnika
BRCA2	karcinom dojke
INK4	melanom, karcinom pluća, tumori mozga, leukemije, limfomi
NF1	neurofibrosarkom
NF2	meningeom
p53	tumori mozga; karcinomi dojke, debeloga i završnoga crijeva, jednjaka, jetara i pluća; sarkomi; leukemije i limfomi
PTCH	bazaliom
PTEN	tumori mozga; melanom; karcinom prostate, trupa maternice, bubrega i pluća
Rb	retinoblastom; sarkomi; karcinom mjehura, dojke i pluća
Smad2	karcinom debeloga i završnoga crijeva
Smad4	karcinom debeloga i završnoga crijeva i gušterače
TβRII	karcinom debeloga i završnoga crijeva i želudca
VHL	karcinom bubrega
WT1	Wilmsov tumor

Slika 4. Tumor-supresorski geni.

(Preuzeto iz : Geofrey M. Cooper, R.E.Hausman. In: **Gordan Lauc, editor**. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.

Datum preuzimanja: 6.9.2022.)

Iz primjera s genom p53 uočava se kako je nastanak raka povezan s poremećajem apoptoze te s poremećajem u regulaciji staničnog ciklusa. Stanice bez p53 ne umiru apoptozom nakon izlaganja tvarima koje oštećuju DNA te antitumorskim lijekovima (6).

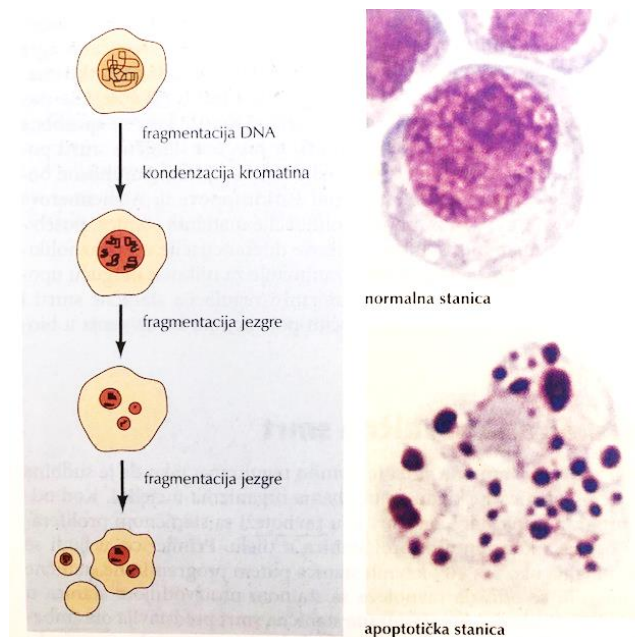
Otkriveni su i brojni drugi tumor-supresorski geni poput INK4 i PTEN (često mutirani u karcinomu pluća, prostate te melanoma), zatim APC, Smad2 i Smad4 (često inaktivirani u raku debelog crijeva), BRCA 1 i BRCA 2 (mutirani u karcinomu dojke) i dr (6).

Stanica prirodno prolazi kroz četiri faze ciklusa. Cijeli je proces strogo reguliran i pod utjecajem je različitih signala. Prijelaz stanice u iduću fazu omogućavaju kontrolne točke u kojima se kontrolira postoji li oštećenje DNA. Aktivacija onkogeni ili inaktivacija tumor-supresorskih gena dovodi do poremećenog funkcioniranja ove kontrole (6).

Važno je spomenuti i pojam genomske nestabilnosti koja nastaje u stanicama kao posljedica poremećaja funkcioniranja mehanizama neophodnih za održavanje niske razine mutacija. Genomska nestabilnost smatra se važnim obilježjem karcinoma, a ta je povezanost vidljiva na primjerima različitih nasljednih genskih bolesti. Geni povezani s očuvanjem genomske stabilnosti doprinose nastanku karcinoma na sličan način kao i tumor-supresorski geni. Naime, inaktivacija obaju alela gena pogoduje nastanku karcinoma. Primjeri takvih gena su BRCA 1 i BRCA 2 povezani s nasljednim karcinomom dojke i jajnika, a oni sudjeluju u popravku oštećene DNA. Stanice koje imaju mutiran gen moraju se osloniti na druge mehanizme popravka oštećene DNA (6).

1.4 APOPTOZA

Apoptoza ili programirana stanična smrt je, za razliku od slučajne smrti stanice uzrokovane ozljedom, aktivni proces koji je pomno reguliran te je u ravnoteži sa staničnom proliferacijom. To je obrambeni mehanizam organizma koji na taj način uklanja potencijalno štetne stanice. Primjerice, stanice zaražene virusom često podliježu apoptozi kako bi se ograničilo širenje virusa po organizmu domaćina. Osim toga, oštećenje DNA u stanici pokreće proces apoptoze. U tom procesu kromosomska DNA obično je fragmentirana kao posljedica kidanja nukleosoma. Kromatin se kondenzira, jezgra se fragmentira, a u konačnici se stanica skvrči i raspadne u male komadiće okružene membranom, nazvane apoptotička tjelešca. Postoji jasna razlika između apoptoze i nekroze kada je riječ o uklanjanju mrtvih stanica. Stanice koje umiru zbog nekroze prvo nabubre, zatim se liziraju i otpuštaju svoj sadržaj u vanstanični prostor, čime dolazi do upale. Za razliku od toga, uklanjanje stanica koje umiru apoptozom posredovano je posebnim signalima. Tijekom apoptoze se fosfatidilserin, inače sastavni dio unutarnjeg sloja stanične membrane, eksprimira na staničnoj površini. Tu ga prepoznaju receptori sa fagocita te apoptotičke stanice bivaju uspješno fagocitirane (7).



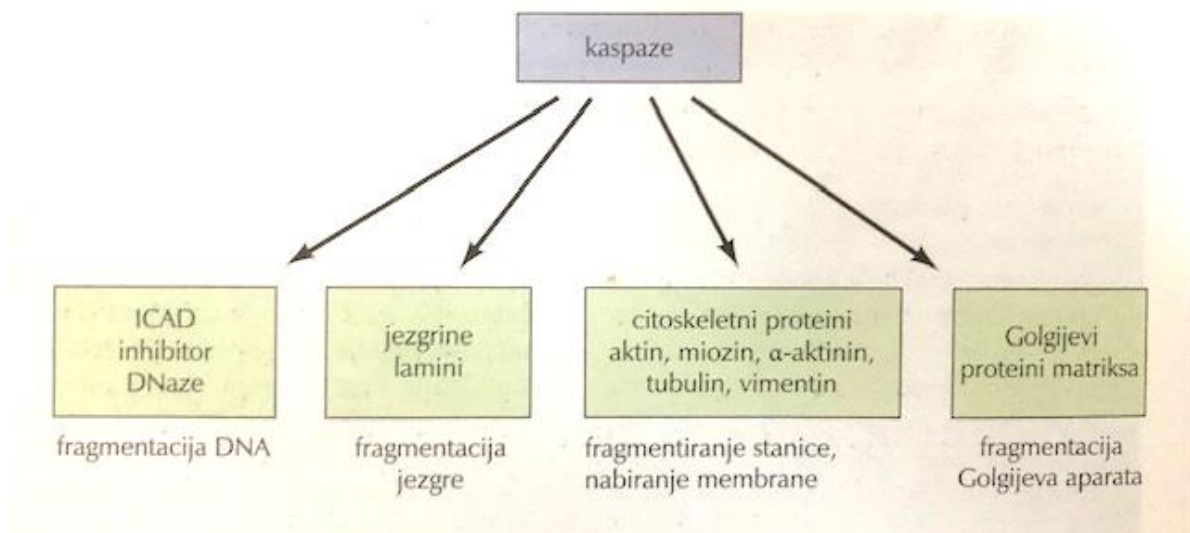
Slika 5. Apoptoza.

(Preuzeto iz: Geofrey M. Cooper, R.E.Hausman. **In: Gordan Lauc, editor**. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.

Datum preuzimanja: 8.9.2022.)

Prve studije apoptoze rađene su analiziranjem razvitka *C.elegans*. Naime, poznato je da tijekom normalnog razvoja organizma postoji određeni broj uvijek istih stanica koje se uklanjaju apoptozom. Daljnjom analizom gena nađeni su geni nužni za apoptozu razvojnih stanica, ced-3 i ced-4. U slučaju inaktivacije bilo kojeg od ta dva gena, normalna apoptoza će izostati. Treći gen, poznatiji kao ced-9, djeluje kao negativni regulator apoptoze. To znači da će njegovom inaktivacijom umirati stanice koje bi normalno preživjele (7).

Detaljnijom analizom gena ced-3 otkriveno je da taj gen kodira proteazu. Ced-3 je prototip obitelji koja sadrži više od desetak proteaza, nazvanih kaspaze. Možemo reći da su kaspaze izvršitelji apoptoze koji na svojim aktivnim mjestima imaju cisteinske ostatke, a njihov učinak temelji se na kidanju proteinskog supstrata iza aspartata. Mete kaspaza su brojne, počevši od inhibitora DNaze, preko jezgrine lamine i citoskeletnih proteina do proteina Golgijevog matriksa (7).



Slika 6. Mete kaspaza.

(Preuzeto iz: Geoffrey M. Cooper, R.E.Hausman. In: Gordan Lauc, editor. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.

Datum preuzimanja: 8.9.2022.)

Sisavci sadrže barem sedam vrsta kaspaza, a iste se dijele na inicijatorske ili efektorske kaspaze. Sve kaspaze se sintetiziraju kao inaktivne preteče, a proteolitičkim kidanjem prelaze u aktivni oblik (7).

U stanicama sisavaca ključna je inicijatorska kaspaza (kaspaza-9) koja se aktivira tako što se veže na Apaf-1 (homolog ced-4) u kompleksu nazvanom apoptosom. Za tvorbu je nužan i citokrom c koji se otpušta s mitohondrija zahvaljujući signalima koji potiču apoptozu. Aktivacijom kaspaze-9 u apoptosomu dolazi do kaskadne aktivacije ostalih kaspaza, što naposljetku dovodi do apoptoze (7).

