

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Zdravko Odak, dr. med.**

**UTJECAJ  $C_{19}H_{16}ClN_3O_2S$  NA IZRAŽAJ**

**GLIKOSFINGOLIPIDA, CITOTOKSIČNOST, APOPTOZU I METABOLOMIKU U  
STANIČNIM LINIJAMA ADENOKARCINOMA JAJNIKA**

**DOKTORSKI RAD**

**SPLIT, 2025.**

Doktorska disertacija sadrži rezultate znanstvenih istraživanja provedenih u Laboratoriju za medicinsku kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu te Odjela za biokemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

VODITELJICA RADA: prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

## **Zahvala**

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić, na iznimnoj podršci, strpljenju i vodstvu kroz sve izazove ovog istraživanja. Vaša stručnost, motivacija i spremnost da nesebično podijelite svoje znanje ostavili su neizbrisiv trag u mom profesionalnom i osobnom razvoju. Hvala vam što ste vjerovali u mene i pružili mi priliku da učim od najbolje te vas danas nakon svega navedenoga i sati glasovnih poruka mogu zvati i mentoricom i prijateljicom.

Zahvaljujem i svim suradnicima koji su sudjelovali u istraživanju, dijelili svoje ideje, vrijeme i trud te doprinijeli uspješnom objavljivanju rezultata ovog rada. Vaša posvećenost i timski duh bili su neizmjereno vrijedni.

Mojoj obitelji, koja je uvijek bila moj oslonac, dugujem najveću zahvalnost. Mojoj supruzi Željani, čija su ljubav, razumijevanje, neiscrpna podrška i beskrajno strpljenje bili temelj moje ustrajanosti, te mojim sinovima, Špiru i Bartulu, čija su ludost, radost i osmijesi uvijek bili podsjetnik na ono što je doista važno u životu. Posebno hvala mojoj majci i ostatku obitelji, koji su mi oduvijek neizmjerena podrška na svakom polju života i koji su me „usmjerili“ prema ginekologiji od malih nogu te prijateljima koje poznajem cijeli život, a koji su svojim prisustvom i ohrabrenjem uvijek činili sve izazove izazovnijima, a zanimljivosti zanimljivijima.

Na kraju, zahvaljujem dragome Bogu na smirenosti i svim blagoslovima koji su me vodili na ovom putu.

Ova disertacija je jednako vaša koliko i moja.

# SADRŽAJ

## POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD.....	1
1.1. Epidemiologija karcinoma jajnika.....	2
1.1.1. Dobna distribucija i trendovi.....	3
1.2. Etiologija i čimbenici rizika.....	4
1.2.1. Genetski čimbenici.....	6
1.3. Patofiziologija karcinoma jajnika.....	7
1.4. Uloga matičnih stanica karcinoma (CSC).....	7
1.4.1. Stanične linije OVCAR-3 i SK-OV-3.....	8
1.4.2. Progresija karcinoma i metastaziranje.....	9
1.4.3. Otpornost na terapiju i recidiv bolesti.....	10
1.4.4. Razvoj ciljane terapije.....	11
1.5. Dijagnostika karcinoma jajnika.....	12
1.5.1. Klinički pregled, rani simptomi i klasifikacija.....	12
1.5.2. Slikovne metode.....	14
1.5.3. Tumorski markeri.....	14
1.5.4. Genetsko testiranje.....	15
1.5.5. Patohistološka analiza.....	15
1.6. Terapijski pristupi.....	16
1.6.1. Ciljane terapije i imunoterapija.....	17
1.7. Uloga glikosfingolipida u karcinomu jajnika.....	17
1.8. Novi terapijski spojevi i istraživanja.....	21
1.8.1. 3-amino- <i>N</i> -(3-kloro-2-metilfenil)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3- <i>b</i> ]kinolin-2-karboksamid.....	21
1.8.2. Metabolomika i karcinoma jajnika.....	22
2. CILJEVI I HIPOTEZE.....	24
2.1. Cilj istraživanja.....	25
2.2. Hipoteze.....	25
3. MATERIJALI I METODE.....	26
3.1. Kultura stanica karcinoma jajnika.....	27
3.2. Spoj: 3-amino- <i>N</i> -(3-klor-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3- <i>b</i> ]kinolin-2-karboksamid.....	27
3.3. Citotoksičnost.....	27

