

Izražaj glikosfingolipida na stanicama karcinoma dojke nakon tretmana tienopiridinskim spojem

Pervan, Matij

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:171:582006>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-28**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Matij Pervan

**IZRAŽAJ GLIKOSFINGOLIPIDA NA STANICAMA KARCINOMA DOJKE NAKON
TRETMANA TIENOPIRIDINSKIM SPOJEM**

Diplomski rad

Akadska godina:

2023./2024.

Naslovna doc. dr. sc. Sandra Marijan

Split, rujan 2024.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Rak.....	2
1.2. Karcinom dojke	2
1.2.1. Podjela karcinoma dojke	3
1.2.2. Trostruko negativni karcinom dojke	4
1.2.3. Liječenje trostruko negativnog karcinoma	5
1.3. Matične stanice karcinoma	5
1.4. Stanične linije MDA-MB-231 i MCF-7.....	6
1.5. Glikosfingolipidi	7
1.6. Fosfolipaza kao meta antitumorske terapije	7
1.7. Tienopiridinski spojevi	8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	1
2.1. Cilj istraživanja	11
2.2. Hipoteze	11
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Spoj 1	13
3.2. Stanične linije	13
3.3. Vijabilnost stanica	13
3.4. Protočna citometrija	13
3.5 Statističke operacije	15
4. REZULTATI	13
4.1. Mjerenje citotoksične aktivnosti	16
4.2. Apoptoza	16
4.3. Matičnost stanica.....	17
4.4 Izražaj terminalno sijlaiziranih glikozida	18
4.5. Izražaj gangliozida i neutralnih glikosfingolipida s terminalnim GalNAc ostatkom na matičnim i ne-matičnim stanicama.....	21
5. RASPRAVA	16

6. ZAKLJUČCI	23
7. LITERATURA	24
8. SAŽETAK	28
9. SUMMARY	34

ZAHVALE

Hvala mojoj mentorici, doc. Sandri Marijan, na njenoj kontinuiranoj podršci i nesebičnoj pomoći proteklih godina studiranja.

Hvala prof. Vedrani Čikeš Čulić koja je u meni probudila ljubav prema znanosti i omogućila mi da se priključim njenom laboratoriju i napravim svoje prve korake u znanstvenim istraživanjima.

Hvala doc. Benzoni što nije, bio samo profesor i znanstvenik, nego i učitelj koji je svoje znanje radosno i strpljivo dijelio sa mnom.

Hvala prof. Radan i prof. Markotić na njihovoj podršci i pomoći u mom istraživanju.

Hvala kolegama iz IFMSA i CroMSIC-a što su me naučili da je medicina više od stetoscopa i bijele kute, a i da je svijet mnogo manji nego što sam mislio.

Hvala mojoj obitelji na njihovoj ljubavi, podršci, strpljenju i stanu.

Hvala prijateljima na cinizmu, smijehu, dobrim vremenima i svim delulu utjehama, bez vas sigurno ne bih preživio ovih šest godina.

POPIS KRATICA

HDI – engl. *Human development indeks*

ER – estrogenski receptor

PR – progesteronski receptor

HER2 – receptor za epidermalni čimbenik rasta

TNBC – engl. *Triple negative breast cancer*

TNM – engl. *Tumor, node, metastasis*

CSC – engl. *Cancer stem cells*

ne-CSC – engl. *Non – Cancer stem cells*

BCSC – engl. *Breast cancer stem cells*

PLC – engl. *Phospholipase c*

ALDH1 – aldehyd dehidrogenaza 1

IC₅₀ – engl. *Inhibitory concentration for 50%*

PCA – engl. *Principal component analysis*

1. UVOD

1.1. Rak

Rak je nakupina zloćudnih stanica koje su nastale iz zdravih u procesu koji nazivamo zloćudnom pretvorbom. Zloćudne stanice gube sposobnost odgovora na signale kojim organizam regulira normalne stanice, što rezultira nekontroliranom diobom zloćudnih stanica i rastom raka. Rak koji nastaje iz epitelnih stanica naziva se karcinom. Karcinom je vodeći uzrok mortaliteta i značajan uzrok morbiditeta u svijetu (1).

1.2. Karcinom dojke

Karcinom dojke drugi je najčešći tumor u čovjeka, a prvi u žena. Pacijentice s karcinomom dojke čine ¼ pacijentica oboljelih od tumora. Karcinom dojke odgovoran je za 15% smrti od raka (1). Prema podacima Svjetske Zdravstvene Organizacije 2.3 milijuna žena bilo je dijagnosticirano s karcinomom dojke u 2022., dok je iste godine karcinom dojke bio odgovoran za smrt 670 000 žena. Podaci otkrivaju značajne nejednakosti u morbiditetu i mortalitetu uzrokovanih karcinomom dojke u odnosu na index razvijenosti (engl. *Human Development Index*, HDI) te je u slabije razvijenim zemljama ovaj karcinom rjeđi, uz značajno veću relativnu smrtnost (2). U Hrvatskoj je u 2021. godini kod 2928 žena i 40 muškaraca dijagnosticiran karcinom dojke, a od istog je umrlo 711 žena (3). Čimbenici rizika za razvoj karcinoma dojke su starija životna dob, pozitivna obiteljska anamneza, starija dob pri prvom porođaju, nuliparitet, rana menarha, kasna menopauza, zračenje, debljina, terapija oralnim kontraceptivima te dijagnoza dobroćudnih parenhimatoznih bolesti dojke (1).

1.2.1. Podjela karcinoma dojke

Karcinom dojke uvriježeno se dijeli na podtipove prema imunohistokemijskom izražaju hormonskih receptora: pozitivan na estrogenske receptore (ER⁺), pozitivan na progesteronske receptore (PR⁺), pozitivan na receptor za humani epidermalni faktor rasta (HER2⁺) i trostruko negativan (engl. *Triple Negative Breast Cancer*, TNBC) (Tablica 1) (4).

Visoki izražaj estrogenskih receptora odlika je 70-75% invazivnih karcinoma dojke, od kojih je u 50% izražen i progesteronski receptor. Progesteronski receptor rijetko je izražen u ER negativnim karcinomima. Molekularna klasifikacija omogućuje kategorizaciju pacijenata i predviđanje odgovora na ciljanu terapiju (4).

Tablica 1. Klasifikacija karcinoma, prema Orrantia-Borunda i sur.,

	Luminalni A	Luminalni B	HER2⁺	TNBC
Učestalost (%)	50	15	20	15
ER	Da	Da	Ponekad	Ne
PR	Da	Ponekad	Ponekad	Ne
HER2⁺	Ne	Ne	Da	Ne
Mutacije	Ne	BRCA2	p53	p53 i BRCA1
Prognoza	Dobra	Srednje dobra	Srednje dobra / loša	Loša
Terapija	Hormonalna	Hormonalna / Kemoterapija	Hormonalna / Kemoterapija / Herceptin	Kemoterapija / Eksperimentalna terapija

Prevedeno i prilagođeno prema Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, Gomez-Valles FO, Ramirez-Valdespino CA. Subtypes of Breast Cancer. *Breast Cancer*. 2022;10.36255 (4)

1.2.2. Trostruko negativni karcinom dojke

Trostruko negativni karcinom dojke (TNBC) karakteriziran je odsutnošću izražaja receptora za estrogen, progesteron i humani epidermalni čimbenik rasta te je najagresivniji fenotipski podtip karcinoma dojke s najlošijom prognozom. Patološka obilježja tumora uključuju veću masu tumora, veći gradus i viši proliferacijski indeks u odnosu na ostale fenotipove. Ovisno o inicijalnom odgovoru na kemoterapiju, kod jedne od tri pacijentice s ovim tipom tumora doći će do povratka bolesti, najčešće unutar tri godine od početne dijagnoze (5). Dodatan razlog za slabije preživljenje i lošije ishode liječenja TNBC-a u odnosu na ostale podtipove leži u manjku učinkovitosti terapije koje se koriste za liječenje ER⁺/PR⁺ i HER⁺ karcinomskih podtipova (Tablica 2) (6). Zbog malog ili nikakvog izražaja ER, PR i HER2 receptora, endokrina terapija poput selektivnih modulatora estrogenskih receptora (SERMs) i aromataznih inhibitora, ili anti-HER2 ciljanih monoklonskih protutijela su neučinkovite u liječenju TNBC-a (7). Kao rezultat, citotoksična kemoterapija ostaje glavno oružje u liječenju trostruko negativnog karcinoma dojke (8,9).