Središnji regulatori apoptoze su članovi obitelji Bcl-2. Gen bcl-2 srodan je genu ced-9 otkrivenom u genomu *C.elegans*. Bcl-2, za razliku od drugih onkogenih proteina, inhibira apoptozu. Na temelju svega do sada navedenog moguće je zaključiti da je za nastanak karcinoma jednako važan proces izbjegavanja programirane stanične smrti kao i nekontrolirana stanična proliferacija. Spomenuti proteini se dijele na proapoptotičke i antiapoptotičke, a sam naziv ukazuje na njihovu ulogu. Važno je spomenuti proapoptotičke proteine Bax i Bak, koji su nizvodni efektori te izravno induciraju apoptozu (7).

U stanicama sisavaca, članovi obitelji Bcl-2 djeluju u mitohondrijima gdje dolazi do otpuštanja citokroma c iz mitohondrija posredovanog proteinima Bax i Bak, čime i započinje proces aktivacije kaspaza. Kaspaze su također regulirane od strane obitelji proteina pod nazivom IAP (IAP-engl. *Inhibitors of apoptosis proteins*). To su proteini koji izravno koče apoptozu stupajući u interakciju sa kaspazama (7).

Signalni putevi koji reguliraju apoptozu mogu se podijeliti na intrinzičke i ekstrinzičke. Podražaji za aktivaciju intrinzičkih puteva su različiti oblici staničnog stresa, primjerice oštećenje DNA, virusne infekcije i manjak faktora rasta. Navedenim podražajima dolazi do otpuštanja citokroma c te aktivacije kaspaze-9. Transkripcijski faktor p53 jako je važan čimbenik ovoga puta, a njegovu razinu podiže oštećenje DNA. Pojačana sinteza p53 dovodi do apoptoze ili do reverzibilnog zaustavljanja staničnog ciklusa, a to ovisi o razini oštećenja i utjecaju drugih signala koje stanica prima. Jedan od glavnih unutarstaničnih signalnih puteva je onaj posredovan PI 3-kinazom, koja PIP2 pretvara u PIP3, što posljedično aktivira kinazu Akt koja nizvodno fosforilira brojne proteine ključne za apoptozu. Jedan od tih proteina je Bad, čijom aktivacijom dolazi do inhibicije apoptoze. Na Bad djeluju i kinaze iz drugih signalnih puteva, primjerice gore spomenuti Ras/Raf/MEK/ERK, pa je tako Bad poveznica signalnih puteva u procesu staničnog preživljenja (7).

Za razliku od intrinzičkog puta, za regulaciju ekstrinzičkog puta važni su određeni izlučeni polipeptidi koji djelujući na receptore potiču staničnu smrt, a pripadaju obitelji faktora tumorske nekroze (TNF). Ti receptori aktiviraju kaspazu-8, inicijatorsku kaspazu. Jedan od najbolje opisanih staničnih receptora iz te obitelji je Fas, a važan je u reguliranju stanične smrti u imunološkom sustavu. Njegovim posredstvom dolazi do ubijanja stanica karcinoma, stanica zaraženih virusom te do uklanjanja viška limfocita na kraju imunoodgovora (7).

1.5 KARCINOM JAJNIKA

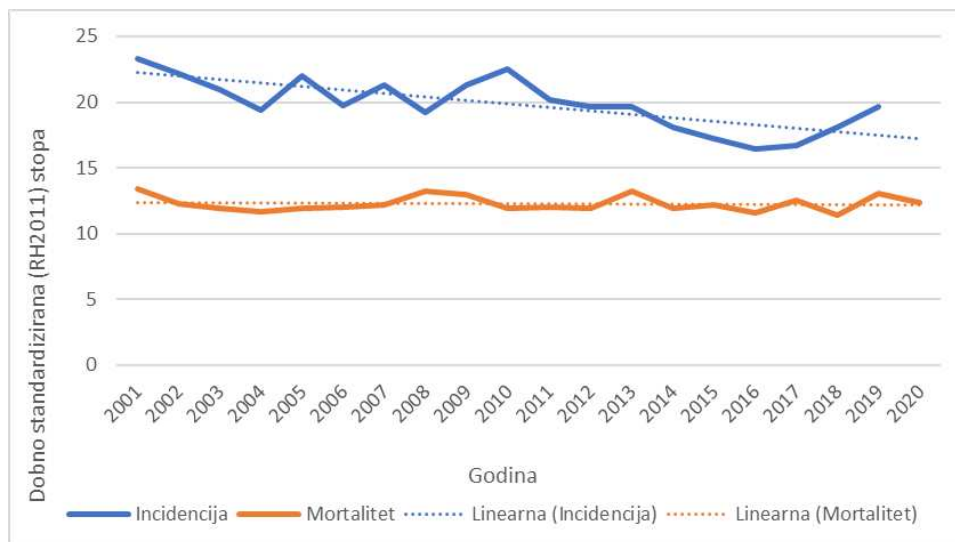
1.5.1 EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Karcinom jajnika je histološki, klinički i terapijski heterogena bolest. Najveći postotak od 80% čini karcinom epitelnih stanica jajnika. Preostalih 20% karcinoma jajnika može potjecati iz zametnih stanica jajnika, iz stanica strome i spolnog tračka ili su metastaze u jajnik (8).

Karcinomi jajnika su prema učestalosti na trećem mjestu, iza karcinoma cerviksa i endometrija u žena. Obzirom da se većinom otkrivaju u uznapredovaloj fazi kada su inoperabilni, prati ih visoka stopa smrtnosti(>50%) od karcinoma ženskog spolnog sustava (9).

Prema procjenama Međunarodne agencije za istraživanje raka u 2020. godini od karcinoma jajnika oboljelo je otprilike 314000 žena, a umrlo čak 207000. Od karcinoma jajnika u Hrvatskoj godišnje oboli između 400 i 500 žena, a umre ih preko 300. Prateći podatke hrvatskog Registra za rak u 2019. godini je oboljelo 459 žena, a umrlo ih je 316. Pojavnost je češća u starijih žena, ali se u preko 35% slučajeva dijagnosticira i prije 60-te godine života (10).

U Hrvatskoj je, kao i drugdje u Europi, standardizirana stopa incidencije karcinoma jajnika u padu, što je posljedica sve raširenije upotrebe oralnih kontraceptiva i smanjene upotrebe hormonske nadomjesne terapije. Međutim, mortalitet u Hrvatskoj je stabilan (10).



Slika 7. Trend incidencije i mortaliteta od raka jajnika u Hrvatskoj, 2001.-2020.

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

Datum preuzimanja: 10.09.2022.)

Posljednji podaci CONCORD-3 studije o preživljenju od karcinoma u Europi pokazali su da je petogodišnje preživljenje žena u Hrvatskoj kojima je karcinom dijagnosticiran između 2010. i 2014. godine 36%, čime je Hrvatska na 23. mjestu od ukupno 28 zemalja (10).

1.5.2 KLINIČKA SLIKA I POSTAVLJANJE DIJAGNOZE

Razlog kasne dijagnoze karcinoma jajnika jest taj što su simptomi u ranoj fazi bolesti nespecifični i javljaju se relativno kasno. Najčešći simptomi su bolovi u trbuhu ili zdjelici, nadutost i vaginalno krvarenje. Provedena je studija koja je analizirala žene s graničnim tumorom jajnika te s karcinomom jajnika. Zaključci koji se mogu uočiti su da i jedna i druga skupina žena ima slične simptome, a žene s graničnim tumorom jajnika imaju dulji vremenski interval od pojave simptoma do dijagnoze (11).

Od ostalih simptoma tu su još i rano zasićenje gladi te križobolja, a kasnije se razvijaju bol u zdjelici, anemija, kaheksija i oticanje trbuha ili ascites. Tumori zametnih stanica ili strome mogu imati i druge učinke, primjerice hipertireozu, feminizaciju, virilizaciju i dr. (12).

U slučaju postojanja sumnje na karcinom jajnika, prvo se radi pretraga ultrazvukom (solidna sastavnica, površinske izrasline, veličina mase >6 cm, nepravilni obrisi te niski vaskularni otpor prilikom određivanja transvaginalnim obojenim Dopplerom, značajke su karcinoma). Prije operacije se radi CT ili MR radi utvrđenja proširenosti karcinoma, tumorski biljezi ((humani korionski gonadotropin (β -HCG), laktat-dehidrogenaza (LDH), α -fetoprotein, inhibin i karcinomski antigen CA-125)). CA-125 može osim u karcinomu jajnika biti povišen u endometriozu, upalnoj bolesti zdjelice, trudnoći, kod mioma, upale peritoneuma ili primarnog raka peritoneuma. Kada nađena tvorba izgleda dobroćudno, ultrazvučna pretraga se ponavlja svakih 6 tjedana. Ako žena nije kandidat za operaciju, uzorak tvorbe se uzorkuje biopsijom širokom iglom, a acites se uzorkuje citološkom punkcijom (12).