3.4.	Protočna citometrija.....	28
3.4.1.	Apoptoza .....	28
3.4.2.	Određivanje izražaja glikosfingolipida na CSC i ne-CSC jajnika .....	28
3.5.	Ekstrakcija uzorka, derivatizacija i plinska kromatografija–masena spektrometrija (GC-MS).....	29
3.6.	GC-MS pretprocesiranje podataka i statistička analiza .....	29
3.7.	Statistička analiza .....	30
4.	REZULTATI.....	31
4.1.	Citotoksičnost Spoja 1 .....	33
4.2.	Programirana stanična smrt—apoptoza.....	34
4.3.	Matične stanice karcinoma (CSC).....	36
4.4.	Izražaj GSL-a na CSC i ne-CSC karcinoma jajnika.....	37
4.5.	Metabolomika .....	41
4.6.	Toksikološki profil tieno[2,3- <i>b</i> ]piridina .....	45
5.	RASPRAVA .....	47
6.	ZAKLJUČCI.....	53
7.	REFERENCE.....	55
8.	SAŽETAK .....	74
9.	SUMMARY .....	76
10.	ŽIVOTOPIS.....	78

**POPIS OZNAKA I KRATICA**

IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc <sub>4</sub> Cer	gangliozyd neolaktoserije sa sijalinskom kiselinom vezanom glikozidnom vezom $\alpha(2\rightarrow3)$ za četvrti glikozidni ostatak, NeuAc $\alpha(2\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow3)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc $\beta$ -Cer
A4GALT	laktozilceramid 4-alfa-galaktoziltransferaze od engl. <i>alpha-1,4-galactosyltransferase</i>
ABCG2	član 2 adenozni trifosfat-vezujuće klaster podobitelji G od engl. <i>Adenosine triphosphate binding cassette subfamily G member 2</i>
<i>BRCA1/2</i>	tumor supresorski geni, od engl. <i>BReast Cancer gene 1/2</i>
CD	razlikovna skupina, od engl. <i>Cluster of Differentiation</i>
CSC	matične stanice raka, od engl. <i>Cancer Stem Cells</i>
DAG	diacilglicerol
DMEM	medij za uzgoj staničnih kultura, od engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ECIS	Europski informacijski centar, od engl. <i>European Cancer Information System</i>
ECM	izvanstanični matriks, od engl. <i>Extracellular matrix</i>
eEF2K	kinaze za elongaciju eukariotskog čimbenika 2, od engl. <i>eukaryotic Elongation Factor-2 Kinase</i>
EGF	čimbenik rasta epidermalnih stanica, od engl. <i>Epidermal growth factor</i>
FBS	fetalni goveđi serum, od engl. <i>Fetal bovine serum</i>
FGF	čimbenik rasta fibroblasta, od engl. <i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	fluorescein izotiocijanat
GalNAc-GM1b	gangliozyd, N-acetilgalaktozaminil GM1b, IV <sub>3</sub> Neu5Ac-Gg <sub>5</sub> Cer, GalNAc $\beta(1\rightarrow4)$ (NeuAc $\alpha(2\rightarrow3)$ )Gal $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc $\beta(1\rightarrow4)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc $\beta$ -Cer
Gb <sub>4</sub> Cer	globotetraozilceramid, GalNAc $\beta(1\rightarrow3)$ Gal $\alpha(1\rightarrow4)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc $\beta(1\rightarrow1)$ Cer
GC-MS	plinska kromatografija–masena spektrometrija od engl. <i>Gas chromatography–Mass spectrometry</i>
GD3	gangliozyd, II <sub>3</sub> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -LacCer, NeuAc $\alpha(2\rightarrow8)$ NeuAc $\alpha(2\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc $\beta$ -Cer
GFR	superobitelj receptora čimbenika rasta, od engl. <i>Growth Factor Receptor</i>