Tablica 2. Petogodišnje preživljenje pacijenata s karcinomom dojke po stadiju proširenosti bolesti,

SEER Stadij	Lokalni	Regionalni	Udaljeni	Svi tipovi kombinirano
Petogodišnje preživljenje (%)	91%	66%	12%	77%

Prevedeno i prilagođeno prema American Cancer Society. Treatment of Triple-negative Breast Cancer [Internet]. SAD: American Cancer Society; 2024. Treatment of triple negative breast cancer [citirano 5. rujna 2024]. Dostupno na: www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment/treatment-of-triple-negative.html (10).

1.2.3. Liječenje trostruko negativnog karcinoma

Liječenje trostruko negativnog karcinoma dojke prema smjernicama Američkog udruženja za rak obuhvaća operaciju i adjuvantnu kemoterapiju ili neoadjuvantnu kemoterapiju praćenu operacijom za stadije I-III, dok za stadij IV podrazumijeva kemoterapiju, a radijacijska i kirurška terapija mogu biti indicirane samo u nekim slučajevima (10). U donošenju odluke o liječenju ordinarijus se služi kliničko-patološkim parametrima kao što su dob, TNM klasifikacija (engl. *tumor, node, metastasis*) stadij, gradus, histologija i molekularni profil tumora (11).

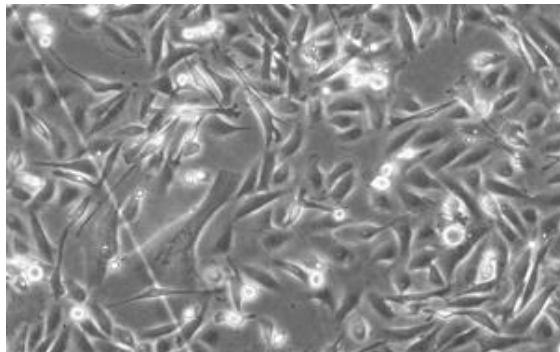
1.3. Matične stanice karcinoma

Matične stanice karcinoma (engl. *Cancer Stem Cells, CSC*) naziv je za subpopulaciju stanica karcinoma koja ima sposobnost samoobnavljanja, proliferacije i diferencijacije u fenotipski različite stanice, svojstva poput onih koja posjeduju i zdrave matične stanice. Postojanje matičnih stanica raka značajno je jer predstavlja paradigmu za razumijevanje intratumorske heterogenosti (12). Istraživanja intratumorske heterogenosti dovela su i do uvođenja koncepta evolucijskog usmjeravanja (engl. *Evolutionary steering*) koji koristi heterogenost i poznavanje međupopulacijskih interakcija u odabiru adekvatne antitumorske terapije (13). Kao odgovor na okolišni podražaj, kada se ne-matične stanice karcinoma dojke eliminiraju uslijed radio- ili kemoterapije, matične stanice karcinoma dojke (engl. *breast cancer stem cells, BCSC*) preživljavaju oksidativni stres i oštećenje DNK jer mogu biti u mirovanju i imaju pojačanu mogućnost popravka DNK te efluksa lijeka (14).

Najvažniji biljezi u detekciji BCSC su CD44, CD133, CD24, i aldehyd dehidrogenaza (ALDH1) (15). Uzevši u obzir fenotipsku heterogenost karcinoma dojke, nemoguće je odrediti jedan biljeg koji bi bio indikator matičnosti i služio za identifikaciju BCSC. Prisutnost ovih biljega na stanicama karcinoma povezana s lošijom prognozom i većom agresivnošću tumora (16).

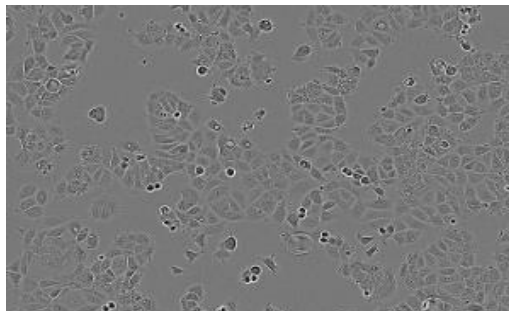
1.4. Stanične linije MDA-MB-231 i MCF-7

Stanična linija MDA-MB-231 (Slika 1), izolirana u MD Anderson centru za rak (Texas, SAD) iz metastatskog pleuralnog izljeva pacijentice s trostruko negativnim adenokarcinomom (17). Ovu liniju karakterizira visoka agresivnost, slaba diferenciranost i manjak ekspresije estrogenskih (ER), progesteronskih (PR) kao i receptora za epidermalni faktor rasta (HER2) (18).



Slika 1. Stanična linija MDA-MB-231. Preuzeto s Culture Collections. MDA-MB-231. London: Culture Collections; 2021. [citirano 10. rujna 2024.]. Dostupno na <https://www.culturecollections.org.uk/products/cell-cultures/ecacc-cell-line-profiles/mda-mb-231/> (18)

Stanična linija MCF-7 (Slika 2) također je izolirana iz pleuralnog izljeva pacijentice s metastatskim adenokarcinomom dojke. Za razliku od MDA-MB-231 stanične linije, ova linija izražava nekoliko karakteristika diferenciranog epitela dojke, kao i mogućnost vezanja estradiola putem estrogenskih receptora (ER⁺). Osim toga, ova stanična linija posjeduje i receptore za progesteron (PR⁺) i obilježena je visokom intratumorskom heterogenošću (19).



Slika 2. Stanice stanične linije MCF-7 48h nakon nasađivanja. Preuzeto s Culture Collections. Culture Collections. London: Culture Collections; 2021. MCF – 7 [citirano 10. rujna 2024].

Dostupno na <https://www.culturecollections.org.uk/products/cell-cultures/ecacc-cell-line-profiles/mcf7/> (19).

1.5. Glikosfingolipidi

Glikosfingolipidi su lipidi koji sadržavaju šećere s ceramidnom okosnicom (20). Ovisno o glikozidnim ostacima, razlikujemo neutralne glikosfingolipide, ganglioziide i sulfatide (21). Glikosfingolipidi igraju važnu ulogu u građi stanične membrane, građeni su od hidrofobnog dijela – ceramida i hidrofilnog dijela – ugljikohidratnih ostataka. Struktura ugljikohidratnih ostataka odlikuje se velikom raznolikošću (22).

Spajanjem sijalinske kiseline i neutralnih glikosfingolipida nastaju ganglioziidi koji su karakterizirani najvećom heterogenošću i složenosti u molekularnoj građi. U njihovoj sintezi sudjeluju enzimi sijalitransferaza i glikoziltransferaza (23). Ganglioziidi igraju ulogu u tumorigenezi te se neki od njih mogu nalaziti na tumorskom, i biti odsutni na zdravom tkivu (24).

