

# Utjecaj inhibitora fosfolipaze C na rast i preživljenje stanica karcinoma prostate

---

**Medak, Antea**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:018699>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-30**

*Repository / Repozitorij:*



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

## Sadržaj

1. Uvod .....	2
1.1. Karcinom prostate .....	2
2. Cilj rada .....	5
3. Materijali i metode .....	6
3.1. Kemija .....	7
3.2. Stanična linija .....	8
3.2.1. Ispitivanje citotoksične aktivnosti .....	10
3.2.2. Analiza protočnom citometrijom .....	12
3.3. Statistička analiza .....	14
4. Rezultati .....	15
5. Rasprava .....	18
6. Zaključak .....	20
7. Literatura .....	21
8. Sažetak .....	24
8.1. Summary .....	26
9. Životopis .....	28
10. Prilozi .....	29
10.1. Popis slika .....	29
10.2. Popis tablica .....	29
10.3. Popis kratica .....	30

# 1. Uvod

## 1.1. Karcinom prostate

Karcinom prostate jedan je od najčešćih karcinoma u muškoj populaciji. Prema podacima Registra iz 2015. godine, rak prostate u Hrvatskoj je drugo najčešće oboljenje od raka kod muškarca. Stopa incidencije iznosi 105,6/100 000 muškaraca (Tablica 1).

Prostata je smještena ispod mokraćnog mjehura i ispred rektuma te ima važnu ulogu u proizvodnji sjemene tekućine i kontroli urina kod muškaraca (1). Prostata ima vrlo važnu ulogu u odvijanju normalnih životnih funkcija kod muškarca, stoga je vrlo važan dio muškog reproduktivnog sustava, te je važno očuvanje njene normalne funkcije i zdravlja. Karcinom prostate obično se prvi put pojavljuje u žljezdanim stanicama, naziv je poznatiji kao adenokarcinom (2). Prostatična intraepitelna neoplazija, PIN, uzrokuje promjene u obliku i veličini stanica prostate (3). Statistički podaci ukazuju da gotovo polovica muškaraca starijih od 50 godina imaju visoki PIN što ukazuje na prekancerogeno stanje i zahtjeva daljnju obradu pacijenta. Što se tiče samih simptoma karcinoma prostate u ranoj fazi ove bolesti, simptomi se rijetko i neprimjetno pojavljuju. Simptomi koji se ipak pojave gotovo uvijek uključuju pojačano mokrenje, krv u urinu, poteškoće u održavanju erekcije, bolno i otežano mokrenje, pogotovo pojačano mokrenje noću, prvi je i jedan od alarmantnih znakova u poremećaju funkcije prostate. Stoga se simptomi otežanog mokrenja nikako ne bi trebali zanemarivati. Kada govorimo o već poodmaklom stadiju karcinoma prostate, simptomi su bolniji i uočljiviji, a oni uključuju bol u kostima osobito u rebrima, zdjelici i kralježnici. Ako se karcinom proširi na kralježnicu često uzrokuje slabost u donjim udovima te urinarnu i fekalnu inkontinenciju (4). Ako se pojave neki od ovih simptoma, nužan je odlazak liječniku koji će pomoću raznih testova utvrditi prisutnost ili stadij bolesti. Tijekom pregleda liječnik prvo obavlja fizički pregled pacijenta. Također je vrlo važno od pacijenta uzeti povijest bolesti jer je utvrđeno da određene populacije ljudi sa specifičnim genotipom imaju veći rizik od nastanka karcinoma prostate. Daljnje pretrage uključuju digitalni rektalni pregled (DRE) u kojem će liječnik ustanoviti bilo kakve abnormalnosti pregledom prstima, zatim slijede testovi pomoću kojih se provjerava stanje urina i krvi. Također, potrebno je pratiti razinu prostata specifičnog antigena (PSA) u krvi. PSA je jednolančani glikoprotein koji se nalazi samo u epitelnim stanicama prostate. PSA je enzim, serinska proteaza, čiji učinak može biti inhibiran raznim inhibitorima serinskih proteaza. Gen za PSA (hKLK3) smješten je na kromosomu 19. EGF smanjuje, a androgeni hormoni

povećavaju sekreciju PSA. Koncentracija PSA u sjemenoj tekućini je milijun puta viša od koncentracije u serumu. U krvi se PSA nalazi u dvama oblicima kao slobodni i vezani PSA. Budući da je PSA specifičan za epitelne stanice prostate, upotrebljavan je kao marker za karcinom prostate, kako u probiru za otkrivanje novih slučajeva karcinoma, tako i u praćenju tijeka bolesti i učinku liječenja (5).

**Tablica 1.** Prikaz novih slučajeva raka u Hrvatskoj u 2015. godini, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, registar za rak Republike Hrvatske

	<b>BROJ NOVIH SLUČAJEVA</b>	<b>STOPA INCIDENCIJE/100 000</b>
<b>1. TRACHEA, BRONCHUS ET PULMO (PRIM.)</b>	<b>2187</b>	<b>108,3</b>
<b>2. PROSTATA</b>	<b>2141</b>	<b>105,5</b>
<b>3. INTESTINUM CRASSUM EXCL. RECTUM</b>	<b>1107</b>	<b>54,6</b>
<b>4. RECTUM, RECTOSIGMA ET ANUS</b>	<b>783</b>	<b>38,6</b>

Rano otkrivanje bolesti, kao i kod ostalih vrsta karcinoma, vrlo je važno, jer se samim ranim otkrivanjem smanjuju brojni medicinski zahvati, povećavaju se šanse za preživljenje i samim tim boravak u bolnici. Što se tiče rane faze karcinoma prostate, liječenje uključuje radikalnu prostatektomiju u kojoj se prostata kirurški uklanja te terapiju zračenjem u kombinaciji s hormonskom terapijom (6). Kada govorimo o plodnosti, moramo naglasiti da svi zahvati bitno ugrožavaju muškarčevu plodnost. Budući da je prostata izravno uključena u seksualnu reprodukciju, uklanjanje bitno utječe na kvalitetu i proizvodnju spermija. Zbog svih gore navedenih problema, vrlo je važno rano otkrivanje karcinoma prostate u svrhu što boljeg i kvalitetnijeg liječenja te prevencije daljnjeg širenja i ugrožavanja bolesnikova zdravlja.