1.5.3 KLASIFIKACIJA

Na slici 8A je detaljno vidi prvi dio TNM klasifikacije karcinoma jajnika od strane Međunarodne federacije za ginekologiju i obstetriciju, bez drugog dijela o zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova i prisustvu udaljenih presadnica, koji je prikazan na slici 8B

TNM	FIGO	
TX		Prisutnost primarnog tumora se ne može procijeniti
T0		Nema dokaza postojanja primarnog tumora
T1	I	Tumor ograničen na jajnike
T1a	IA	Tumor ograničen na jedan jajnik; bez zloćudnih stanica u ascitesu; bez tumora na vanjskoj površini jajnika; intaktna kapsula jajnika
T1b	IB	Tumor na oba jajnika; bez zloćudnih stanica u ascitesu; intaktna kapsula jajnika
T1c	IC	Tumor jajnika stadija IA ili IB ali sa tumorom na površini jednog ili oba jajnika ili puknute kapsule jajnika, ili zloćudnim stanicama u ascitesu ili pozitivnim peritonealnim ispirkom
T2	II	Tumor zahvaća jedan ili oba jajnika sa širenjem na tkivo zdjelice
T2a	IIA	Širenje na i/ili presadnice u maternicu i/ili jajovode
T2b	IIB	Širenje tumora na drugo zdjelično tkivo
T2c	IIC	Tumor stadija IIA ili IIB, ali sa tumorom na površini jednog ili oba jajnika i/ili puknutom kapsulom i/ili zloćudnim stanicama u ascitesu i/ili pozitivnim peritonealnim ispirkom
T3	III	Tumor ograničen na jedan ili oba jajnika sa histološki potvrđenim peritonealnim implantatima izvan zdjelice i/ili pozitivnim regionalnim limfnim čvorovima. Površinske jetrene presadnice su stadij III. Tumor ograničen na zdjelicu, ali sa histološki potvrđenim širenjem na tanko crijevo ili omentum.
T3a	IIIA	Mikroskopske peritonealne presadnice izvan zdjelice
T3b	IIIB	Peritonealni implantati izvan zdjelice veličine do 2 cm u najvećem promjeru
T3c	IIIC	Peritonealne presadnice izvan zdjelice promjera većeg od 2 cm i/ili zahvaćeni regionalni limfni čvorovi
T4	IV	Prisustvo udaljenih presadnica (isključujući peritonealne presadnice). Ukoliko postoji pleuralni izljev, mora postojati citološka potvrda zloćudnih stanica da bi se pridijelio stadij IV
Regionalni limfni čvorovi (N)		
NX		Status limfnih čvorova se ne može procijeniti
N0		Regionalni limfni čvorovi nisu zahvaćeni

Slika 8A. Primarni tumor, okolni limfni čvorovi i udaljene metastaze-klasifikacija raka jajnika (*Tumor, node and metastasis* -TNM) i klasifikacija Međunarodnog udruženja ginekologa i opstetričara (*International Federation of Gynecology and Obstetrics* -FIGO)

(Preuzeto iz:

<https://www.hdgo.hr/userFiles/upload/documents/HDGO%20smjernice/ONK/HDGO-S1-Onkologija-Ovarij.pdf>

Datum preuzimanja: 13.9.2022.)

N1	IIIC	Zahvaćeni regionalni limfni čvorovi
Udaljene presadnice (M)		
M0		Nema udaljenih presadnica
M1	IV	Prisutne udaljene presadnice (isključuju se peritonealne presadnice)

Slika 8B. Primarni tumor, okolni limfni čvorovi i udaljene metastaze-klasifikacija raka jajnika (*Tumor, node and metastasis* -TNM) i klasifikacija Međunarodnog udruženja ginekologa i opstetričara (*International Federation of Gynecology and Obstetrics* -FIGO)

(Preuzeto iz:

<https://www.hdgo.hr/userFiles/upload/documents/HDGO%20smjernice/ONK/HDGO-S1-Onkologija-Ovarij.pdf>

Datum preuzimanja: 13.9.2022.)

1.5.4 LIJEČENJE

Odluka o načinu liječenja karcinoma jajnika donosi se timski, a pri čemu se uvažavaju dob bolesnice, opće stanje, komorbiditeti te obilježja karcinoma koja podrazumijevaju stadij bolesti, histološki tip i gradus tumora. Smjernice za liječenje primarnog karcinoma potrbušnice i jajovoda temeljeni su na principima liječenja epitelnog karcinoma jajnika. Rjeđi histološki tipovi karcinoma jajnika češće se dijagnosticiraju u ranim stadijima bolesti te se terapijske smjernice razlikuju od onih za epitelni karcinom jajnika (13).

Pri liječenju karcinoma pokrovnog epitela jajnika stadija 1 prema FIGO (engl. *The International Federation of Gynecology and Obstetrics*) klasifikaciji primarno se vrši maksimalna redukcija tumorske mase te kirurško stupnjevanje u svrhu određivanja stupnja

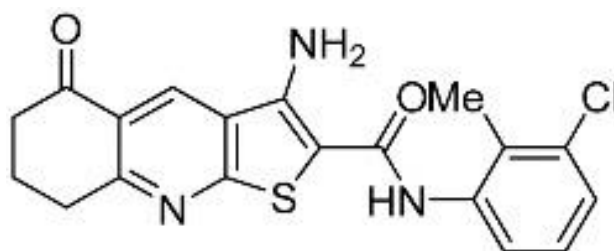
proširenosti bolesti i potpune R0 resekcije tumora. Adjuvantna kemoterapija se ne preporuča kod ranog stadija karcinoma s niskim rizikom povratka bolesti, a to su primjerice FIGO 1A serozni karcinom, niskog gradusa te FIGO 1A dobro i srednje diferencirani endometrioidni i mucinozni karcinom gradusa 1 i 2. U određenih bolesnica potreban je individualan pristup jer je korist adjuvantne kemoterapije upitna, primjerice endometrioidni i mucinozni karcinom FIGO 2B gradusa. Adjuvantna kemoterapija je indicirana kod bolesnica s visokim rizikom za povratak bolesti, a primjeri za to su slabo diferencirani karcinomi jajnika FIGO 1C gradusa. Kemoterapija je temeljena na kombinaciji cisplatina ili karboplatina s paklitakselom, ili monoterapija karboplatinom (13).

Pri liječenju uznapredovalog stadija karcinoma pokrovnog epitela jajnika radi se maksimalna redukcija tumorske mase te određivanje stupnja proširenosti bolesti. Nakon toga slijedi kemoterapija temeljena na platini. Dodatak inhibitora angiogeneze bevacizumaba prvolinijskoj kemoterapiji produljuje preživljenje i podiže stopu odgovora na liječenje kod bolesnica koje nemaju defekt homologne rekombinacije, tj. mutacije gena BRCA 1 i/ili 2 (geni koji imaju važnu ulogu u nastanku karcinoma). Nakon odgovora na prvolinijsku terapiju dodaje se inhibitor poli(ADP-riboza) polimeraze (PARP) olaparib ili niraparib koji klinički značajno produljuje preživljenje kod bolesnica koji imaju defekt homologne rekombinacije tj. mutacije gena BRCA 1 i/ili 2 (13).

1.6 TIENOPIRIDINSKI DERIVATI

Derivati piridina spojeni s tiofenskim jezgrama su spojevi koji imaju različite biološke aktivnosti. U posljednje vrijeme se istražuje antikancerogeni učinak tieno [2,3-*b*]piridina.

Istraživan je utjecaj novog derivata, spoja 1, u MDA-MB-231 trostruko negativnim stanicama raka dojke na ekspresiju CD15 i CD44 u različitim stanicama te je pokazan potencijal ovoga spoja u liječenju (14).



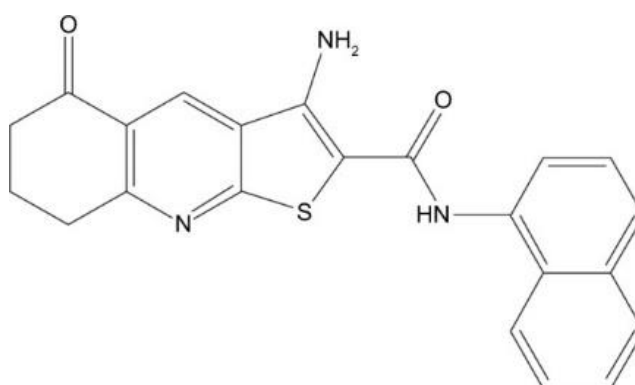
Compound 1

Slika 9. 3-amino-*N*-(3-chloro-2-methylphenyl)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-*b*]quinoline-2-carboxamide.

(Preuzeto iz: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8304450/>

Datum preuzimanja: 14.9.2022.)

Nadalje, istraživani su utjecaji novorazvijenog derivata na rast, preživljavanje i glikofenotip (CD15 i GM3 koji sadrže neuraminsku kiselinu supstituiranu acetilnim ostatkom, NeuAc) populacije matičnih stanica karcinoma dojke i prostate. Također se pokazalo kako je spoj 1 potencijalno učinkovit u liječenju karcinoma (15).

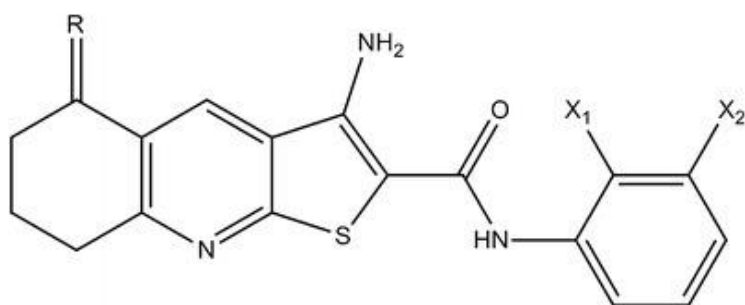


Slika 10. 3-amino-5-oxo-*N*-naphthyl-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-*b*]quinoline-2-carboxamide.

(Preuzeto iz: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5359006/>

Datum preuzimanja: 14.9.2022.)

Za kraj navođenja primjera provedenih istraživanja istaknut će se istraživanje koje je dokazalo povezanost fosfolipaze C u antitumorskom djelovanju nosintetiziranog derivata, spoja 3. Rezultati pokazuju da nosintetizirani derivati stupaju u interakciju s fosfolipazom C, a posljedično dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa. Zaključak je da ovi spojevi mogu biti korisni u kombinaciji s mitotičkim otrovima za liječenje karcinoma (16).



- | |
|--|
| 1. R = O, X ₁ = H, X ₂ = Cl |
| 2. R = O, X ₁ = H, X ₂ = Br |
| 3. R = O, X ₁ = H, X ₂ = OMe |
| 4. R = O, X ₁ = Me, X ₂ = Cl |
| 5. R = O, α -naphthyl |
| 6. R = H/OH, X ₁ = H, X ₂ = Cl |

Slika 11. Struktura tieno[2,3-*b*]piridinskih derivata, uključujući korišteni spoj 3.