1.6. Fosfolipaza kao meta antitumorske terapije

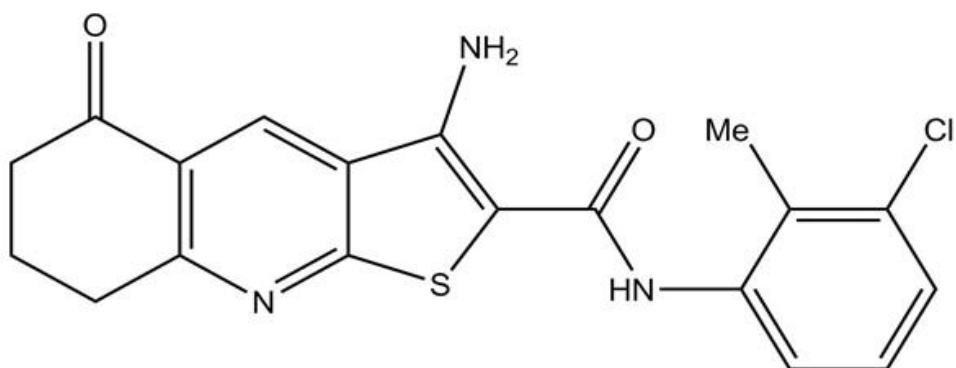
Fosfoinozitol specifična fosfolipaza membranski je protein koji hidrolizira fosfatidilinozitol-4,5-difosfat (engl. *Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate*, PIP2) u diacilglicerol i inozitol-1,4,5-trifosfat. Diacilglicerol zatim aktivira serin/treonin kinazu, protein ovisan o fosfolipidu, i protein kinazu C. Inozitol-1,4,5-trifosfat potiče otpuštanje kalcija iz unutarstaničnih rezervi. Zajednički, ovi drugi glasnici moderiraju pokretljivost stanica i proliferaciju (25).

Pokretljivost tumorskih stanica ključna je komponenta invazije i diseminacije, te veliki uzrok morbiditeta i mortaliteta uzrokovanih tumorima. Smatra se da je signalni put za staničnu pokretljivost od velike važnosti u progresiji tumora što ga čini potencijalnom metom za terapiju (26).

Fosfolipaza gama (engl. *Phospholipase C*, PLC-gama) uključena je u dva procesa: pokretljivost induciranu faktorom rasta i staničnu adheziju, oba ključna u razvoju tumora (25).

1.7. Tienopiridinski spojevi

Spoj (3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b]kinolin-2-karboksamid (u daljnjem tekstu Spoj **1**, Slika 4) pripada obitelji tienopiridinskih spojeva. Godine 2009. Reynisson i suradnici su, poznavajući kristalnu strukturu mjesta za vezanje na PLC-gama, pomoću virtualnog probira, identificirali obitelj molekula tienopiridinskih spojeva za kojih se vjerovalo da bi mogli biti pogodni za daljnja istraživanja u terapiji karcinoma zbog njihove potencijalne sposobnosti inhibiranja aktivnosti PLC-gama (27). Spojevi iz skupine tienopiridina testirani su na 60 staničnih linija te je dokazano da djeluju antiproliferativno na stanice staničnih linija melanoma, karcinoma dojke, nesitnostaničnog karcinoma pluća i raka središnjeg živčanog sustava (28). Inhibicija rasta stanica u staničnim linijama TNBC-a postignuta je u nanomolarnim koncentracijama (29).



Slika 4. 3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b]kinolin-2-karboksamid

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti učinak spoja (3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b]kinolin-2-karboksamida na vijabilnost i apoptozu, te izražaj glikosfingolipida na matičnim i ne-matičnim tumorskim stanicama staničnih linija MDA-MB-231 i MCF-7.

Nakon primjene Spoja **1** na staničnim linijama MDA-MB-231 i MCF-7 odrediti:

1. Vijabilnost stanica karcinoma dojke
2. Apoptozu stanica karcinoma dojke
3. Izražaj terminalno sijaliniziranih gangliozida na matičnim i ne-matičnim stanicama
4. Izražaj gangliozida i neutralnih glikosfingolipida s terminalnim GalNAc ostatkom na matičnim i ne-matičnim stanicama
5. Izražaj neutralnog glikosfingolipida s terminalnim Gal ostatkom (nLc4Cer) na matičnim i ne-matičnim stanicama
6. Izražaj glikosfingolipida na netretiranim matičnim i ne-matičnim stanicama staničnih linija MDA-MB-231 i MCF-7

2.2. Hipoteze

Primijenjene koncentracije Spoja **1** će:

1. smanjiti vijabilnost stanica,
2. inducirati apoptozu,
3. smanjiti postotak matičnih stanica,
4. promijeniti glikofenotip u smjeru subpopulacije ne-matičnih stanica.

3. MATERIЈALI I METODE

3.1. Spoj 1

(3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b]kinolin-2 karboksamid (Spoj 1) pripremljen je otapanjem u dimetil sulfoksidu (DMSO) prije razrjeđenja u puferu.

3.2. Stanične linije

Stanice linija MDA-MB-231 i MCF-7 su uzgojene u inkubatoru na 37°C uz dodatak 5% CO₂, u hranjivom mediju DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, SigmaAldrich, Steinheim, Njemačka) s dodatkom 10 %-tnog goveđeg seruma (engl. *Fetal bovine serum*, FBS, EuroClone, Milano, Italija) i 1 % antibiotika (penicilin/streptomycin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka).

3.3. Vijabilnost stanica

Za procjenu vijabilnosti stanica korišten je MTT test (30). MTT reagens (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazol bromid) se reducira u metabolički aktivnim stanicama te se stvara ljubičasto-plavi spoj formazan koji nije topiv u vodi (31). Kromogena priroda ove redoks reakcije bila je osnova za razvoj ove kolorimetrijske metode Mosmanu i sur 1983 (32).

Jednaki broj stanica nasijan je u triplikatu, a nakon prekonoćne inkubacije na 37°C, stanice su tretirane sa Spojem 1 u koncentracijama: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 i 25 µM, opet u triplikatu, tijekom 24, 48 i 72 sata. Nakon tretmana, stanice su tretirane s MTT reagensom u mediju, u trajanju od 2 sata, nakon čega je medij ispran, a dodan DMSO. Apsorbancija je mjerena na valnoj duljini od 570 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Biosan, Schaffhausen, Švicarska).

3.4. Protočna citometrija

Osnovni dijelovi protočnog citometra su izvor svjetla, optički aparat za usmjeravanje i kontroliranje tog istog svjetla, protočnu liniju i kontrole za reguliranje protoka i njegovo usmjeravanje kroz fokusiranu zraku svjetla, elektronsku mrežu za sakupljanje i bilježenje intenziteta svjetla te računalo koje analizira ove signale. Napredak u tehnologiji antitijela i

moćnost njihovog obilježavanja s fluorescentnim biljezima omogućio je primjenu ove tehnologije u prepoznavanju i obilježavanju raznih biljega. Antitijela su direktno ili indirektno obilježena fluorescentnim biljezima, što omogućava identifikaciju stanica putem specifičnih antigenskih biljega na njihovoj površini (33).



Slika 3. Protočni citometar. Preuzeto s BDBiosciences. Products [Internet]. New Jersey: BDBiosciences; 2024. BD Accuri C6 Plus [citirano 10. rujna 2024.]. Dostupno na <https://www.bdbiosciences.com/en-us/products/instruments/flow-cytometers/research-cell-analyzers/bd-accuri-c6-plus> (34.)

Jednak broj stanica nasaden je u mikrotitarsku pločicu sa 6 jažica i tretiran s 2 μL Spoja **1**, nakon čega je analiziran izražaj glikosfinglolipida. Stanice su tripsinizirane, sakupljene, dvaput isprane fosfatnim puferom (engl. *Phosphate buffer saline*, PBS), resuspendirane u 100 μL pufera za vezivanje koji je sadržavao 5 μL Annexin-V-FITC i 5 μL propidij jodida (engl. *Propidium iodide*, PI) (Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), inkubirane na sobnoj temperaturi kroz 15 minuta u mraku nakon čega su analizirane na protočnom citometru (BD Accuri C6, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Obje stanične linije, kao i kontrole tretirane Spojem **1** kroz 48 sati, obilježene anti-CD44-fluorescein izotiocijanatom (FITC, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), anti-CD24-fikoeritrom (PE, eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA) i protutijelima na glikosfingolipide. Primarna protutijela na Gb₄Cer, IV³Neu5Ac-nLc₄Cer,

IV⁶Neu5Ac-nLc₄Cer, GM2, Gg₃Cer (gangliotriaosilceramid, GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1Cer) i GalNAc-GM1b su pileća poliklonalna protutijela proizvedena i karakterizirana u laboratoriju Dr. J. Müthing.