Matične stanice karcinoma posjeduju sposobnost samoobnove i potiču stvaranje heterogenih linija stanica karcinoma koje obuhvaćaju tumor (7). Brojna eksperimentalna istraživanja pokazala su da su upravo te, visoko tumorigenske stanice odgovorne za daljnje širenje i progresiju karcinoma te naposljetku razvoj metastatske bolesti. Poznato je da karcinom

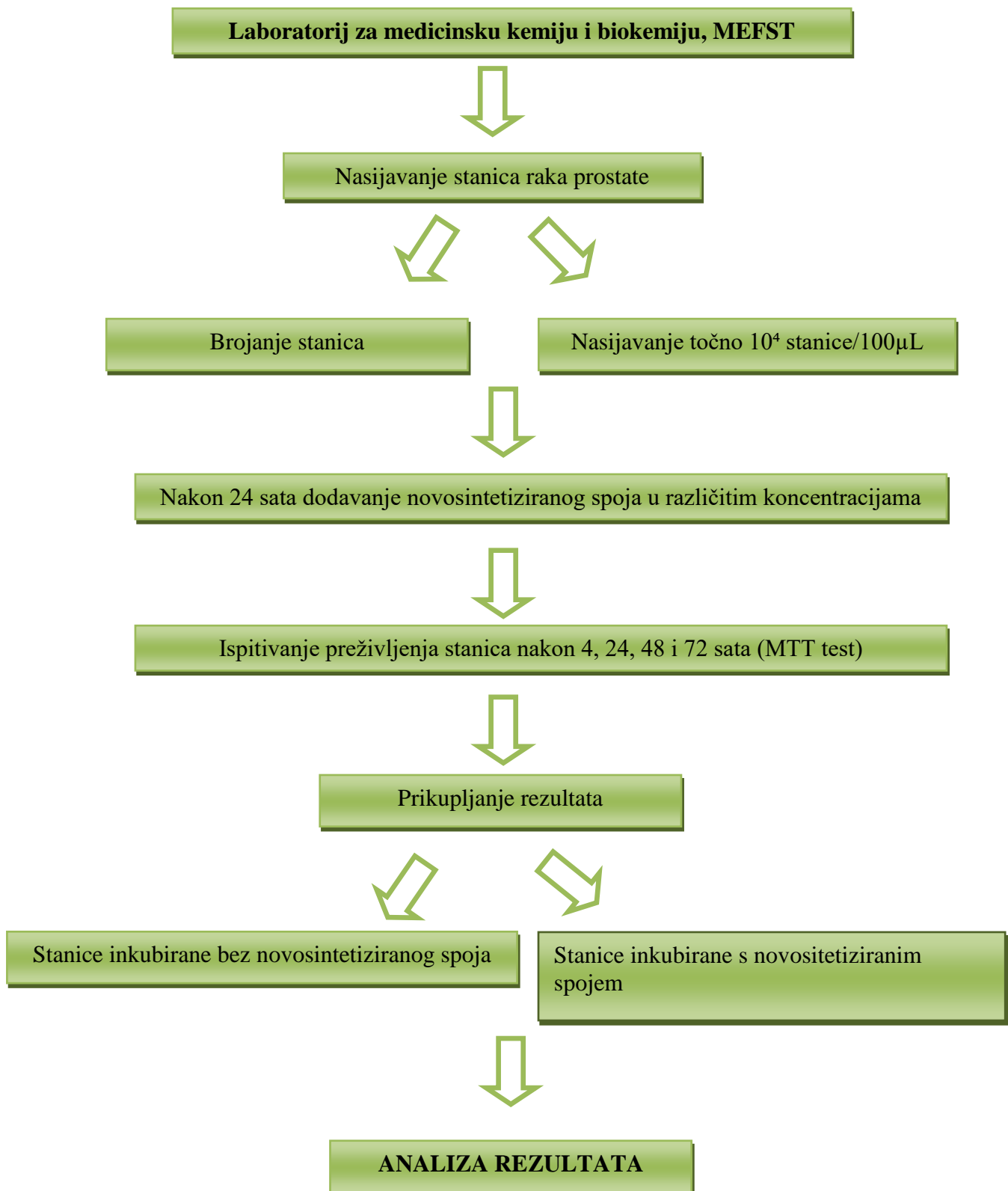
prostate pokazuje visoku intrinzičnu otpornost na kemoterapeutike. U svrhu sprječavanja razvoja karcinoma, smatra se kako bi se samim uništavanjem matičnih stanica karcinoma prostate postigli obećavajući rezultati u liječenju karcinoma prostate.

Androgen neovisni karcinom prostate (Du-145) sadrži veliku količinu GM3 gangliozida. Gangliozidi su prisutni na staničnim površinama i sastoje se od dva ugljikovodična lanca koja su ugrađena u plazmatsku membranu i oligosaharide koji se nalaze na vanstaničnoj površini i imaju ulogu u prepoznavanju vanstaničnih molekula ili površine susjednih stanica (8). Oligosaharidni dio proteže se iznad stanične membrane i ima važnu ulogu u staničnom prepoznavanju i komunikaciji između stanica. Stoga, funkcija gangliozida upućuje na njihovu važnu ulogu u rastu, diferencijaciji i karcinogenezi tkiva. CD44 je receptor hijaluronske kiseline, a CD24 toplinski stabilan antigen koji je izražen u mnogim tipovima karcinoma (9). Brojna istraživanja su pokazala da povećanje matičnih stanica raka (CSCs) u tumorskoj masi može biti razlog neuspjeha standardnih terapija upravo zbog njihove otpornosti (10). Matične stanice određene subpopulacije, CD44+/CD24-, pronađene se kod pacijenata s karcinomom prostate. Također smatra se da je ova određena subpopulacija matičnih stanica uključena u terapijsku rezistenciju različitih vrsta karcinoma.

## 2. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je utvrditi postotak vijabilnosti stanica raka Du-145 nakon tretmana s novosintetiziranim spojem (3-Amino-5okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b]kinolin-2-karboksamid) inhibitorom fosfolipaze C.

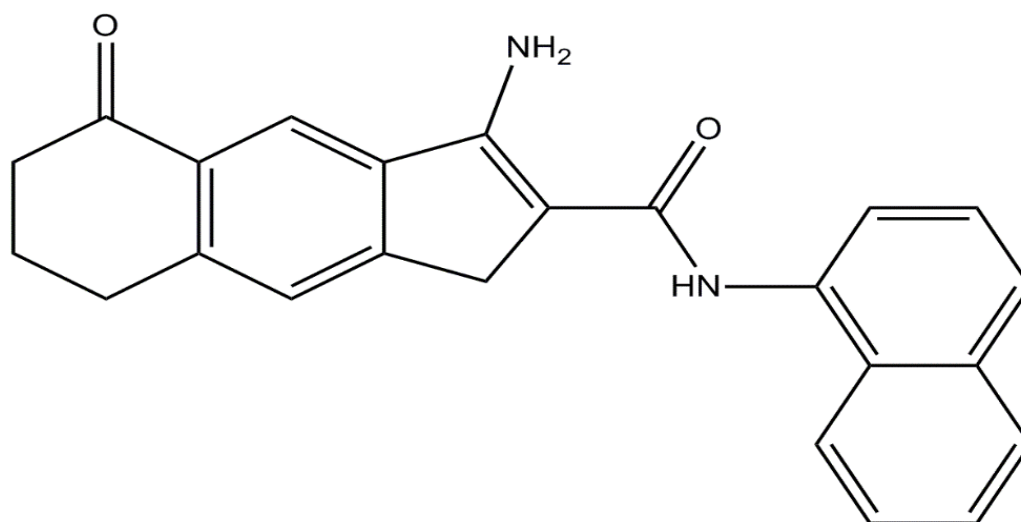
### 3. Materijali i metode



**Slika 1.** Hodogram izrade završnog rada

### 3.1. Kemija

Novo sintetizirani antitumorski spoj, 3-Amino-5okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b]kinolin-2-karboksamid (Slika 1), otopljen je u dimetil sulfoksidu (DMSO), bezbojnoj tekućini koja je poznata zbog svoje sposobnosti prodiranja kroz biološke membrane (11).