(Preuzeto iz: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4785615/>

Datum preuzimanja: 14.9.2022.)

2.CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je odrediti postotak rano i kasno apoptotičkih stanica u humanim staničnim linijama SK-OV-3 i OVCAR-3 karcinoma jajnika nakon tretiranja sintetski dobivenim spojem, 3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamidom (inhibitorom 5).

2.2 HIPOTEZA

Inhibitor 5 povećava ranu i kasnu apoptozu u ispitivanim humanim staničnim linijama karcinoma jajnika SK-OV-3 i OVCAR-3.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 STANIČNE LINIJE

3.1.1 SK-OV-3

Tablica 1. Karakteristike SK-OV-3 linije.

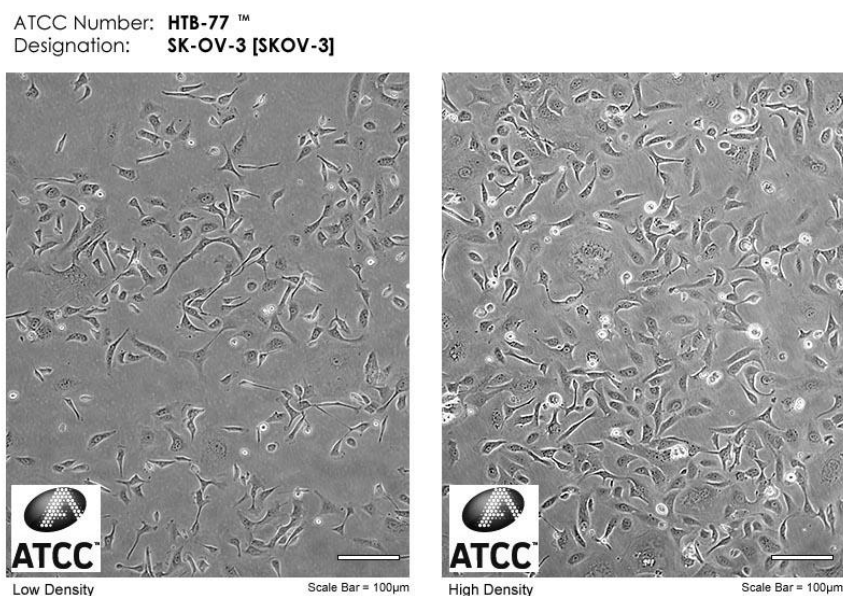
(Prilagođeno i preuzeto iz: <https://www.atcc.org/products/htb-77>

Datum preuzimanja: 14.9.2022.)

Kategorija proizvoda	humane stanice
Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Morfologija	epitelna
Tkivo	jajnik, ascites
Bolest	adenokarcinom
Oblik proizvoda	smrznuto
Uvjeti čuvanja	parna faza tekućeg dušika

(Prilagođeno i preuzeto iz: <https://www.atcc.org/products/htb-77>

Datum preuzimanja: 14.9.2022.)



Slika 12. SK-OV-3 stanične linije humanog karcinoma jajnika (slika lijevo - niska gustoća, slika desno - visoka gustoća).

(Preuzeto iz: <https://www.atcc.org/products/htb-77>

Datum preuzimanja: 14.9.2022.)

3.1.2 OVCAR-3

Tablica 2. Karakteristike OVCAR-3 linije.

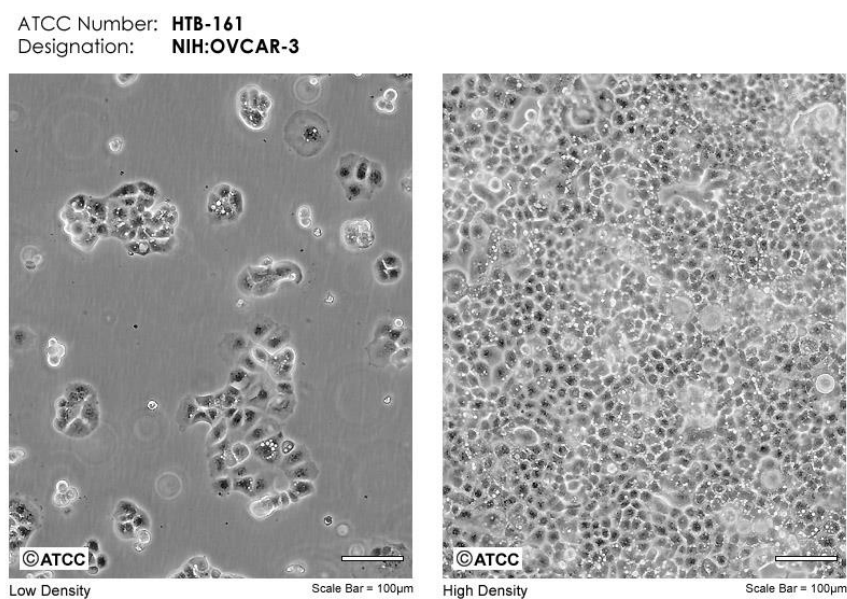
(Prilagođeno i preuzeto iz: <https://www.atcc.org/products/htb-161>

Datum preuzimanja: 14.9.2022.)

Kategorija proizvoda	humane stanice
Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Morfologija	epitelna
Tkivo	jajnik
Bolest	adenokarcinom
Oblik proizvoda	smrznuto
Uvjeti čuvanja	parna faza tekućeg dušika

(Prilagođeno i preuzeto iz: <https://www.atcc.org/products/htb-161>

Datum preuzimanja: 14.9.2022.)



Slika 13. OVCAR-3 stanične linije humanog karcinoma jajnika (slika lijevo - niska gustoća, slika desno - visoka gustoća).

(Preuzeto iz: <https://www.atcc.org/products/htb-161>

Datum preuzimanja: 14.9.2022.)

inhibitorni učinak kod staničnih linija melanoma, raka dojke, raka ne-malih stanica pluća i raka CNS-a (17).

Također je važno spomenuti i dokazano apoptotsko djelovanje tienopiridinskog derivata na stanice humanog karcinoma dojke (18).

Inhibitor 5 je u ovom istraživanju primijenjen na staničnim linijama SK-OV-3 i OVCAR-3. Prvotno je otopljen u dimetil sulfoksidu (DMSO) gdje je koncentracija iznosila 10 mmol/L. Otopina je razrijeđena u izotoničnom fosfatnom puferu, PBS-u, do koncentracije 1 mmol/L. Obzirom da je apoptoza istražena koristeći otopinu inhibitora koncentracije IC50 nakon 48 h, otopinu je dalje bilo potrebno razrijediti uz pomoć McCoy's medija do željene koncentracije.

3.3 PRIPREMA STANIČNIH LINIJA

Stanice iz staničnih linija SK-OV-3 i OVCAR-3 (ATCC) je potrebno odmrznuti, a potom se uzgajaju unutar vlažnog inkubatora na temperaturi 37°C uz 5% CO₂ u McCoy's mediju. Dodaje se 10%-tni fetalni goveđi serum te 1%-tna otopina antibiotika.

3.4 MTT

Pomoću rezultata dobivenih MTT testom određena je koncentracija inhibitora 5 koja je upotrijebljena u ovom istraživanju.

Već dugo godina se razne tetrazolijeve soli koriste za procjenu vitalnosti stanica. U uporabi su najčešće 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolijev bromid (MTT) i 5-cijano-2,3-di-(p-tolil)-tetrazolij klorid (CTC). Zahvaljujući koenzimima nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD(P)H) i dehidrogenazama (enzimi u metabolički aktivnoj stanici) dolazi do redukcije tetrazolijevih soli u obojene i lipofilne produkte formazana.

Takve je produkte naposljetku moguće kvantificirati mjerenjem apsorbancije (MTT) ili fluorescencije (CTC), a odaziv je proporcionalan broju živućih stanica (19).

3.5 POSTUPAK

Stanična linija se inkubira u uvjetima koji su ranije navedeni. Nakon perioda inkubacije hranjivi medij se odsisa iz petrijeve zdjelice koja sadrži staničnu liniju, doda se malo PBS-a, medij se ponovno odsisa te se doda tripsin kako bi se stanice odvojile od podloge. Zatim se podjednak broj stanica nasadi na ploče sa šest jažica te se dodaje McCoy's medij i ostavi preko noći. Kako bi zasadili jednak broj stanica u svaku jažicu stanice je potrebno izbrojati. Stanice se pomiješaju s bojom Trypan Blue koja daje obojenje mrtvih stanica, a miješaju se u omjeru 1:1. Žive stanice ostaju prozirne pa ih je moguće detektirati uz pomoć mikroskopa.

Nakon 24-satnog odmaka hranjivi se medij ukloni iz jažica. Tri jažice su kontrolne jažice i u njih se dodaje čisti medij. U preostale tri jažice dodaje se po 2 mL otopine inhibitora 5 koncentracije 5,5 $\mu\text{mol/L}$ za SK-OV-3 staničnu liniju, a 5,0 $\mu\text{mol/L}$ za OVCAR-3 liniju. Ta koncentracija je određena prethodno rađenim MTT testom. Otopine inhibitora pripreme se razrjeđivanjem s hranjivim medijem do postizanja ciljne koncentracije. Nakon toga se ploča vrati u inkubator gdje se drži 48 h. Stanice se zatim odvoje od podloge uz pomoć tripsina te se isperu fosfatnim puferom, zatim se centrifugiraju i resuspendiraju u 100 μL pufera za vezivanje.