Za detekciju stanica obilježenih primarnim protutijelima na glikosfingolipide korištena su sekundarna protutijela obilježena eFluor 660 fluorokromom (Abcam, Cambridge, UK).

Podaci prikupljeni protočnim citometrom BD Accuri C6 analizirani su koristeći FlowLogic softver u kojem su označene matične stanice, CD44⁺CD24⁻. Glikosfingolipidi Gb₄Cer, IV³Neu5Ac-nLc₄Cer, IV⁶Neu5Ac-nLc₄Cer, GM2, Gg₃Cer i GalNAc-GM1b su ispitani na matičnim (CD44⁺CD24⁻) i ne-matičnim (non- CD44⁺CD24⁻) stanicama obaju staničnih linija.

3.5 Statističke operacije

Analiza statističke značajnosti napravljena je pomoću t-testa. ANOVA test korišten je u svrhu usporedbe utjecaja Spoja **1** na obje stanične linije. Analiza glavnih komponenti, (engl. *principal component analysis*, PCA) korištena je kao metoda grupiranja. Vrijednosti IC₅₀ izračunate su koristeći GraphPad Prism 7.0. (San Diego, CA, USA). Za statističku analizu apoptoze i izražaja glikosfingolipida korišteni su t-test, ANOVA, praćeni Turkey testom ili Kruskal-Wallis testom, zatim Dunnov post-hoc test, a sve u softveru GraphPad Prism 7.0, sa značajnosti postavljenom na $P < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. Mjerenje citotoksične aktivnosti

Vijabilnost stanica nakon 24, 48 i 72 sata tretmana Spojem **1** u različitim koncentracijama ispitivana je MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid) testom. Rezultati su prikazani u Tablici 3. Inhibitorna koncentracija za staničnu liniju MDA-MB-231 nakon 48h tretmana bila je 2,082 μM , dok je za staničnu liniju MCF-7 ista iznosila 8,086 μM .

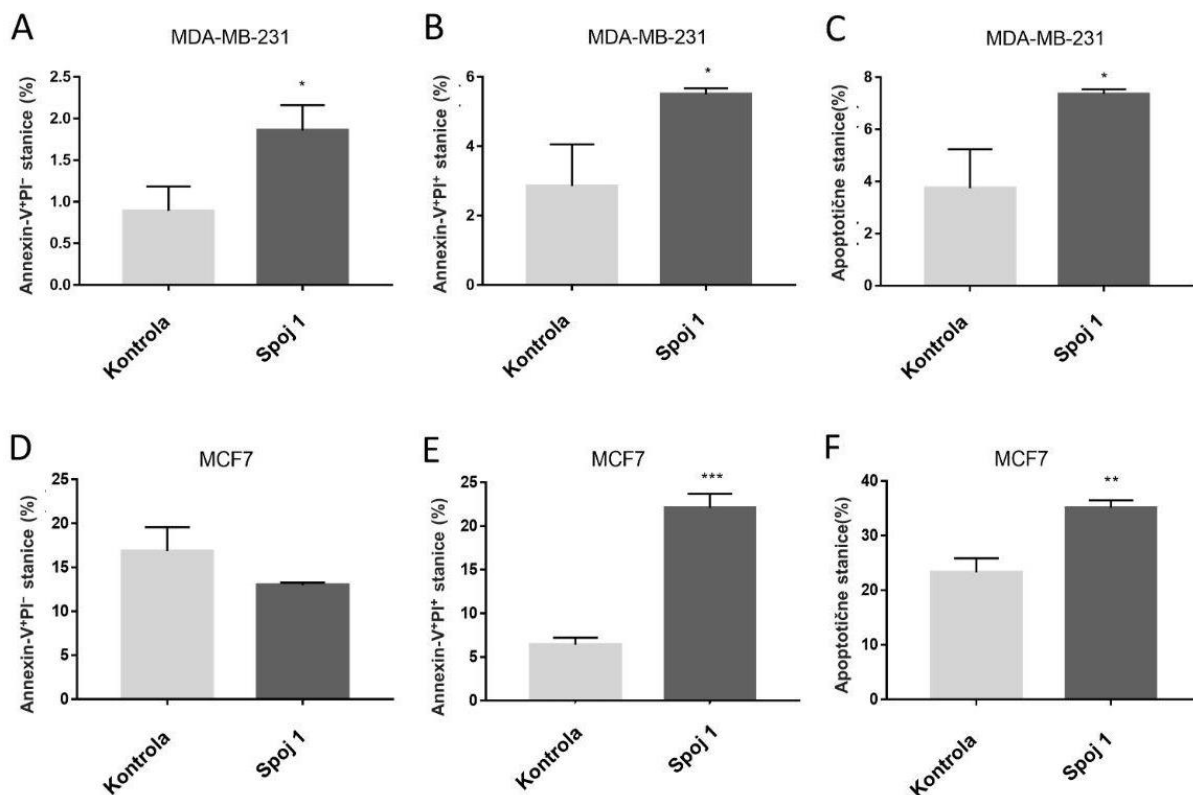
Tablica 3. Prikaz IC_{50} vrijednosti za različite periode inkubacije u obje stanične linije

Vrijeme	24h	48h	72h
Stanična linija MDA-MB-231	12,020 μM *	2,082 μM *	2,188 μM *
Stanična linija MCF-7	59,100 μM	8,086 μM **	2,053 μM *

* $P < 0,001$ ** $P < 0,01$

4.2. Apoptoza

Kako bismo ustanovili tip stanične smrti inducirane 48-satnim tretmanom Spojem **1** u koncentraciji 2 μL , odredili smo postotak rane (Annexin- V^+PI^- subpopulacija), kasne (Annexin- V^+PI^+ subpopulacija) i ukupne apoptoze. U staničnoj liniji MDA-MB-231 Spoj **1** uzrokovao je porast rane, kasne i ukupne apoptoze, dok je u staničnoj liniji MCF-7 zabilježen porast kasne i ukupne apoptoze nakon tretmana Spojem **1**, kao što je prikazano na Slici 6.

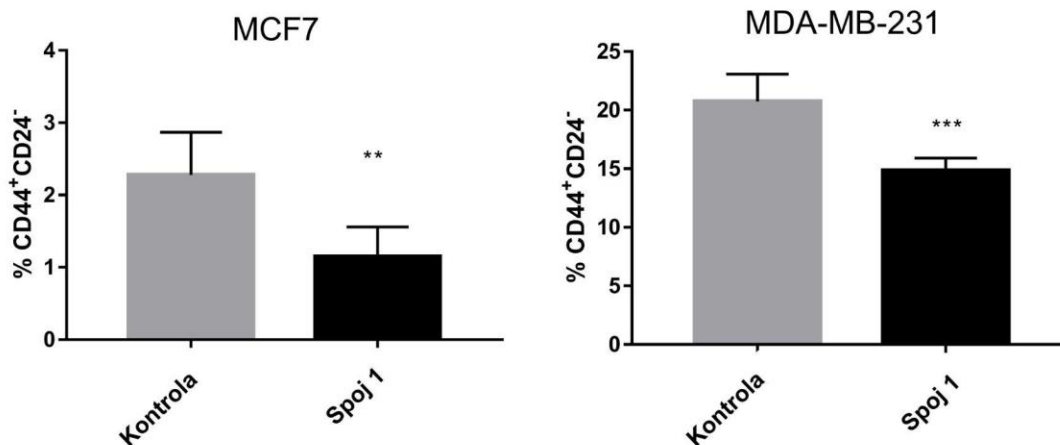


Slika 4. Apoptoza na staničnim linijama

Rana (A), kasna (B) i ukupna (C) apoptoza u MDA-MB-231 staničnoj liniji, rana (D), kasna (E) i ukupna (F) apoptoza u MCF-7 staničnoj liniji. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,1$. Annexin-V⁺PI⁻ (%), postotak stanica u ranoj apoptozi; Annexin-V⁺PI⁺ (%), postotak stanica u kasnoj apoptozi.