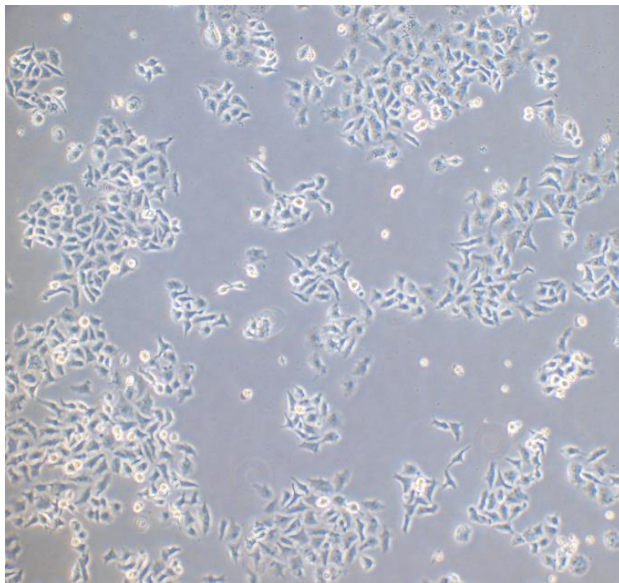
**Slika 2.** Prikaz novosintetiziranog antitumorskog spoja

3-Amino-5okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b]kinolin-2-karboksamid



### 3.2. Stanična linija

Što se tiče samog uzgoja stanične linije raka, stanice su uzgajane u specifičnim uvjetima povišene vlažnosti na 37 °C. Stanična linija Du-145 uzgajana je u RPMI-1640 mediju. RPMI-1640 koristi natrijev bikarbonatni puferski sustav, stoga zbog održavanja fiziološkog pH sustava koristi se prisustvo CO<sub>2</sub> u iznosu od 5%. Također, tijekom uzgoja korišteno je 1% antibiotika (EuroClone). RPMI-1640 medij jedinstven je po svom sastavu, sadrži glutation glukanat i visoke koncentracije vitamina, također sadrži biotin, vitamin B<sub>12</sub> i para-aminobenzojevu kiselinu (PABA). Međutim, zbog nedostatka bjelančevina, lipida i čimbenika rasta, zahtjeva određenu nadopunu - RPMI-1640 medij se nadopunjuje s 10% fetalnim goveđim serumom. Fetalni goveđi serum složena je smjesa velikog broja sastojaka: faktora rasta, proteina, vitamina, elemenata u tragovima, hormona esencijalnih za rast i održanje stanica u kulturi (12).



**Slika 3.** Prikaz Du 145 stanica



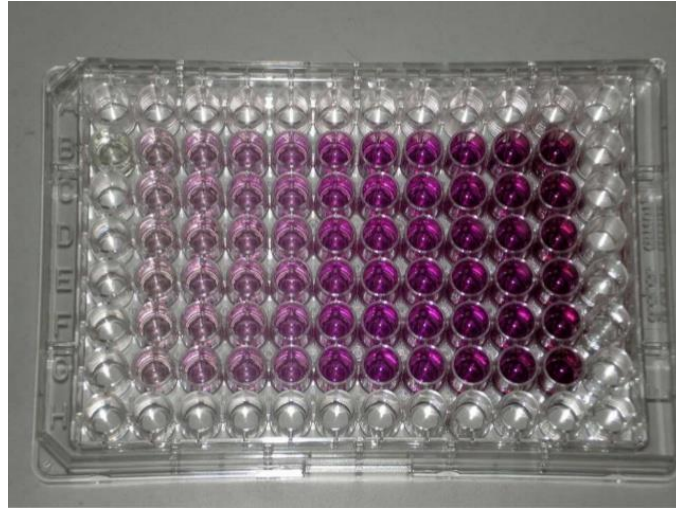
**Slika 4.** Prikaz CO<sub>2</sub> inkubatora Nuve EC 160

Matične stanice raka su vrlo važan podskup stanica koje mogu određivati invaziju, metastazu, heterogenost i terapijsku rezistenciju kod karcinoma. Upravo se novi principi liječenja karcinoma temelje na razaranju ovih staničnih populacija. Provedena su brojna istraživanja na površinskim markerima u cilju identifikacije matičnih stanica raka, no nedostatak univerzalne ekspresije površinskih markera ograničava njihovu upotrebu. Daljnjim istraživanjem će se proučiti najzastupljeniji i najčešće proučavani površinski markeri CD44 CD24.

### 3.2.1. Ispitivanje citotoksične aktivnosti

MTT test (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) temelji se na pretvorbi MTT-a u kristale formazana u živim stanicama. Održive stanice s aktivnim metabolizmom pretvaraju MTT u purpurni obojeni formazanski proizvod, s maksimumom apsorbanacije na 570 nM, dok mrtve stanice gube sposobnost pretvaranja MTT u formazan. Budući da je za većinu stanične populacije ukupna mitohondrijska aktivnost povezana s brojem vijabilnih stanica, ovaj test je široko korišten za mjerenje in vitro citotoksičnih učinaka lijekova. Vijabilnost stanica je određena mjerenjem staničnog metabolizma pomoću MTT testa. MTT je kolorimetrijski test koji se koristi u svrhu procjene metaboličke aktivnosti stanica. Analiza detektira žive stanice, a generirani signal ovisi o stupnju aktivacije stanica, stoga je analiza pogodna za mjerenje citotoksičnosti, proliferacije i aktivacije stanica (13).