Nakon toga se doda 5 μL Aneksin V-fluorescein izotiocijanata (FITC) i 10 μL propidij jodida (PI) (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit, BioLegend, San Diego, SAD). Aneksin V i propidij jodid su spojevi ključni za kasniju detekciju apoptotskih stanica. Naime, stanična membrana stanice sadrži lipide, među kojima se nalazi i fosfatidilserin (PS), i to na citoplazmatskoj strani membrane. Tijekom apoptoze stanična građa se mijenja te fosfatidilserin postaje izražen na vanjskoj strani membrane, što omogućava da se aneksin V veže za isti. Osim za apoptotske stanice, može se vezati i za stanice u nekrozi, obzirom da je integritet takvih stanica također narušen. Tu važnu ulogu ima PI koji ulazi u stanice i veže se na nukleinske kiseline u jezgri apoptotskih i nekrotičnih stanica. On nam omogućava razlikovanje živih stanica (dvostruko negativne), stanica u ranoj (aneksin-V+/PI-) i stanica u kasnoj (aneksin-V+/PI+) apoptozi (20, 21).

Nakon dodavanja navedenih spojeva, stanice se inkubiraju na sobnoj temperaturi, u mraku tijekom 15 min, a zatim se analiziraju protočnim citometrom (BD Accuri C6, BD Biosciences) kojim se bilježi fluorescencija obojenih uzoraka. Postotak stanica u apoptozi analizira se uz pomoć Flow Logic Softwarea-a, a izražava se kao broj pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica. Njihova vrijednost je postavljena kao 100% (22).

3.6 PROTOČNA CITOMETRIJA

Protočna citometrija je tehnika koja omogućuje više-parametarsku analizu svake pojedine stanice u otopini. Djeluje na način da laserske zrake određenih valnih duljina služe kao izvor svjetlosti, a pri tome se proizvedu fluorescentni i svjetlosni signali koje uočavaju detektori. Ti signali prevode se u elektroničke signale koji se zapažaju i bilježe pomoću računala. Metoda je vrlo moćna i široko primjenjivana u imunologiji, molekularnoj biologiji, bakteriologiji, virologiji, biologiji raka i praćenju zaraznih bolesti (23,24).

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 SK-OV-3

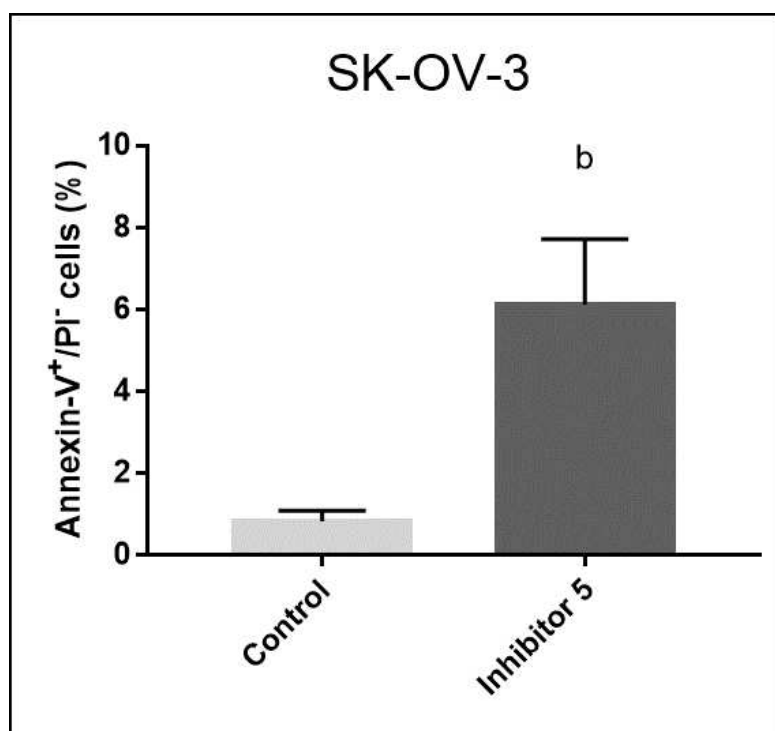
MTT testom utvrđena je koncentracija inhibitora 5 koja se pokazala najznačajnijom, a ona iznosi 5,5 $\mu\text{mol/L}$ za SK-OV-3 staničnu liniju. U tablici 3 zabilježene su vrijednosti IC50 koncentracija nakon 4, 24, 48 i 72 h, a IC50 vrijednost označava onu koncentraciju koja uzrokuje apoptozu 50% stanica tretiranih inhibitorom.

Tablica 3. IC50 vrijednosti inhibitora 5 za SK-OV-3 staničnu liniju ($\mu\text{mol/L}$)

4h	24h	48h	72h
ND	ND	5,464	1,501

ND, koncentraciju nije moguće odrediti

Postotak stanica stanične linije SK-OV-3 tretiranih inhibitorom 5 u ranoj apoptozi pokazao je statistički značajan porast u odnosu na netretirane stanice (s 0,83% na 6,12%), a podatci su vidljivi na slici 16 i u tablici 4.



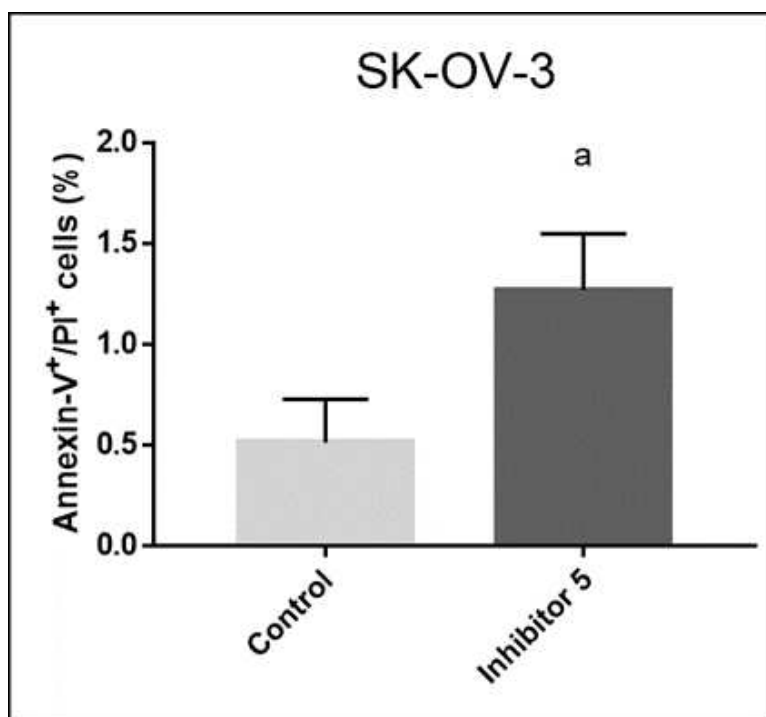
Slika 16. Grafički prikaz stanica stanične linije SK-OV-3 kontrolne skupine i skupine tretirane inhibitorom 5 u ranoj apoptozi.

b, *P*-vrijednost <0,01

Tablica 4. Statistički podatci za ranu apoptozu netretiranih i tretiranih stanica.

Značajnost	P-vrijednost	prosjek kontrolne stanice	prosjek tretirane stanice
Da	0,004810158	0,83	6,12

Postotak stanica stanične linije SK-OV-3 tretiranih inhibitorom 5 u kasnoj apoptozu pokazao je statistički značajan porast u odnosu na netretirane stanice (s 0,51% na 1,27%), a podatci su vidljivi na slici 17 i u tablici 5.



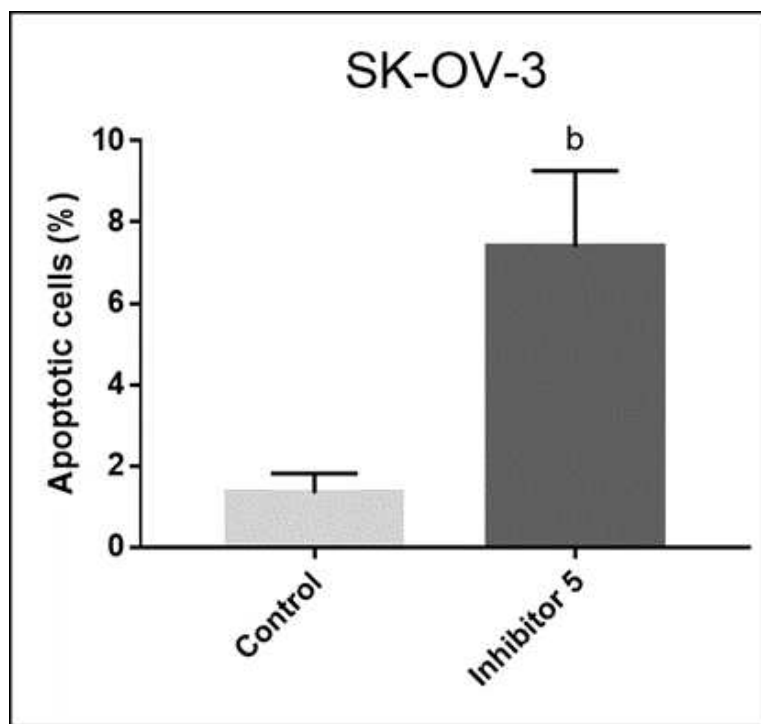
Slika 17. Grafički prikaz stanica stanične linije SK-OV-3 kontrolne skupine i skupine tretirane inhibitorom 5 u kasnoj apoptozu.

a, P-vrijednost <0,05

Tablica 5. Statistički podatci za kasnu apoptozu netretiranih i tretiranih stanica.

Značajnost	P-vrijednost	prosjek kontrolne stanice	prosjek tretirane stanice
Da	0,02031748	0,51	1,27

Postotak stanica stanične linije SK-OV-3 tretiranih inhibitorom 5 sveukupno u ranoj i kasnoj apoptozi također je pokazao statistički značajan porast u odnosu na netretirane stanice (s 1,34% na 7,39%), a podatci su vidljivi na slici 18 i u tablici 6.