4.3. Matičnost stanica

Kako bismo istražili utjecaj Spoja 1 na redukciju broja CSC odredili smo CD44⁺CD24⁻ subpopulaciju u objema staničnim linijama. Tretman Spojem 1 rezultirao je statistički značajnim smanjenjem matičnih stanica karcinoma u liniji MDA-MB-231 s 89,9% (kontrola) na 55,5% (Spoj 1). Broj matičnih stanica karcinoma bio je statistički značajno smanjen i u MCF-7 liniji s 48,3% (kontrola) na 19,4% (Spoj 1).



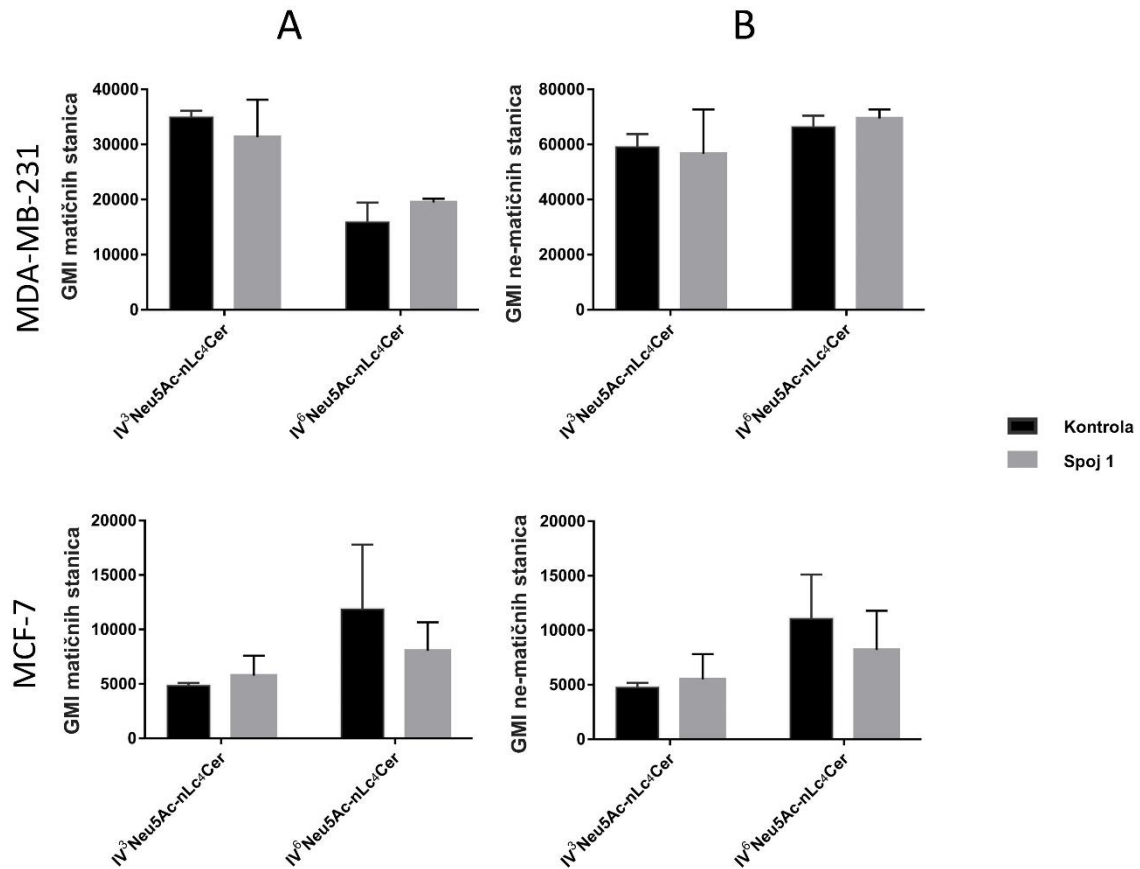
Slika 5. Matične stanice nakon tretmana Spojem 1

Postotak CD44⁺CD24⁻ CSC nakon tretmana Spojem 1 nakon 48 h na staničnim linijama MDA-MB-231 (A) i MCF-7 (B). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost uzoraka pripremljenih u triplikatu ± SD. ** P < 0.05; *** P < 0.001. CSC matične stanice, CD44⁺/CD24⁻ stanice; SD, standardna devijacija.

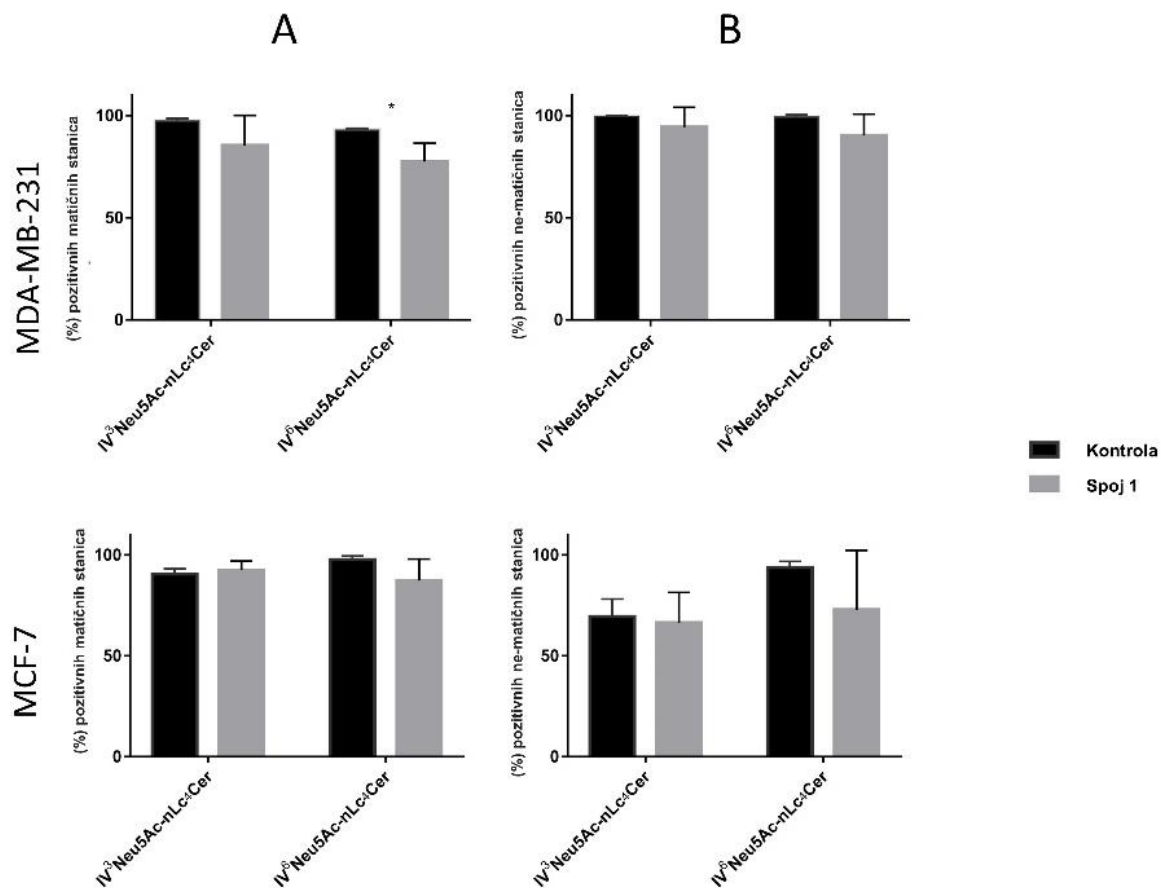
4.4 Izražaj terminalno sijlaziranih glikozida