Tijekom istraživanja istražena je vijabilnost stanica nakon što su stanice bile tretirane novosintetiziranim spojem u vremenskim razdobljima od 4, 24, 48 i 72 sata. Samo mjerenje provedeno je pomoću, već gore opisanog, MTT testa. Polovina maksimalne inhibitorске reakcije,  $IC_{50}$ , je mjera jačine tvari u inhibiranju specifične biološke ili biokemijske funkcije (14). Ova kvantitativna mjera je vrlo korisna prilikom istraživanja jer je pokazatelj kolika je doza određene supstance potrebna za inhibiciju određenog biološkog procesa. Preko noći je ostavljen jednak broj stanica ( $10^4$  stanica/ $100\mu\text{L}$ ) postavljene u tri replikacije. Stanice su zatim tretirane određenim spojevima, kompletnim medijima ili pojedinačnim otopinama novosintetiziranog spoja. Količine spojeva koje su bili u upotrebi iznosile su 0.5, 1, 5, 10 i 25  $\mu\text{M}$ . Nadalje su stanice tretirane tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Ista koncentracija novosintetiziranog spoja ispitana je u kombinaciji s određenim kemoterapijskim lijekom koji se koristi prilikom liječenja različitih tipova karcinoma, a njegov naziv je paclitaxel. Koncentracija kemoterapeutskog lijeka iznosila je 12 nM. Nakon tretmana stanice su inkubirane s 0,5 mg/mL MTT. Zatim su mediji uklonjeni i dodan je dimetilsulfoksid (DMSO). Izmjerene apsorbanacije signala iznosile su 570 nm.



**Slika 5.** Prikaz MTT kolorimetrijskog testa

### 3.2.2. Analiza protočnom citometrijom

Protočna citometrija je tehnika koja koristi svjetlost za brojanje, sortiranje te profiliranje stanica iz smjese različitih stanica. Tom tehnikom mogu se identificirati različite vrste stanica zbog različitog raspršenja svjetlosti. Moderni protočni citometri sposobni su analizirati tisuću čestica u sekundi. Protočni citometar sastoji se od 3 međusobno povezana sustava: protočnog, optičkog i elektronskog. Protočni sustav čine pokretačka tekućina, koja je nosač stanične suspenzije, stanična suspenzija i zračni potisak. Protočni sustav omogućuje stanicama iz stanične suspenzije pojedinačan protok, kroz sustav uske kapilare, dolazak do snopa laserskog svjetla koji s lećama, filtrima i osjetnicama čini optički sustav. Stanice se zatim obasjavaju laserskim svjetlom, a stupanj raspršenja svjetlosti iste valne duljine pokazatelj je fizičkih osobina stanice. FSC- prema *engl. forward scatter*, koristi se za prepoznavanje veličine čestica, a SSC - prema *engl. side scatter*, mjeri zrnatost stanica. Podatci u protočnoj citometriji obično se prikazuju na dva načina: histogrami koji mjere ili uspoređuju samo jedan parametar i dot-plotovi (*engl. Dot-plots*) koji uspoređuju dva ili tri parametra istovremeno. Premda je do danas razvijen velik broj protočno-citometrijskih testova za analizu različitih staničnih obilježja, protočna citometrija se ponajviše rabi u imunofenotipizaciji (15).

Jednak broj stanica ( $5 \times 10^5$ ) nasijan je na ploče koje sadrže 6 jažica i stanice su tretirane s  $2 \mu\text{M}$  novosintetiziranog spoja i/ili s paclitaxel-om u vremenskom razdoblju od 48 sati. Zatim su stanice bile podvrgnute testu u kojem se promatrala stanična aktivnost, drugim riječima mjerenje stanične apoptoze.

Apoptoza je proces koji uključuje brojne biokemijske procese koji dovode do promjene samih karakteristika stanice i programirane stanične smrti koja se može javiti kod višestaničnih organizama (16). Za razliku od apoptoze, traumatska stanična smrt ili nekroza je posljedica akutne stanične ozljede (17). Kombinacijom dvaju spojeva Annexin-V-FITC i propidij jodida (PI), omogućena je diferencijacija ranih i kasnih staničnih apoptoza. Annexin-V-FITC test omogućava fluorescentnu detekciju Annexin-a V vezanog za apoptotičke stanice i kvantitativno određivanje protočnom citometrijom (18). Nadalje, u kombinaciji s korištenjem PI, omogućava se obilježavanje stanične DNA u nekrotičnim stanicama gdje je stanična membrana potpuno ugrožena. Diferencijacija apoptotičnih, nekrotičnih i vijabilnih stanica zasniva se na kombinaciji pozitivnih odnosno negativnih rezultata kombinacije ovih dvaju spojeva. Zbog svega gore navedenog, apoptotične stanice imat će kombinaciju Annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>, nekrotične stanice bit će Annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>, a vijabilne stanice bit će i Annexin-V i PI negativne. Nakon

tretiranja stanica smjesom koja se sastojala od kombinacije novosintetiziranog spoja i paclitaxel-a ili njihovim zasebnim korištenjem stanice su bile podvrgnute postupku tripsinizacije.

Tripsinizacija je postupak kojim se pomoću proteolitički aktivnog enzima događa disocijacija stanica. Enzim omogućuje razgradnju proteina i njihovu disocijaciju iz predmeta u kojem su uzgajani. U eksperimentalne svrhe, stanice se često uzgajaju u spremnicima koji se u obliku plastičnih tikvica ili ploča. U takvim tikvicama, stanice su opremljene medijem za rast koji sadrži esencijalne hranjive tvari potrebne za proliferaciju. Potom su stanice isprane s PBS-om i naposljetku resuspendirane u 100  $\mu$ L pufera za vezanje koji sadrži 5  $\mu$ L Annexin-V-FITC i/ili 5  $\mu$ L PI. Inkubacija stanica odvijala se na sobnoj temperaturi u mraku u vremenskom razdoblju od 15 minuta. Analiza je rađena pomoću protočne citometrije, a postotak apoptotičnih stanica analiziran je korištenjem Logic Software (Inivai) i prezentiran kao srednja  $\pm$  standardna devijacija. U cilju sprječavanja nastanka nespecifičnog vezanja protutijela na stanice koje eksprimiraju Fc receptor, stanice su tretirane s Fc reagensom (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach Germany).

Prikupljanje podataka odrađeno je na BD Accuri 6 citometru (Slika 6) i analizirano korištenjem FlowLogic softvera.