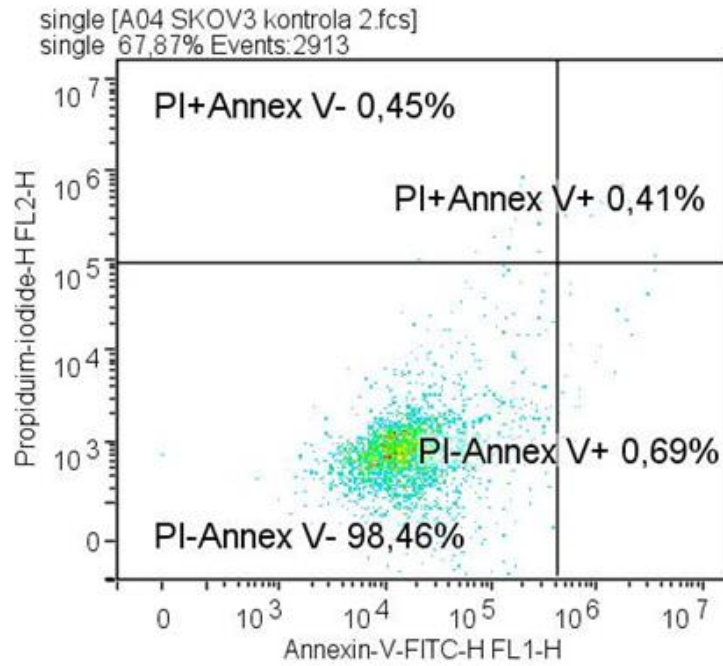
Slika 18. Grafički prikaz stanica stanične linije SK-OV-3 kontrolne skupine i skupine tretirane inhibitorom 5 u ranoj i kasnoj apoptozi.

b, *P*-vrijednost <0,01

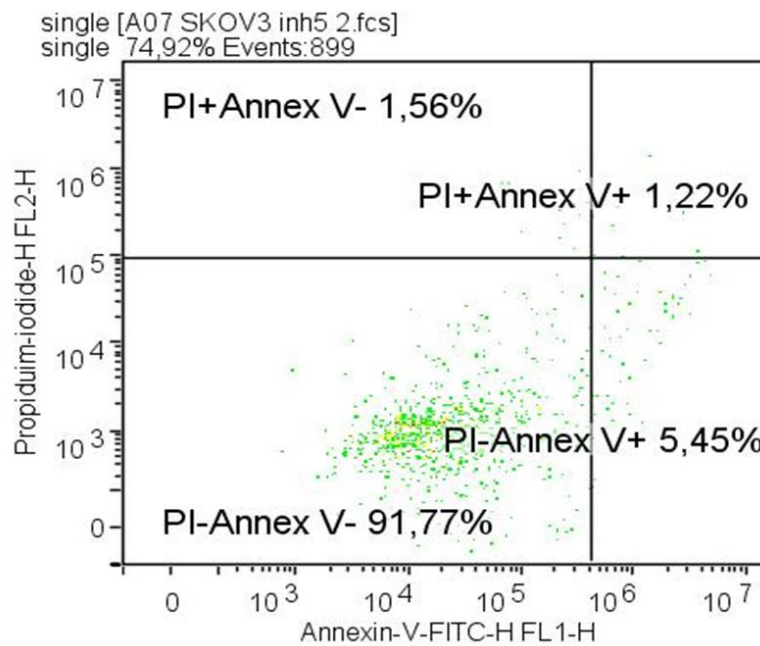
Tablica 6. Statistički podatci za ranu i kasnu apoptozu netretiranih i tretiranih stanica.

Značajnost	<i>P</i> -vrijednost	prosjek kontrolne stanice	prosjek tretirane stanice
Da	0,005599912	1,34	7,39

Protočnim citometrom dobiveni su točkasti dijagrami koji prikazuju subpopulacije stanica SK-OV-3 kontrole i stanica tretiranih inhibitorom 5 koje se nalaze u ranoj apoptozi, kasnoj apoptozi te one koje nisu u apoptozi od kojih je maleni dio u nekrozi (slika 19, slika 20).



Slika 19. Točkasti dijagram stanica kontrole, SK-OV-3.



Slika 20. Točkasti dijagram tretiranih stanica, SK-OV-3.

4.2 OVCAR-3

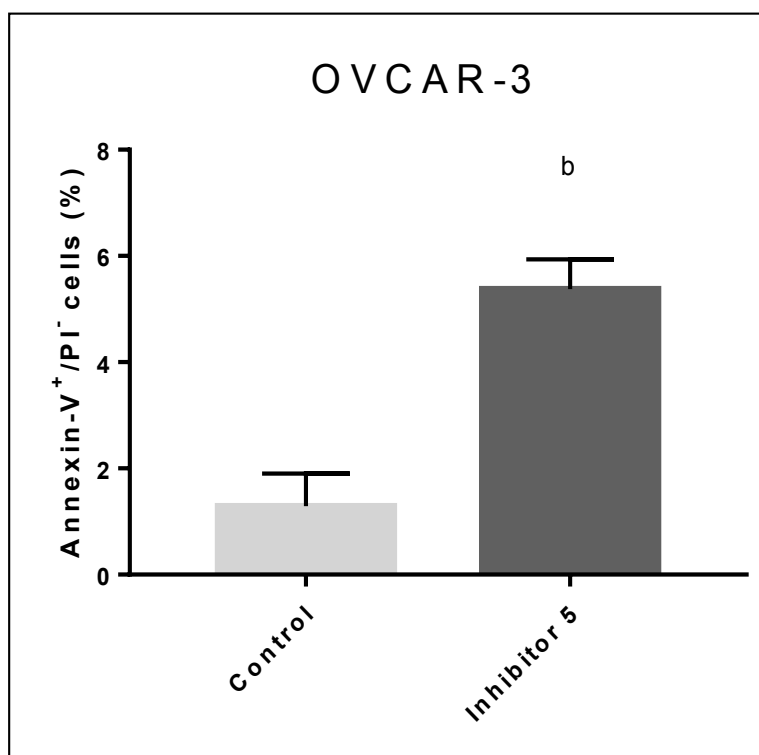
MTT testom utvrđena je koncentracija inhibitora 5 koja se pokazala najznačajnijom, a ona iznosi 5 $\mu\text{mol/L}$ za OVCAR-3 staničnu liniju. U tablici 7 zabilježene su vrijednosti IC50 koncentracija nakon 4, 24, 48 i 72 h, a IC50 vrijednost označava onu koncentraciju koja uzrokuje apoptozu 50% stanica tretiranih inhibitorom.

Tablica 7. IC50 vrijednosti inhibitora 5 za OVCAR-3 staničnu liniju ($\mu\text{mol/L}$).

4h	24h	48h	72h
ND	ND	4,958	2,473

ND, koncentraciju nije moguće odrediti

Postotak stanica stanične linije OVCAR-3 tretiranih inhibitorom 5 u ranoj apoptozi pokazao je statistički značajan porast u odnosu na netretirane stanice (s 1,29% na 5,37%), a podatci su vidljivi na slici 21 i u tablici 8.



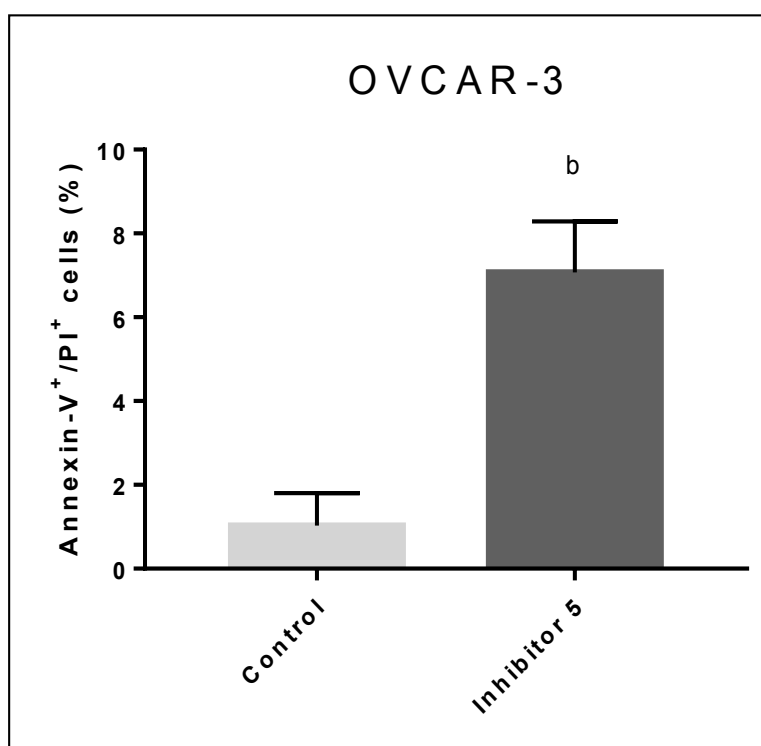
Slika 21. Grafički prikaz stanica stanične linije OVCAR-3 kontrolne skupine i skupine tretirane inhibitorom 5 u ranoj apoptozi.

b, *P*-vrijednost <0,01

Tablica 8. Statistički podatci za ranu apoptozu netretiranih i tretiranih stanica.

Značajnost	P-vrijednost	prosjek kontrolne stanice	prosjek tretirane stanice
Da	0,001049	1,29	5,37

Postotak stanica stanične linije OVCAR-3 tretiranih inhibitorom 5 u kasnoj apoptozi pokazao je statistički značajan porast u odnosu na netretirane stanice (s 1,03% na 7,08%), a podatci su vidljivi na slici 22 i u tablici 9.