Sijlazacija je proces bitan za sudbinu stanice u procesu razvoja, reprogramiranja i tumorske progresije (35,36) Dakle, izražaj terminalno sijlaziranih gangliozida na matičnim stanicama karcinoma (CD44⁺CD24⁻) i na ne-matičnim stanicama karcinoma (obrnuto (CD44⁺/CD24⁺, CD44⁻/CD24⁻ i CD44⁻/CD24⁺ subpopulacija; skraćeno nazivane non-CD44⁺/CD24⁻)) ispitan je s ciljem određivanja jesu li citotoksični učinci Spoja 1 povezani s promjenom u sadržaju glikosfingolipida na membrani stanice. Izražaj svakog GSL po jednoj stanici predstavljen je srednjim geometrijskim intenzitetom fluorescencije (engl. *Geometric mean of intensity*, GMI). Udio stanica koje su GSL pozitivne, iako zanimljiv podatak, od manjeg je značaja u usporedbi s GMI. Tretman Spojem 1 rezultirao je statistički značajnim smanjenjem matičnih stanica pozitivnih

na IV⁶Neu5Ac-nLc₄Cer u staničnoj liniji MDA-MB-231. Izražaj IV³Neu5Ac-nLc₄Cer nije bio promijenjen pod utjecajem Spoja 1 (Slika 7).



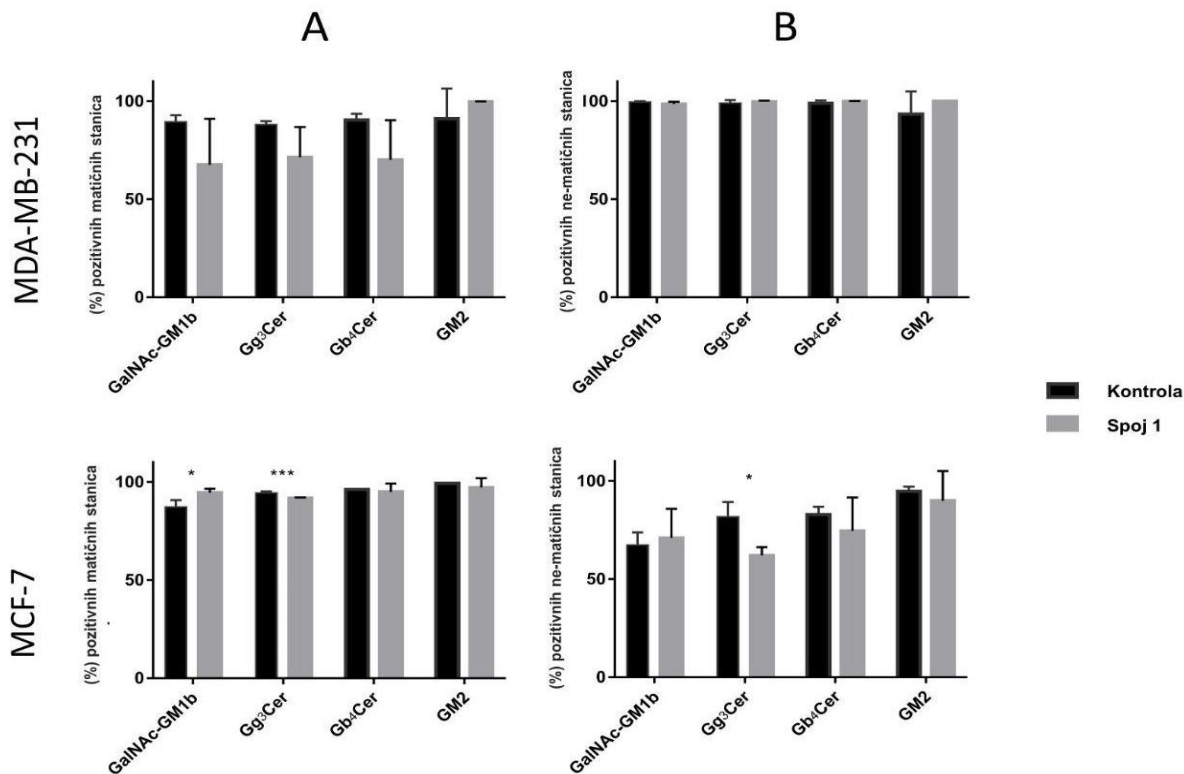
Slika 6. GMI matičnih (A) i ne-matičnih stanica (B) obaju staničnih linija. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost uzoraka pripremljenih u triplicatu ± SD. SD, standardna devijacija; GMI, srednji geometrijski intenzitet fluorescencije; matične stanice CD44⁺/CD24⁻ stanice, ne-matične stanice CD44⁺/CD24⁺, CD44⁻/CD24⁻ i CD44⁻/CD24⁺ stanice.



Slika 7. Postotak matičnih (A) i ne-matičnih (B) stanica pozitivnih na terminalno sijalizirane ganglioziide. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost uzoraka pripremljenih u triplikatu \pm SD. SD, standardna devijacija; matične stanice CD44⁺/CD24⁻ stanice, ne-matične stanice CD44⁺/CD24⁺, CD44⁻/CD24⁻ i CD44⁻/CD24⁺ stanice.

4.5. Izražaj gangliozida i neutralnih glikosfingolipida s terminalnim GalNAc ostatkom na matičnim i ne-matičnim stanicama

Izražaj ovih glikosfingolipida nije bio promijenjen tretiranjem istih sa Spojem 1 u staničnoj liniji MDA-MB-231. U staničnoj liniji MCF-7, postotak GalNAc-GM1b-pozitivnih stanica značajno je povećan, dok je postotak Gg₃Cer-pozitivnih stanica bio smanjen u obje populacije, matičnim i ne-matičnim karcinomskim stanicama.



Slika 8. Postotak matičnih (A) i ne-matičnih stanica (B) pozitivnih na gangliozide i neutralne GSL sa terminalnim GalNAc ostatkom. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost uzoraka pripremljenih u triplikatu \pm SD. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. SD, standardna devijacija;; matične stanice CD44⁺/CD24⁻ stanice, ne-matične stanice CD44⁺/CD24⁺, CD44⁻/CD24⁻ i CD44⁻/CD24⁺ stanice.

5. RASPRAVA

Izražaj glikosfingolipida snažno je povezana sa staničnim metabolizmom. GSL-i uzrokuju specifične pomake u metabolizmu tijekom tumorigeneze putem svojih učinaka na receptore faktora rasta. U našem istraživanju tretiranje stanica Spojem 1 nije imalo utjecaja na izražaj glikosfingolipida na pojedinoj stanici, ali se postotak IV⁶NeuAc-nLc₄-pozitivnih stanica smanjio u MDA-MB-231 staničnoj liniji. U MCF-7 liniji se nakon tretmana Spojem 1 povećao postotak GalNac-GM1b⁺ i smanjio postotak Gg₃Cer pozitivnih stanica. Gg₃Cer pozitivna subpopulacija bila je smanjena i u ne-matičnim stanicama MCF-7 stanične linije, što je u skladu sa zaključcima Liang i sur. (godina) koji su nakon utišavanja enzima ST8SIA1 i B4GALNT1 pronašli smanjen izražaj GD2 i GD3 ganglizida, kao i promjenu fenotipa stanica iz matičnih u ne-matične. Gg₃Cer neutralni glikosfingolipid sintetiziran je s B4GALNT1. Terminalno α 2-6-sijalizirani gangliozidi serije IV⁶NeuAc-nLc₄ kasnije su prepoznati kao receptori za rViscumin, što je korišteno u primjeni neoadjuvantne terapije karcinoma (37).