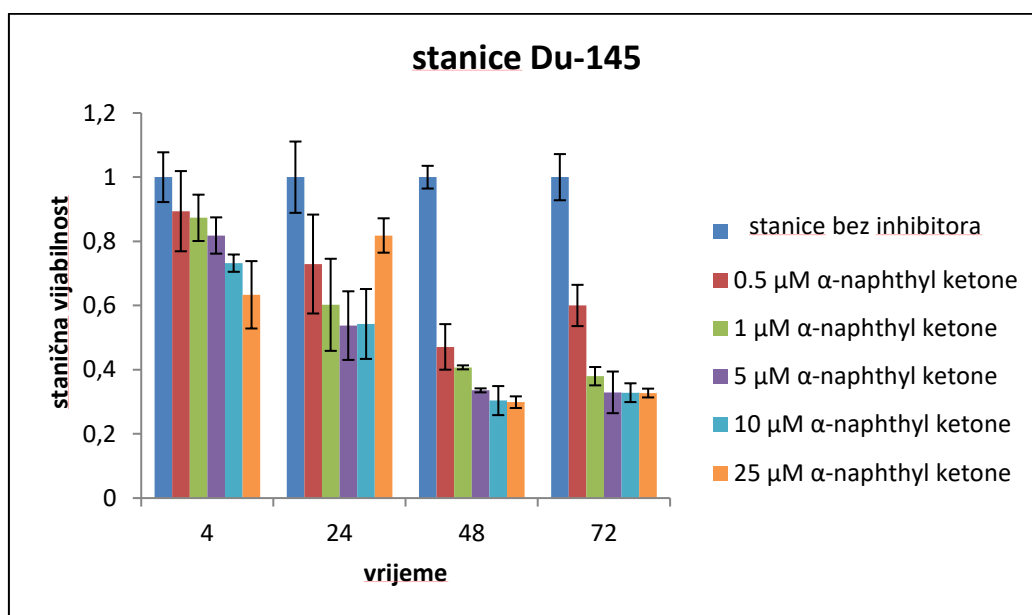
**Slika 6.** Prikaz BD Accuri C6 citometra

### **3.3. Statistička analiza**

Kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika, za statističku analizu provedena je jednosmjerna ANOVA popraćena Tukey-evim testom pomoću statističkog softvera Statistica za Windows verziju 7.0 (Stat Soft. Tulsa. OK, USA) s postavljenom značajnošću  $P < 0.05$ .

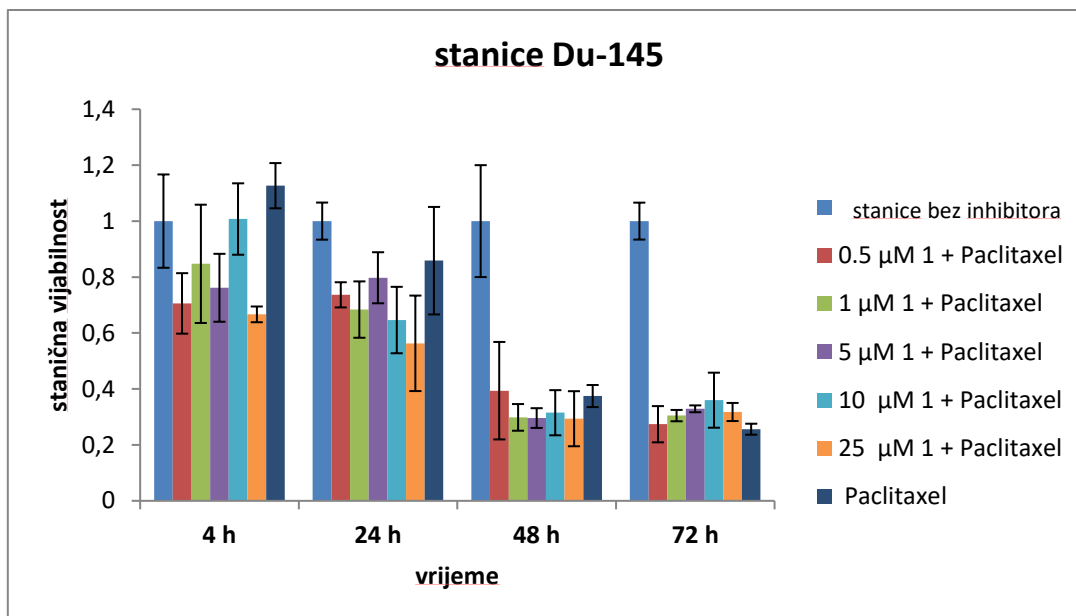
## 4. Rezultati

Nakon 72h tretmana, vrijednost  $IC_{50}$  za Du-145, iznosila je  $5,1 \mu\text{M}$ . Razlike u koncentracijama novosintetiziranog spoja i vremenskog razdoblja tretmana davale su različite rezultate pa je tako nakon 4 sata tretman s novosintetiziranim spojem u iznosu od 10 i  $25 \mu\text{M}$  pokazao značajno smanjenje stanične vijabilnosti za stanice Du-145 u usporedbi sa stanicama koje nisu bile tretirane (Slika 7A). Također, kako se povećavao vremenski period s 4 sata na 48 i 72 sata, niže koncentracije spoja pokazivale su značajniju citotoksičnost. Također, ispitivala se učinkovitost liječenja prilikom kombinacije korištenja između novosintetiziranog spoja i paclitaxel-a. Rezultati koji pokazuju značajno smanjenje preživljena stanica bili su kombinacija  $0,5 - 25 \mu\text{M}$  novosintetiziranog spoja i paclitaxel-a nakon 48 i 72 sata (Slika 7B).