Gg <sub>3</sub> Cer	gangliotriaozilceramid, GalNAcβ(1→4)Galβ(1→4)Glcβ(1→1)Cer
GM2	gangliozid, II3Neu5Ac-GalNAcβ(1→4)Galβ(1→4)Glcβ(1→1)Cer, GalNAcβ(1→4)(NeuAcα(2→3))Galβ(1→4)Glcβ-Cer
GM3	gangliozid, II3Neu5Ac-LacCer, NeuAcα(2→3)Galβ(1→4)Glcβ-Cer
GMI	geometrijska srednja vrijednost intenziteta fluorescencije, od engl. <i>Geometric Mean Intensity</i>
GPCR	receptor povezan s G proteinom, od engl. <i>G Protein Coupled Receptor</i>
GSL	glikosfingolipidi
HE4	humani epididimalni protein 4
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
IC <sub>50</sub>	koncentracija koja smanjuje preživljenje stanica za 50%, od engl. <i>the half maximal inhibitory concentration</i>
ITGA6	integrin α-6
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid
MSEA	analiza obogaćivanja metaboličkog skupa, od engl. <i>Metabolite Set Enrichment Analysis</i>
nLc <sub>4</sub> Cer	neolaktotetraoza, Galβ(1→4)GlcNAcβ(1→3)Galβ(1→4)Glcβ(1→1)Cer
ne-CSC	ne-matične stanice raka, od engl. <i>Non-Stem Cancer Cells</i>
OKPH	oksidativna fosforilacija, od engl. <i>Oxidative phosphorylation</i>
P-gp	P-glikoprotein
P2Y <sub>12</sub> R	receptor trombocita za ADP (adenozin 5'difosfat), od engl. <i>Platelet P2Y<sub>12</sub> Receptor</i>
PARP	Poli (ADP-riboza) polimeraza, od engl. <i>poly(ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	fosfatni pufer, od engl. <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PC 1/2	glavna komponenta 1/2, od engl. <i>principal component 1/2</i>
PCA	analiza glavnih komponenti, od engl. <i>Principal component analysis</i>
PDGF	čimbenik rasta trombocita od engl. <i>Platelet-derived growth factor</i>