Nedavno je opisan povišen izražaj IV⁶NeuAc-nLc₄ u matičnim i ne-matičnim stanicama stanične linije MDA-MB-231 sa spojem koji također pripada grupi tienopiridina (38). Gg₃Cer je detektiran u staničnim linijama mišjeg limfosarkoma (39), kao i u stanicama mijeloidne leukemije kao čest neutralni glikosfingolipid (40).

Povišeni udio subpopulacije GalNac-GM1b⁺ i sniženi udio subpopulacije Gg₃Cer⁺ ukazuje na to da dodatak neuraminske kiseline (Neu5Ac) i dva ugljikohidratna ostatka (GalNac β 1-4Gal β 1) Gg₃Cer-u podržava preživljenje matičnih stanica stanične linije MCF-7.

Genski kodirana GalNac-transferaza koja povezuje glikozilne ostatke na glikoproteine pripada obitelji genetski alteracijski-pokrenutih gena, meta terapije koji djeluju kao prognostički čimbenici u karcinomu dojke (41). GALNT2 gen koji kodira OGalNac transferazu 2, koja sintetizira TN antigen u O-glikozilacijskim glikoproteinima, povezan je s visokim razinama triglicerida i kolesterola (42). Pucci i sur. 2022. godine su pokazali da je GALNT2 jedan od najkonstantijih enzima povezanih s malignošću, zajedno s B4GALNT1, B4GALT5, B3GNT5 i ST3GAL2. Enzimi B4GALT5 i B4GALNT1 su uključeni u neke korake sinteze Gg₃Cer i GalNac1b (43).

U našem istraživanju Spoj 1 značajno je povišio ranu i kasnu apoptozu u stanicama stanične linije MDA-MB-231, kao i kasnu apoptozu u stanicama stanične linije MCF-7. Samo su matične stanice stanične linije MCF-7 pokazale povišen postotak GalNac-GM1b⁺ stanica. Možemo

pretpostaviti da te stanice sadrže niže razine ceramida i da su zbog toga manje osjetljive na ranu apoptozu. Kao i za Gg₃Cer, rezultati se podudaraju s onima Lianga i sur 2013. koji su pronašli povišene razine mRNA koja kodira ST3GAL2 glikotransferazu, uključenu u sintezu GalNac-GM1b, u matičnim stanicama karcinoma dojke u usporedbi s ne-matičnim stanicama karcinoma dojke(44).

Prema Markotić i sur. 2024 pretpostavlja se da tienopiridinski spojevi potiču signalne puteve koristeći HER2-HER3 heterodimer, a budući MCF-7 stanice imaju nizak izražaj HER2 i visok izražaj HER3, za razliku od MDA-MB-231 (45), učinak tienopiridina bio je zamjetniji na MDA-MB-231 staničnoj liniji.

Primjena tienopiridinskih spojeva u liječenju trostruko negativnog karcinoma dojke ima značaj u kontekstu razumijevanja unutartumorske heterogenosti kao i eksploatacije ovog koncepta u individualiziranom pristupu liječenja svakog pojedinog pacijenta te mapiranja i razumijevanja glikofenotipskih osobina stanica kao potencijalnih dijagnostičkih i prognostičkih biljega.

Ograničenja ovog istraživanja uključuju izostanak ispitivanja utjecaja spoja na izražaj glikosfingolipida i ostalih ispitivanih parametara na zdrave (ne-karcinomske) stanice, kao i zanemarivanje učinka DMSO-a na ishode istraživanja. Potonji smo pokušali nadomjestiti korištenjem minimalnih koncentracija DMSO-a prema literaturi i dosada opisanim protokolima. Bez obzira na ograničenja ove studije, smatramo da tienopiridinski spojevi zaslužuju pažnju u daljnjim istraživanjima zbog svog dokazanog protutumorskog učinka na različite stanične linije.

6. ZAKLJUČCI

Postavljene hipoteze i rezultati istraživanja dovode do sljedećih zaključaka

1. Tretman Spojem **1** smanjio je vijabilnost stanica obje stanične linije.
2. Tretman Spojem **1** inducirao je apoptozu u obje stanične linije.
3. Tretman Spojem **1** smanjio je postotak matičnih stanica u obje stanične linije.
4. Tretman Spojem **1** promijenio je glikofenotip u obje stanične linije, u smjeru subpopulacije ne-matičnih stanica MDA-MB-231 stanične linije.

7. LITERATURA

1. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kustić Z i sur. Klinička onkologija. 3. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 203-13
2. Svjetska zdravstvena organizacija. Breast cancer [Internet]. Geneva: Svjetska Zdravstvena organizacija; 2024. [citirano 10. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
3. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj u 2021. godini [Internet]. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2024. [citirano 10. rujna 2024.]. Dostupno na <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/incidencija-raka-u-hrvatskoj-u-2021-godini/>
4. Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, Gomez-Valles FO, Ramirez-Valdespino CA. Subtypes of Breast Cancer. *Breast Cancer*. 2022;10:36255
5. Al-Mahmood S, Sapiezynski J, Garbuzenko OB, Minko T. Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. *Drug Deliv Transl Res*. 2018;8(5):1483-507.
6. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010;363:1938–48.
7. Pal S.K., Childs B.H., Pegram M. Triple negative breast cancer: Unmet medical needs. *Breast Cancer Res. Treat*. 2010;125:627–36.
8. Gradishar W.J., Anderson B.O., Balassanian R., Blair S.L., Burstein H.J. i sur. NCCN guidelines insights: Breast cancer, version 1. 2017. *J Natl Compr Cancer Netw*. 2017;15:433–51.
9. Network TCGA, Network CGA, Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H i sur. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490:61–70.
10. American Cancer Society . Treatment of Triple-negative Breast Cancer [Internet]. SAD: American Cancer Society; 2024. Treatment of triple negative breast cancer [citirano 5. rujna 2024]. Dostupno na: www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment/treatment-of-triple-negative.html
11. 75. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershewald JE, Brookland RK i sur. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA A Cancer J. Clin*. 2017;67:93–9.

12. Chu, X., Tian, W., Ning, J. Cancer stem cells: advances in knowledge and implications for cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther.* 2024; 9:170.
13. Acar, A., Nichol, D., Fernandez-Mateos, J. Exploiting evolutionary steering to induce collateral drug sensitivity in cancer. *Nat Commun.* 2020; 11:1923.
14. Lytle NK, Barber AG, Reya T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer.* 2018;18:669–80.
15. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Frontiers in cell and developmental biology.* 2017;5:18.
16. Marotta LL, Almendro V, Marusyk A, Shipitsin M, Schemme J, Walker SR, i sur. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44(+)CD24(-) stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *The Journal of clinical investigation.* 2011;121:2723-35.
17. American Type Culture Collection. MDA-MB-231 [Internet]. Manassas: American Type Culture Collection. [citirano 10. rujna 2024]. Dostupno na <https://www.atcc.org/products/htb-26#detailed-product-information>
18. Culture Collections. Culture collections [Internet]. London: Culture Collections; 2021 MDA-MB-231. [citirano 10. rujna 2024]. Dostupno na <https://www.culturecollections.org.uk/products/cell-cultures/ecacc-cell-line-profiles/mda-mb-231/>
19. Culture Collections. Culture Collections [Internet]. London: Culture Collections; 2021. MCF – 7 [citirano 10. rujna 2024]. Dostupno na <https://www.culturecollections.org.uk/products/cell-cultures/ecacc-cell-line-profiles/mcf7/>
20. Murray RK, Beder DA, Botham KM i sur. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 406-24
21. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR i sur. Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. str. 179–95.
22. Yu RK, Tsai YT, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. *J Oleo Sci.* 2011;60:537-44.