**Slika 7A.** Stanična vijabilnost nakon tretmana s novosintetiziranim spojem

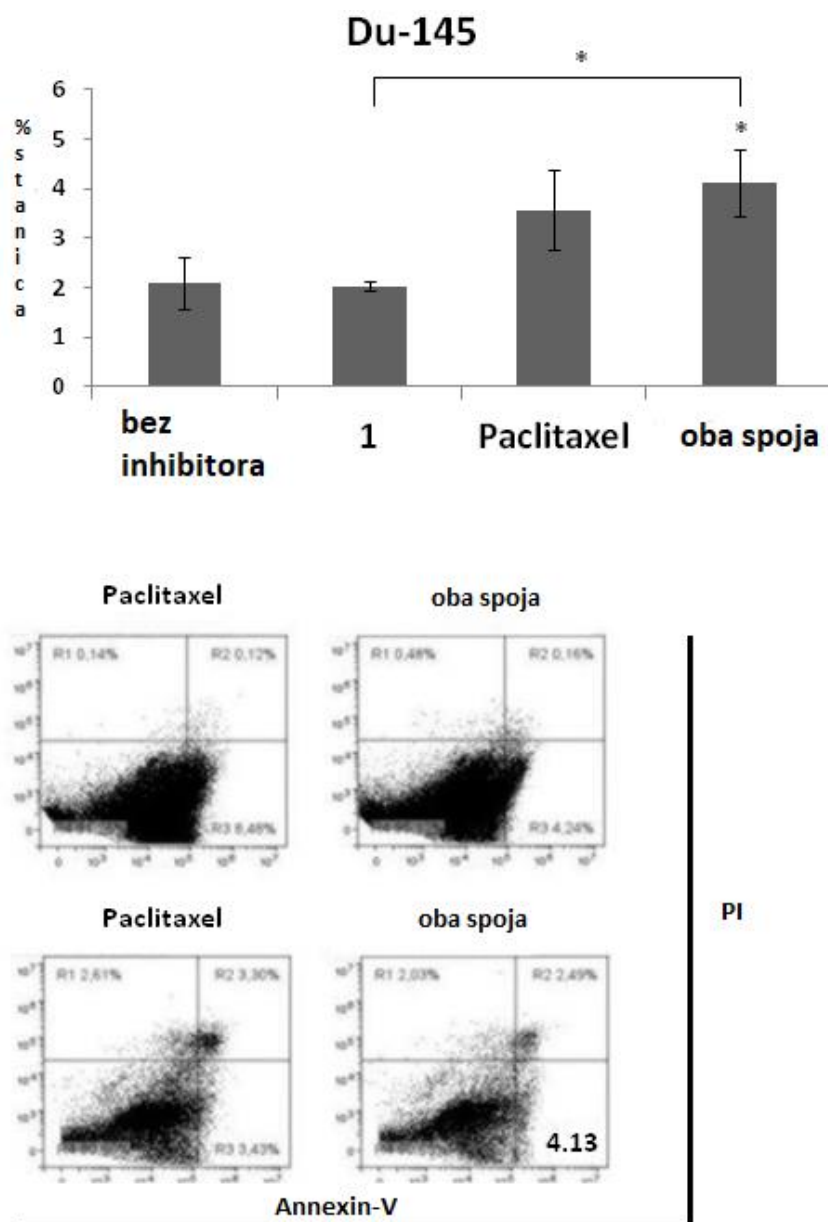




**Slika 7B.** Stanična vijabilnost nakon tretmana s novosintetiziranim spojem i paclitaxel-a.

Niže koncentracije novosintetiziranog spoja i paclitaxela nisu bile tako učinkovite nakon 4 i 24 sata. Nakon gore navedenih rezultata ispitana je vrsta stanične smrti.

Da bi se utvrdilo pokazuju li MTT rezultati posljedicu stanične smrti ili zaustavljanja staničnog ciklusa proveden je tretman stanica u kojem su one bile izlagane novosintetiziranom spoju. Njegova koncentracija iznosila je 2 μM, a koncentracija paclitaxel-a iznosila je 12 μM. Rezultat je pokazao da se postotak ranih apoptotičkih stanica Du-145 nije znatno promijenio nakon tretmana s novosintetiziranim spojem, a neznatno povećanje uočeno je nakon tretmana s paclitaxel-om (Slika 6). Međutim, najuspješnija terapija je kombinacija dvaju lijekova, novosintetiziranog spoja i paclitaxel-a. Kombinacija ova dva lijeka pokazala je značajno povećanje ranih apoptotičkih stanica u usporedbi s netretiranim stanicama. Nadalje, postotak apoptotičkih i nekrotičnih stanica također se pokazao različitim. Postotak apoptotičkih stanica Du-145 smanjen je nakon tretmana s novosintetiziranim spojem, a postotak nekrotičnih Du-145 povećan je nakon tretmana s novosintetiziranim spojem i paclitaxel-om.



**Slika 8.** Apoptoza nakon tretmana novosintetiziranim spojem i paclitaxel-om

U staničnoj liniji karcinoma prostate kao što je Du-145, pokazalo se da podskup markera uključujući CD44<sup>+</sup> i CD24<sup>-</sup>, obogaćuje matične stanice raka. Rezultati istraživanja su pokazali da liječenje samim paclitaxel-om izaziva neznačajno povećanje postotka matičnih stanica raka u usporedbi s kontrolama.

## 5. Rasprava

Glikozilacija je posttranslacijska modifikacija proteina koja ima važnu ulogu u staničnom signaliziranju, imunološkom prepoznavanju i interakciji između samih stanica. Aberantna ekspresija glikanskih struktura, kao i pojava skraćenih struktura, prekursora ili novih struktura glikana, mogu utjecati na interakcije ligand-receptor i time ometati regulaciju stanične adhezije, migracije i proliferacije, pa je tako aberantna glikozilacija jedan od znakova karcinoma (19). Daljnjim istraživanjem bi trebalo detaljnije proučiti ekspresiju GM3 i CD15s glikokonjugata na površini matičnih stanica karcinoma koje su odgovorne za povrat tumora i otpornost na terapiju.

Tijekom ovog istraživanja ustanovljeno je kako nosintetizirani spoj, 3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b] kinolin-2-karboksamid, citotoksičan za Du-145 stanice karcinoma prostate. U radu Mastelić i sur. su pomoću Annexin-V-FITC testa i kvantitativnog određivanja protočnom citometrijom pokazali da se opseg apoptoze matičnih stanica karcinoma prostate i GM3 ekspresije nije značajno promijenio nakon tretmana s nosintetiziranim spojem. Poznato je da GM3 inhibira tirozinske kinaze povezane s epidermalnim receptorom faktora rasta (EGFR) i s receptorom faktora rasta fibroblasta (FGFR). EGFR je transmembranski protein koji se aktivira vezanjem njegovih specifičnih liganda, uključujući epidermalni faktor rasta i faktor rasta transformiranja  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) (20). Nedovoljna ili prekomjerna signalizacija EGF receptora i drugih receptora tirozin kinaze povezana je s razvojem različitih oblika karcinoma. EGF receptor je funkcionalan u stanicama prostate, Du-145. Važna skupina receptora, koju također posjeduje stanična linija Du-145, su FGF receptori koji se vežu na posebnu skupinu proteina. Prilikom prijanjanja ljudskih embrijskih fibroblasta dolazi do signalizacije FGF receptora kroz fosforilaciju tirozina i induciranja proliferacije stanica u uvjetima bez seruma i bez dodavanja FGF.

Fosfolipaza C (PLC) je klasa membranskih povezanih enzima koji cijepaju fosfolipide neposredno prije fosfatne skupine (21). Postoji 13 vrsta fosfolipaza C koje su razvrstane u 6 izotopova  $\beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta$  i  $\eta$ . FGF može povećati aktivnost PLC- $\delta$  i povećati proliferaciju stanica. Zbog uzgoja stanične linije u 10% fetalnom goveđem serumu očekivalo se da će se dogoditi FGF signalizacija. PLC- $\beta$  i PLC- $\gamma$  direktno se aktiviraju aktivacijom receptora za razliku od PLC- $\epsilon$ , PLC- $\delta$ 1 i PLC- $\eta$ 1. Najvažniju funkciju ima upravo PLC- $\delta$ . Zbog djelovanja nosintetiziranog inhibitora 3-Amino-5okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b]kinolin-2-

karboksamid, kalcij oslobođen nakon djelovanja PLC- $\gamma$  ne može inducirati produljenu aktivnost PLC- $\delta$ 1 i posljedica tog djelovanja je rezultat niže proliferacije stanica i regulacija reakcije stanica. Tijekom daljnjeg istraživanja će se utvrditi povezanost odgovora stanica Du-145 na novosintetizirani spoj i odgovora na EGF receptore te ekspresija CD15s po jednoj CSC što bi u konačnici moglo značiti da niži postotak CSC posjeduje metastatski potencijal nakon PLC inhibicije, te će djelovanje paclitaxela možda sniziti postotak CD15s pozitivnih matičnih stanica karcinoma.