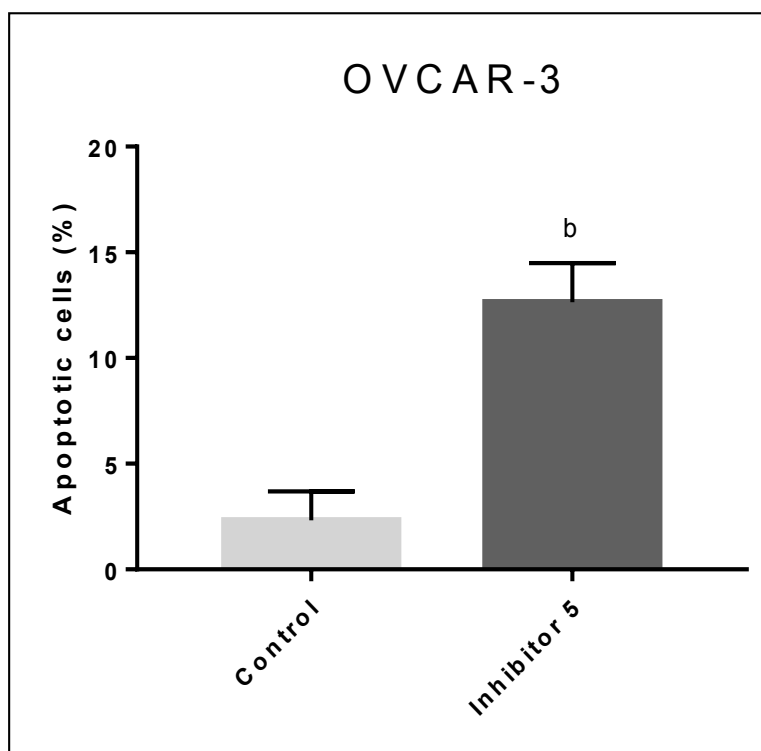
Slika 22. Grafički prikaz stanica stanične linije OVCAR-3 kontrolne skupine i skupine tretirane inhibitorom 5 u kasnoj apoptozi.

b, P-vrijednost <0,01

Tablica 9. Statistički podatci za kasnu apoptozu netretiranih i tretiranih stanica.

Značajnost	P-vrijednost	prosjek kontrolne stanice	prosjek tretirane stanice
Da	0,005857	1,03	7,08

Postotak stanica stanične linije OVCAR-3 tretiranih inhibitorom 5 sveukupno u ranoj i kasnoj apoptozi također je pokazao statistički značajan porast u odnosu na netretirane stanice (s 2,33% na 12,65%), a podatci su vidljivi na slici 23 i u tablici 10.



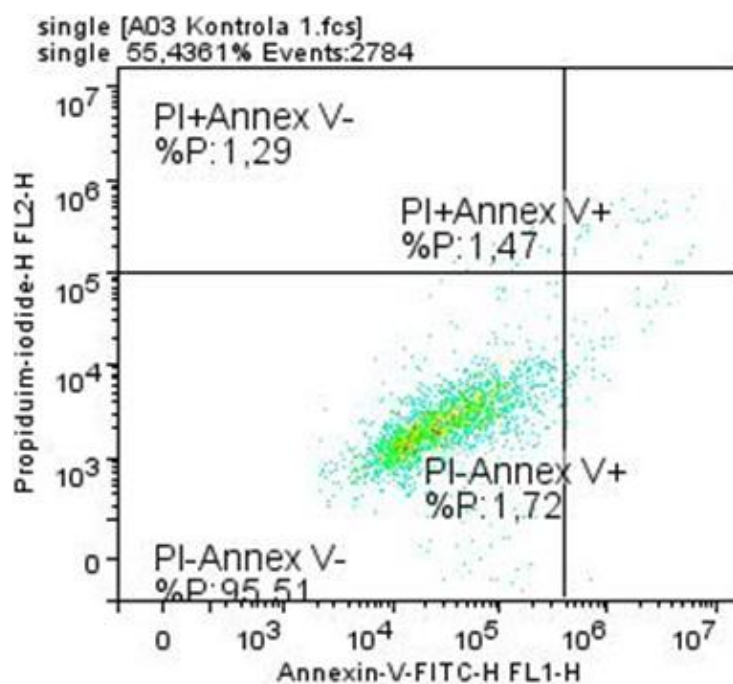
Slika 23. Grafički prikaz stanica stanične linije OVCAR-3 kontrolne skupine i skupine tretirane inhibitorom 5 u ranoj i kasnoj apoptozi.

b, *P*-vrijednost <0,01

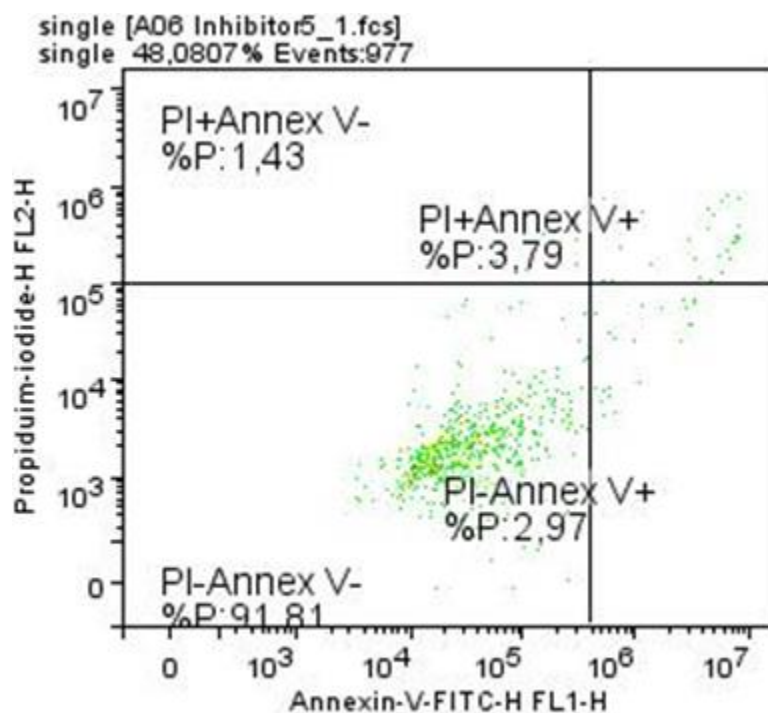
Tablica 10. Statistički podatci za ranu i kasnu apoptozu netretiranih i tretiranih stanica.

Značajnost	<i>P</i> -vrijednost	prosjek kontrolne stanice	prosjek tretirane stanice
Da	0,005197	2,33	12,65

Protočnim citometrom dobiveni su točkasti dijagrami koji prikazuju subpopulacije stanica OVCAR-3 kontrole i stanica tretiranih inhibitorom 5 koje se nalaze u ranoj apoptozi, kasnoj apoptozi te one koje nisu u apoptozi (slika 24, slika 25).



Slika 24. Točkasti dijagram stanica kontrole, OVCAR-3.



Slika 25. Točkasti dijagram tretiranih stanica, OVCAR-3.

5. RASPRAVA

Karcinomi čine vrlo heterogenu skupinu bolesti, ali karcinomske stanice posjeduju neka zajednička obilježja kao što su nekontroliran rast, neosjetljivost na brojne signale koji omogućuju ispravno funkcioniranje stanice, zaobilaženje programirane stanične smrti te sposobnost angiogeneze (1,2).

Spomenuta programirana stanična smrt, apoptoza, aktivan je proces koji uključuje brojne signale koje stanica prima putem svojih receptora, a nizvodno se signal širi sve do stanične jezgre. Ti su signali zaslužni za staničnu smrt odnosno preživljenje (7).

Tieno[2,3-*b*]piridini otkriveni su virtualnim probirom visoke propusnosti kao potencijalni inhibitori izoformi fosfolipaze C (PLC) i pokazali su snažne učinke inhibicije rasta različitih staničnih linija ljudskog karcinoma (14,15,16).

Članovi obitelji PLC sastoje se od više različitih enzima, a svaki od njih posreduje u staničnoj signalizaciji. Svaki član obitelji doprinosi jedinstvenim staničnim funkcijama (25). PLC pretvara fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (PIP(2)) u inozitol 1,4,5-trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG). DAG i IP3 kontroliraju različite stanične procese i važni su supstrati za sintezu drugih važnih signalnih molekula. Svaka PLC također odgovara na vlastiti spektar aktivatora koji uključuje heterotrimerne G proteinske podjedinice, proteinske tirozin kinaze, male G proteine, Ca²⁺ i fosfolipide (26).

Istraživanja su pokazala da derivat tieno[2,3-*b*]piridina stupa u interakciju s PLC izoformama (vjerojatno PLC- δ), koji zauzvrat utječe na staničnu dinamiku tubulina- β , izazivajući zaustavljanje staničnog ciklusa u G2-fazi. Autor je zaključio da su ovi spojevi novi zbog svoje PLC mete i da mogu biti korisni u kombinaciji s mitotičkim otrovima za liječenje karcinoma. Pokazano je da tienopiridinski derivat inhibira proliferaciju dvije trostruko negativne stanične linije raka dojke kod ljudi, kao i jednu od dvije stanične linije pozitivne na estrogenski receptor. Derivat uzrokuje morfološke promjene stanice uključujući stvaranje mjehurića na membrani, kao i induciranje zaustavljanja G2 faze. Čini se da rezultati isključuju oštećenje DNA, zaustavljanje mitoze i povećan protok iona kalcija kao mehanizme inhibicije rasta (16).

Cilj ovog istraživanja bio je saznati kako će novo-sintetizirani tienopiridinski derivat djelovati na stanične linije humanog karcinoma jajnika, i to SK-OV-3 liniju te OVCAR-3, i u kojoj mjeri će inducirati ranu i kasnu apoptozu. Za potrebe ovog istraživanja urađen je MTT test kako bi se odabrala najpovoljnija koncentracija otopine korištenog spoja (inhibitor 5), a ona iznosi 5,5 $\mu\text{mol/L}$ za SK-OV-3 staničnu liniju te 5,0 $\mu\text{mol/L}$ za OVCAR-3 staničnu liniju. Zatim

je rađen test apoptoze na objema staničnim linijama. Rezultati pokazuju da postoji statistički značajan porast apoptoze kod tretiranih stanica u odnosu na netretirane stanice za obje stanične linije u ranoj i u kasnoj apoptozi.

Ovakvi rezultati istraživanja dokaz su da je ovaj spoj potencijalno važan za daljnje istraživanje u smjeru potencijalnog uključivanja u liječenje karcinoma jajnika te karcinoma općenito.

Ono što ide u prilog toj tvrdnji su i druga spomenuta provedena istraživanja utjecaja tienopiridinskih derivata na karcinome različitih organa.