23. Wennekes T, van den Berg RJ, Boot RG, van der Marel GA, Overkleeft HS, Aerts JM. Glycosphingolipids--nature, function, and pharmacological modulation. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48:8848-69.
24. Segui B, Andrieu-Abadie N, Jaffrezou JP, Benoist H, Levade T. Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets. *Biochim biophys acta.* 2006;1758:2104-20.
25. Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:281-312.
26. Eccles SA, Box C, Court W. Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11:391-421.
27. 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;17:3169-76.
28. Leung E, 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;5:8.
29. Haverkate NA, van Rensburg M, Kumara S, Reynisson J, Leung E, Pilkington LI i sur. Improving the solubility of anti-proliferative thieno[2,3-b]quinoline-2-carboxamides. *Bioorg Med Chem.* 2021;37:116092.
30. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55–63.
31. 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;120:159–67.
32. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55–63.

33. Longobard Givan A. Flow cytometry – first principles. 1. izdanje. New York: Willey-Liss; 1992. str 1-15
34. BDBiosciences. Products [Internet]. New Jersey: BDBiosciences; 2024. BD Accuri C6 Plus [citirano 10. rujna 2024.]. Dostupno na <https://wwwbdbiosciences.com/en-us/products/instruments/flow-cytometers/research-cell-analyzers/bd-accuri-c6-plus>
35. Badr HA, AlSadek DM, Mathew MP, Li CZ, Djansugurova LB, Yarema KJ i sur. Nutrient-deprived cancer cells preferentially use sialic acid to maintain cell surface glycosylation. *Biomaterials*. 2015;70:23–36.
36. Li F, Ding J. Sialylation Is Involved in Cell Fate Decision During Development, Reprogramming and Cancer Progression. *Protein Cell*. 2019;10:550–65.
37. Muthing J, Burg M, Mockel B, Langer M, Metelmann-Strupat W, Werner A i sur. Preferential Binding of the Anticancer Drug Rvuscumin (Recombinant Mistletoe Lectin) to Terminally Alpha2-6-Sialylated Neolacto-Series Gangliosides. *Glycobiology*. 2002;12:485–497.
38. Marijan S, Markotic A, Mastelic A, Rezic-Muzinic N, Pilkington LI, Reynisson J i sur. Glycosphingolipid Expression at Breast Cancer Stem Cells after Novel Thieno[2,3-B]Pyridine Anticancer Compound Treatment. *Sci Rep*. 2020;10:11876.
39. Taki T, Ishikawa D, Ogura M, Nakajima M, Handa S. Ganglioside GD1alpha functions in the adhesion of metastatic tumor cells to endothelial cells of the target tissue. *Cancer Res*. 1997;57:1882–88.
40. Taki T, Maeda H, Arai K, Matsumoto M, Kon K, Ando S. Appearance of a novel type of ganglioside (GD1.ALPHA.) in a differentiation-resistant clone of mouse myeloid leukemia cells, M1-R1. *Cell Struct Funct*. 1988;13:61–72.
41. Wang L, Yu L, Shi J, Li F, Zhang C, Xu H i sur. Functional regulations between genetic alteration-driven genes and drug target genes acting as prognostic biomarkers in breast cancer. *Sci Rep*. 2022;12:10641.

42. Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt NP, Rieder MJ et al. Six New Loci Associated with Blood Low-Density Lipoprotein Cholesterol, High-Density Lipoprotein Cholesterol or Triglycerides in Humans. *Nat Genet.* 2008;40:189–197
43. Pucci M, Duca M, Malagolini N, Dall’Olio F. Glycosyltransferases in Cancer: Prognostic Biomarkers of Survival in Patient Cohorts and Impact on Malignancy in Experimental Models. *Cancers.* 2022;14:2128.
44. Liang YJ, Ding Y, Levery SB, Lobaton M, Handa K, Hakomori SI. Differential Expression Profiles of Glycosphingolipids in Human Breast Cancer Stem Cells Vs. Cancer Non-Stem Cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2013; 110:4968–73.
45. Markotić A, Omerović J, Marijan S, Režić-Mužinić N, Čikeš Čulić V. Biochemical pathways delivering distinct Glycosphingolipid patterns in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. *Curr Issues Mol Biol.* 2024;46:10200-17

8. SAŽETAK

Ciljevi: Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati djelovanje tienopiridinskog spoja na dvije stanične linije karcinoma dojke.

Materijali i metode: 3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b] kinolin-2-karboksamid (Spoj **1**) korišten je za tretiranje dviju staničnih linija karcinoma dojke; MDA-MB-231 i MCF-7. Za procjenu vijabilnosti stanica korišten je MTT test. Određivanjem Annexin-V⁺PI⁻ subpopulacije i Annexin-V⁺PI⁺ subpopulacije određena je razina rane, kasne i ukupne apoptoze. Pomoću protočne citometrije odredili smo izražaj glikosfingolipida koristeći se fluorescirajućim protutijelima.

Rezultati: Tretman Spojem **1** rezultirao je statistički značajnim smanjenjem matičnih stanica karcinoma u liniji MDA-MB-231 s 89,9% (kontrola) na 55,5% (Spoj **1**). Broj matičnih stanica karcinoma bio je statistički značajno smanjen i u MCF-7 liniji s 48,3% (kontrola) na 19,4% (Spoj **1**). Inhibitorna koncentracija za staničnu liniju MDA-MB-231 nakon 48h tretmana bila je 2,082 μ M, dok je za staničnu liniju MCF-7 ista iznosila 8,086 μ M. U staničnoj liniji MCF-7, postotak GalNAc-GM1b-pozitivnih stanica statistički značajno je povećan, dok je postotak Gg₃Cer-pozitivnih stanica bio smanjen u obje populacije, matičnim i ne-matičnim karcinomskim stanicama.

Zaključci: Spoj **1** smanjio je vijabilnost, inducirao apoptozu, smanjio broj matičnih stanica i promijenio izražaj glikosfingolipida u obje stanične linije, s jače izraženim razlikama u staničnoj liniji MDA-MB-231. Spoj **1** pokazao je citotoksično djelovanje, osobito na stanicama trostruko negativnog karcinoma dojke te zaslužuje biti dalje ispitan koristeći *in vitro* i *in vivo* modele.

9. SUMMARY

Diploma thesis title: Expression of glycosphingolipids on breast carcinoma cells after treatment with thienopyridine compound.

Objectives: To examine the effects of thienopyridine compound on two breast carcinoma cell lines.

Materials and methods: (3-amino-N-(3-chloro-2-methylphenyl)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydrothieno-[2,3-b]quinoline-2-carboxamide (Compound 1) was used to treat two breast carcinoma cell lines; MDA-MB-231 and MCF-7. To assess the viability of the cells we used MTT test. By identifying Annexin-V⁺PI⁻ subpopulation and Annexin-V⁺PI⁺ subpopulation we assessed the rate of early, late and total apoptosis. Using flow cytometry we examined the expression of glycosphingolipids, which were determined with the fluorescent antibodies.

Results: Treatment with Compound 1 resulted in a statistically significant reduction in cancer stem cells in the MDA-MB-231 line from 89.9% (control) to 55.5% (Compound 1). The number of cancer stem cells was also significantly reduced in the MCF-7 line from 48.3% (control) to 19.4% (Compound 1). The inhibitory concentration for the MDA-MB-231 cell line after 48h of treatment was 2.082 μ M, while for the MCF-7 cell line it was 8.086 μ M. In the MCF-7 cell line, the percentage of GalNAc-GM1b-positive cells increased significantly, while the percentage of Gg3Cer-positive cells decreased in both populations, cancer stem cells and non-cancer stem cells.

Conclusions: Compound 1 reduced viability, induced apoptosis, decreased the number of cancer stem cells, and altered glycosphingolipid expression in both cell lines, with more pronounced differences in the MDA-MB-231 cell line. Compound 1 exhibited cytotoxic effects, especially on triple-negative breast cancer cells, and warrants further investigation using in vitro and in vivo models.