Što se tiče samih rezultata, postotak apoptoznih Du-145 stanica povećan je nakon tretmana s oba spoja.

## 6. Zaključak

Nakon 4 sata, tretman s 10 i 25  $\mu\text{M}$  novosintetiziranog spoja pokazao je značajno smanjenje stanične vijabilnosti Du-145 stanica u usporedbi s netretiranim stanicama. Najbolji učinak imala je kombinacija 10  $\mu\text{M}$  novosintetiziranog spoja i 25  $\mu\text{M}$  paclitaxel-a nakon 48 i 72h. Vrijednost IC50 za Du-145 stanice bila je 5,1  $\mu\text{M}$  nakon 72h tretmana. Zaključeno je kako novosintetizirani spoj citotoksičan za Du-145 stanice karcinoma prostate.

Budući je karcinom prostate jedan od najčešćih karcinoma kod muškaraca, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se došlo do pravovaljanih zaključaka i prevencije ove zloćudne bolesti. Smatram da će se u budućnosti ovakve analize i istraživanja sve više koristiti u svrhu što boljeg i kvalitetnijeg liječenja pacijenata.

## 7. Literatura

1.

Nordqvist C Prostate cancer in detail, Medical news today 2017 Nov, Available from: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/150086.php> (24.4.2018)

2.

Nordqvist C Prostate cancer in detail, Medical news today 2017 Nov, Available from: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/150086.php> (24.4.2018)

3.

Nordqvist C Prostate cancer in detail, Medical news today 2017 Nov, Available from: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/150086.php> (24.4.2018)

4.

Nordqvist C Prostate cancer in detail, Medical news today 2017 Nov, Available from: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/150086.php> (24.4.2018)

5.

Šamija M.i suradnici. Rak prostate-najvarijabilniji zloćudni tumori. Medicinska naklada Zagreb,2009 Available from: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiLupTq2oPcAhUGVywKHcbVALgQFggpMAE&url=https%3A%2F%2Fbib.irb.hr%2Fdatoteka%2F460239.Rak\\_prostate\\_prvih\\_7\\_pogStr3do22.pdf&usg=AOvVaw2EoaKZqcHey\\_rV9D88QiNh](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiLupTq2oPcAhUGVywKHcbVALgQFggpMAE&url=https%3A%2F%2Fbib.irb.hr%2Fdatoteka%2F460239.Rak_prostate_prvih_7_pogStr3do22.pdf&usg=AOvVaw2EoaKZqcHey_rV9D88QiNh) (28.6.2018.)

6

Nordqvist C Prostate cancer in detail, Medical news today 2017 Nov, Available from: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/150086.php> (24.4.2018)

7.

Jaworska D., Król W., Szliszka E. Prostate Cancer Stem Cells: Research Advances 2015 Nov; 16(11): 27433-27449. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4661894/> (9.5.2018)

8.

Autor nepoznat . Ganglioside Wikipedija 2018 Mar, Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Ganglioside> (9.5.2018)

9.

Tuccillo FM, de Laurentiis A, Palmieri C, Fiume G, Bonelli P, Borrelli A, Tassone P, Scala I, Buonaguro FM, Quinto I, Scala G. Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: focus on CD43. 2014. Feb. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Aberrant+Glycosylation+as+Biomarker+for+Cancer%3A+Focus+on+CD43> (4.6.2018.)

10

Jaworska D., Szliszka E. Targeting apoptotic activity against prostate cancer stem cells. 2017 Aug;18(8):1648 available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5578038/> (24.4.2018)

11

Marcin J. What is DMSO? 2016 Aug, Available from: <https://www.healthline.com/health/what-is-dms0> (15.5.2018.)

12.

<https://store.euroclonegroup.it/en/product/767/767---ECB9006L---RPMI20164020MEDIUM.html> (21.5.2018.)

13.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65(1-2):55-63. [PubMed] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>

14.

Autor nepoznat IC<sub>50</sub> Wikipedia 2018. May Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/IC50> (22.5.2018.)

15.

D. Batinić i sur. Protočna citometrija u hematologiji. Paediatr Croat 2006; Str.176-182 Available from: <http://hpps.kbsplit.hr/hpps-2006/pdf/dok24.pdf> (28.6.2018.)

16.

Autor nepoznat Apoptoza Wikipedija 2018 Juni, Available from: <https://bs.wikipedia.org/wiki/Apoptoza> (22.5.2018.)

17.

Autor nepoznat Apoptoza Wikipedia 2018 Juni, Available from: <https://bs.wikipedia.org/wiki/Apoptoza> (22.5.2018.)

18.

[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/apoaf?lang=en&region=HR&gclid=CjwKCAjw\\_47YBRBxEiwAYuKdw30ggyttSP5CBKeNw0r1dJnU3POXznT7CxBFQGva5No32RmRN98nRhoCIDYQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/apoaf?lang=en&region=HR&gclid=CjwKCAjw_47YBRBxEiwAYuKdw30ggyttSP5CBKeNw0r1dJnU3POXznT7CxBFQGva5No32RmRN98nRhoCIDYQAvD_BwE) (22.5.2018.)

19.

Jaggupilli A.,Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity 2012 May. available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3369436/> (30.5.2018.)

20.

Autor nepoznat Epidermal growth factor receptor Wikipedia 2018. May, Available from: [https://en.wikipedia.org/wiki/Epidermal\\_growth\\_factor\\_receptor](https://en.wikipedia.org/wiki/Epidermal_growth_factor_receptor) (5.6.2018.)

21.

Autor nepoznat Phospholipase C Wikipedia 2018. March Available from: [https://en.wikipedia.org/wiki/Phospholipase\\_C](https://en.wikipedia.org/wiki/Phospholipase_C) (5.6.2018.)



## 8. Sažetak

### Uvod:

Karcinom prostate jedan je od najčešćih karcinoma u muškoj populaciji, stoga su zbog njegovog učestalog pojavljivanja predstavljena brojna istraživanja koja nastoje poboljšati, skratiti i omogućiti što kvalitetnije liječenje pacijenta. Progresija tumora može biti potaknuta od strane matičnih stanica karcinoma. Tijekom ovog istraživanja procijenjen je metabolizam stanica pomoću MTT testa nakon primjene novosintetiziranog spoja samostalno ili u kombinaciji s paclitaxel-om. Također im je određena rana i kasna apoptoza pomoću Annexin-V i PI bojenja. Upravo se razaranje matičnih stanica karcinoma prostate smatra obećavajućim ciljem liječenja karcinoma prostate kako bi se poboljšao ishod u pacijenata s naprednim stadijem bolesti.

### Cilj:

Cilj ovog rada bio je utvrditi postotak vijabilnosti stanica karcinoma prostate Du-145 nakon tretmana s novosintetiziranim spojem (3-Amino-5okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b]kinolin-2-karboksamid) - inhibitorom fosfolipaze C.