Glavna hipoteza je potvrđena i cilj istraživanja je ostvaren. Potrebno je provesti dodatna *in vitro* i *in vivo* istraživanja koja bi pokazala pozitivne učinke, kako bi se tienopiridinski derivati uvrstili u načine liječenja različitih bolesti i karcinoma.

6. ZAKLJUČCI

1. *In vitro* izlaganje stanica staničnih linija humanog karcinoma jajnika SK-OV-3 i OVCAR-3 novo-sintetiziranom inhibitoru 5 dovodi do pojačane indukcije programirane stanične smrti ispitivanih stanica.
2. Postotak stanica stanične linije SK-OV-3 u ranoj apoptozi je statistički značajno veći za tretirane stanice u odnosu na netretirane stanice.
3. Postotak stanica stanične linije SK-OV-3 u kasnoj apoptozi je statistički značajno veći za tretirane stanice u odnosu na netretirane.
4. Postotak stanica stanične linije SK-OV-3 u ranoj i kasnoj apoptozi ukupno je statistički značajno veći za tretirane stanice u odnosu na netretirane.
5. Postotak stanica stanične linije OVCAR-3 u ranoj apoptozi je statistički značajno veći za tretirane stanice u odnosu na netretirane stanice.
6. Postotak stanica stanične linije OVCAR-3 u kasnoj apoptozi je statistički značajno veći za tretirane stanice u odnosu na netretirane.
7. Postotak stanica stanične linije OVCAR-3 u ranoj i kasnoj apoptozi ukupno je statistički značajno veći za tretirane stanice u odnosu na netretirane.

7. LITERATURA

1. Geofrey M. Cooper, R.E.Hausman; Rak. In: Gordan Lauc, editor. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp.726-729.
2. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Biologija raka U: Raić A.,ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp.3-4.
3. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Biologija raka U: Raić A.,ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp.4-8.
4. Geofrey M. Cooper, R.E.Hausman; Rak. In: Gordan Lauc, editor. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp.752-756.
5. Geofrey M. Cooper, R.E.Hausman; Rak. In: Gordan Lauc, editor. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp.756-759.
6. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Biologija raka U: Raić A.,ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp.8-10.
7. Geofrey M. Cooper, R.E.Hausman; Stanična smrt i stanična obnova. In: Gordan Lauc,editor. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp.693-705.
8. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Tumori ženskog spolnog sustava U: Raić A.,ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp.185-188.
9. Ivan Damjanov, Sven Seiwerth, Stanko Jukić i Marin Nola; Patologija peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018., pp.619-632
10. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Svjetski dan borbe protiv raka jajnika [Internet]. (citirano 14.9.2022.) Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevenција-nezaraznih-bolesti/svjetski-dan-borbe-protiv-raka-jajnika-2/>
11. Eltabbakh GH, Yadav PR, Morgan A. Clinical picture of women with early stage ovarian cancer. Gynecol Oncol. 1999 Dec;75(3):476-9.
12. MSD priručnik dijagnostike i terapije. Rak jajnika [Internet]. (citirano 13.9.2022.) Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/ginekologija/ginekoloski-tumori/rak-jajnika>
13. Hrvatsko društvo za ginekologiju i opstetriciju. Kliničke upute za dijagnostiku, liječenje i praćenje bolesnica oboljelih od raka jajnika [Internet]. (citirano 13.9.2022.) <https://www.hdgo.hr/userFiles/upload/documents/HDGO%20smjernice/ONK/HDGO-S1-Onkologija-Ovarij.pdf>

14. Marijan S, Mastelić A, Markotić A, Režić-Mužinić N, Vučenović N, Barker D. i sur. Thieno[2,3-b]Pyridine Derivative Targets Epithelial, Mesenchymal and Hybrid CD15s+ Breast Cancer Cells. *Medicines (Basel)*. 2021 Jun 22;8(7):32.
15. 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 Mar 14;11:759-769.
16. Reynisson J, Jaiswal JK, Barker D, D'mello SA, Denny WA, Baguley BC i sur. Evidence that phospholipase C is involved in the antitumour action of NSC768313, a new thieno[2,3-b]pyridine derivative. *Cancer Cell Int*. 2016 Mar 10;16:18.
17. Leung EH, J. M.; Barker, D.; Reynisson, J. The effect of a thieno[2,3-b]pyridine PLC- γ inhibitor on the proliferation, morphology, migration and cell cycle of breast cancer cells. *Med Chem Commun*. 2014.;5(99):8
18. Krauze A, Grinberga S, Krasnova L, Adlere I, Sokolova E, Domracheva I i sur. Thieno[2,3-b]pyridines--a new class of multidrug resistance (MDR) modulators. *Bioorg Med Chem*. 2014 Nov 1;22(21):5860-70.
19. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018 Apr;120(3):159-167.
20. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*. 2011 Apr 24;(50):2597.
21. 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 Nov 1;2016(11).
22. BD Pharmingen. Technical Data Sheet. BD Pharmingen; p. 1–3.
23. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018 Feb 21;120:5.1.1-5.1.11
24. Shapiro HM, Telford WG. Lasers for Flow Cytometry: Current and Future Trends. *Curr Protoc Cytom*. 2018 Jan 18;83:1.9.1-1.9.21
25. Vines CM. Phospholipase C. *Adv Exp Med Biol*. 2012;740:235-54.
26. Kadamur G, Ross EM. Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:127-54.

8. SAŽETAK

Cilj: Cilj ovog istraživanja jest dokazati djelovanje sintetski dobivenog inhibitora iz skupine tieno[2,3-*b*]piridina na apoptozu stanica staničnih linija SK-OV-3 i OVCAR-3 humanog karcinoma jajnika. Pretpostavljeno 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 metode određena je optimalna koncentracija inhibitora kojom su tretirane stanice staničnih linija SK-OV-3 i OVCAR-3 humanog karcinoma jajnika tijekom 48 sati. Dodatkom aneksina V i propidij jodida stanice su analizirane protočnim citometrom kojim se dobije postotak stanica u ranoj i kasnoj apoptozi kod tretiranih i netretiranih stanica raka, a dobije se i grafički prikaz stanica.

Rezultati: Prikazani su kao postotak rane i kasne apoptoze i preživjelih stanica. Djelovanjem inhibitora ostvaren je statistički značajan porast apoptotskih stanica stanične linije SK-OV-3 u ranoj, kasnoj te ranoj i kasnoj apoptozi ukupno u odnosu na netretirane stanice. Slični rezultati zabilježeni su i za staničnu liniju OVCAR-3, gdje se također bilježi statistički značajan porast apoptotskih stanica u odnosu na netretirane stanice.

Zaključci: Novo-sintetizirani tieno[2,3-*b*]piridinski spoj doveo je do statistički značajnog porasta postotka stanica u ranoj, kasnoj te ranoj i kasnoj apoptozi ukupno u odnosu na netretirane stanice. Ovakvi rezultati nisu zanemarivi, a spoj je potencijalno važan za razmatranje i daljnje istraživanje u području liječenja karcinoma.

9.SUMMARY

Diploma thesis title: APOPTOTIC EFFECT OF THIENOPYRIDINE DERIVATIVE ON HUMAN OVARIAN CARCINOMA CELLS

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 SK-OV-3 and OVCAR-3 cell lines of human ovarian cancer. 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 together will increase.

Materials and methods: Using MTT method, optimal concentration of inhibitor was determined with whom ovarian cancer cells of SK-OV-3 and OVCAR-3 cell lines were treated for 48 h. After adding annexin V and propidium iodide, the cells were analyzed by flow cytometer to obtain the percentage of cells in early, late and early and late apoptosis in total in treated and untreated cancer cells, and a graphical representation of the cells is also obtained.

Results: They are represented as the percentage of early and late apoptosis and surviving cells. The effect of inhibitor resulted in a statistically significant increase in apoptotic cells of the SK-OV-3 cell line in early, late and early and late apoptosis in total compared to untreated cells. Similar results were recorded for the OVCAR-3 cell line, where a statistically significant increase in apoptotic cells was also recorded compared to untreated cells.

Conclusions: The treatment of ovarian cancer cells with newly synthesized thieno[2,3-*b*]pyridine led to a statistically significant increase in the percentage of cells in early, late and early and late apoptosis in total compared to untreated cells. These results are not negligible, and the compound is potentially important for the further investigation in the cancer therapy field.

10. ŽIVOTOPIS

Osnovni podaci:

Ime i prezime: Lara Karanušić

Datum rođenja: 20.11.1998.

Mjesto rođenja: Split 21000, Republika Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

e-adresa: skaranusic@hotmail.com

Obrazovanje:

2017. - 2022. Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija

2013. - 2017. V.gimnazija "Vladimir Nazor", Split

2005. – 2013. Osnovna Škola Sućidar, Split

Radno iskustvo:

lipanj 2016. – rujan 2016. / lipanj 2017.- rujan 2017. –sezonski rad, obrt za ugostiteljstvo
Mustačo, Hvar, Pokonji dol 2

studeni 2018.-siječanj 2020.- promoviranje kozmetičkih proizvoda i savjetovanje pacijenata unutar ljekarni u Splitu i okolici, Mediforma d.o.o.

svibanj 2021.-travanj 2022. Ispomoć u proizvodnji u Galenskom laboratoriju Ljekarni Splitsko-dalmatinske županije

veljača 2022. – rujan 2022. Stručno osposobljavanje u Ljekarni Splitsko-dalmatinske županije, Ljekarna „Brda“, te u Galenskom i Analitičkom laboratoriju Ljekarni Splitsko-dalmatinske županije.

Znanja i vještine:

- Engleski jezik
- Talijanski jezik
- Španjolski jezik
- Rad u programima Microsoft Office i Esculap 2000
- Vozačka dozvola B kategorija

Ostale aktivnosti:

-članica Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske, CPSA

-volonter na Humanitarnoj božićnoj fritulijadi 2021.

-osvojeno 5.mjesto na državnom Natjecanju iz talijanskog jezika