### Materijali i metode:

Stanice Du-145 su inkubirane s novosintetiziranim spojem ili u kombinaciji s paclitaxel-om. Stanice su uzgajane u specifičnim uvjetima, a vijabilnost stanica određena je pomoću MTT testa. Vrsta stanične smrti procijenjena je nakon 48 sati pomoću Annexin-V-FITC testa i propidij jodida. Podaci su prikupljeni pomoću BD Accuri C6 citometra i analizirani korištenjem FlowLogic Softvera.

### Rezultati:

Rezultati koji su dobiveni nakon tretmana s novosintetiziranim spojem ovisili su o koncentracijama i vremenskom razdoblju tretmana. Nakon 72h, niže koncentracije novosintetiziranog spoja, u iznosu od 1  $\mu\text{M}$  pokazivale su značajnu citotoksičnost u odnosu na netretirane stanice. Također, rezultati su pokazali značajno smanjenje preživjelih stanica nakon korištenja kombinacije novosintetiziranog spoja (0,5  $\mu\text{M}$ ) i paclitaxel-a (25  $\mu\text{M}$ ) nakon 48 i 72 sata.

**Zaključak:**

Ustanovljeno je kako novosintetizirani spoj, 3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b] kinolin-2-karboksamid, citotoksičan za stanice karcinoma prostate. Također vrlo važno je spomenuti kako su prilikom korištenja novosintetiziranog spoja presudne koncentracije tog istog spoja te vremenski period u kojem je spoj korišten.

**Ključne riječi:**

Karcinom prostate, matične stanice karcinoma, novosintetizirani antitumorski spoj

## 8.1. Summary

### Introduction:

Prostate cancer is one of the most common cancer in the male population, therefore, due to its frequent occurrence, a number of researches are being carried out that seek to improve, shorten and enable the best quality of treatment for the patient. Tumor progression may be triggered by cancer stem cells (CSCs). During this study, cell metabolism was evaluated using the MTT assay after application of the newly synthesized compound alone or in combination with paclitaxel. Early and late apoptosis was also determined by using Annexin-V and PI staining. Precisely, this destruction of prostate cancer stem cells is considered as promising goal of prostate cancer treatment to improve outcome in patients with advanced stage of disease.

### Aim:

The aim of this paper was to determine the cell viability of prostate cancer cells Du-145 after treatment with the newly synthesized compound (3-Amino-5-oxo-N-naphthyl-5,6,7,8-tetrahydrothieno [2,3-b] quinoline-2-carboxamide) inhibitor of phospholipase C.

### Materials and methods:

Du-145 cells were incubated with either only newly synthesized compound or in combination with paclitaxel. The cells were cultured under specific conditions, and cell viability was determined by the MTT test. Cell death was evaluated after 48 hours using Annexin-V-FITC test and propidium iodide. The data were collected using the BD Accuri C6 cytometer and analyzed using FlowLogic Software.

### The results:

The results obtained after treatment with the newly synthesized compound depended on the concentrations and the time of treatment. After 72 hours, lower concentration of the novosynthetic compound, in the amount of 1  $\mu\text{M}$  showed significant cytotoxicity in comparison to untreated cells. Also, the results showed a significant reduction in surviving cells after using the combination of newly synthesized compound (0,5  $\mu\text{M}$ ) and paclitaxel (25  $\mu\text{M}$ ) after 48 and 72 hours.

**Conclusion:**

It has been found that newly synthesized compound, 3-amino-5-oxo-N-naphthyl-5,6,7,8-tetrahydrothieno [2,3-b] quinoline-2-carboxamide is cytotoxic to prostate cancer cells. Also, it is very important to mention while using the newly synthesized compound, the critical is concentration of the same compound and the time period in which the compound is used.

**Key words:**

prostate cancer, cancer stem cells, newly synthesized anticancer agent

## 9. Životopis

### Osobni podaci

Ime i prezime	Antea Medak
Datum rođenja	7. srpnja 1996. u Splitu
Državljanstvo	Hrvatsko
Adresa	Obala S. Radića 41. 20344 Komin
Web adresa	<a href="mailto:antea.medak@outlook.com">antea.medak@outlook.com</a>

### Školovanje

2003. – 2011.	Osnovna škola "Ivo Dugandžić-Mišić" - Komin
2011.-2015.	Srednja škola " fra Andrije Kačića-Mišića" - Ploče; Opća gimnazija,
2015.2018.	Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika Odjel zdravstvenih studija Sveučilište u Splitu

### Osobne vještine i kompetencije

Strani jezik	Engleski	Tečno
Strani jezik	Njemački	Osnovno
Korištenje računala	Napredno	

## **10. Prilozi**

### **10.1. Popis slika**

**Slika 1.** Hodogram izrade završnog rada

**Slika 2.** Prikaz novosintetiziranog antitumorskog spoja

**Slika 3** Prikaz Du 145 stanica

**Slika 4** Prikaz CO<sub>2</sub> inkubatora Nuve EC 160

**Slika 5** Prikaz MTT kolorimetrijskog testa

**Slika 6.** Prikaz BD accuri 6 citometra

**Slika 7A.** Stanična vijabilnost nakon tretmana s novosintetiziranim spojem

**Slika 7B.** Stanična vijabilnost nakon tretmana s novosintetiziranim spojem i palitaxel-a.

**Slika 8.** Apoptoza nakon tretmana novosintetiziranim spojem i paclitaxel.

### **10.2. Popis tablica**

**Tablica 1.** Prikaz novih slučajeva raka u Hrvatskoj u 2015.godini, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, registar za rak Republike Hrvatske

### 10.3. Popis kratica

**CSC** - matične stanice raka (*engl.* cancer stem cells)

**DMSO** – dimetil sulfoksid (*engl.* Dimethyl sulfate)

**DRE** - digitalno rektalni pregled (*engl.* Digital rectal examination )

**EGFR** – epidermalni receptor faktora rasta (*engl.* epidermal growth factor receptor)

**FGFR** – receptor faktora rasta fibroblasta (*engl.* fibroblast growth factor receptor)

**GM3** – monosialodihexozilgangliozid (*engl.* monosialodihexosylgangliosid )

**MTT** – kolorimetrijski test za procjenu stanične metaboličke aktivnosti (*engl.* MTT assay)

**PBS** – fosfatno puferirana fiziološka otopina (*engl.* phosphate buffered saline)

**PI** – propidij jodid (*engl.* propidium iodide)

**PKC** – protein kinaza C (*engl.* protein kinase C)

**PLC** – fosfolipaza C (*engl.* phospholipase C)

**PSA** – prostata specifični antigen (*engl.* Prostate specific antigen)

**SRB** – sulforhodamin B (*engl.* Sulforhodamine B)

**TGF  $\alpha$**  – faktor rasta transformiranja (*engl.* transforming growth factor  $\alpha$ )