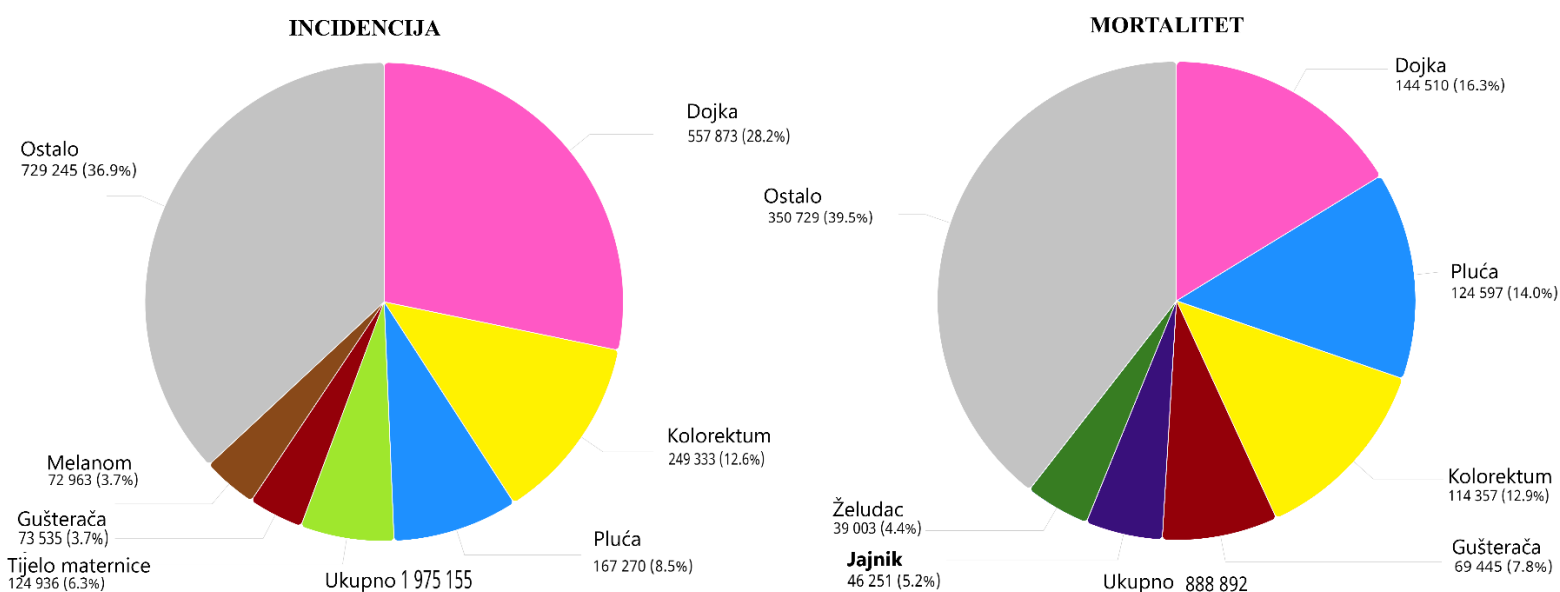


PFS	vrijeme bez progresije bolesti, od engl. <i>Progression-free survival</i>
PIM-1	serin/treonin kinaza, provirusno umetanje u kinaze mišjeg limfoma, od engl. <i>proviral insertion in murine lymphoma kinases</i>
TCA	trikarboksilna kiselina, od engl. <i>Tricarboxylic acid</i>
vHTS	probir na temelju računalnog modeliranja metodom vHTS, od engl. <i>virtual High Throughput Screen</i>
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija od engl. <i>World health organisation</i>

## **1. UVOD**

### 1.1. Epidemiologija karcinoma jajnika

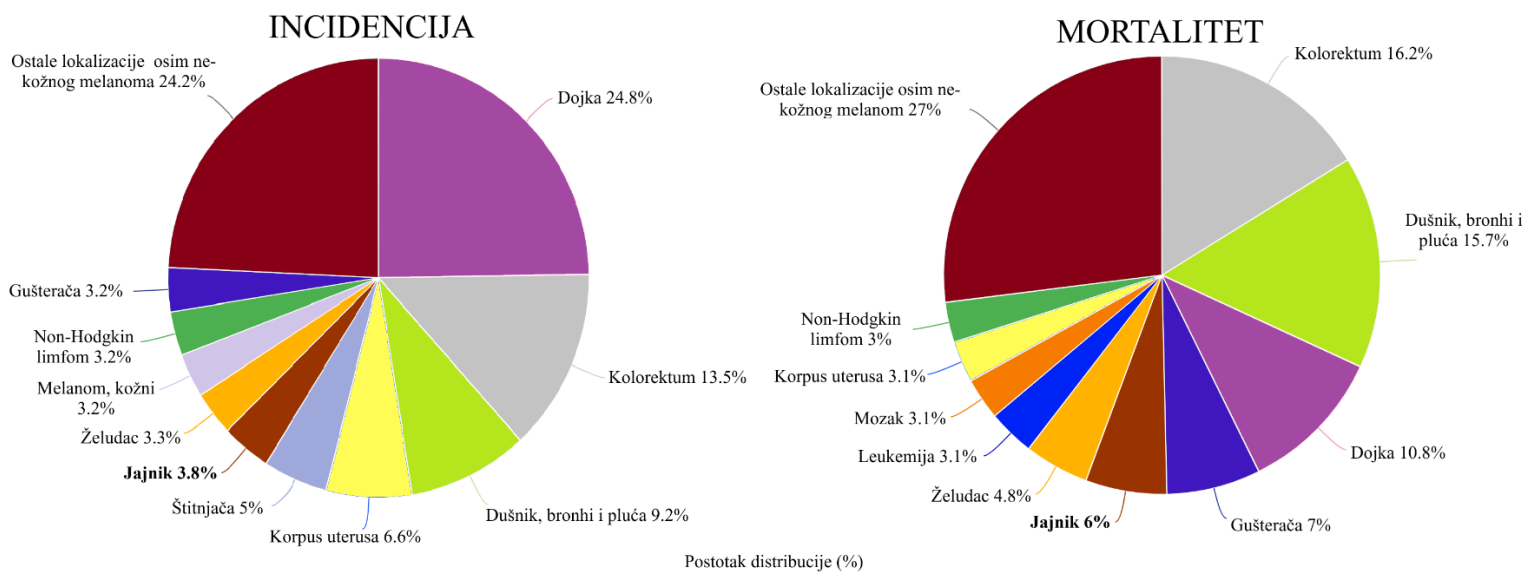
Karcinom jajnika predstavlja jedan od najsmrtonosnijih ginekoloških maligniteta, kako u svijetu tako i u Hrvatskoj. Globalno, prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), godišnje se dijagnosticira oko 295,000 novih slučajeva, a približno 185,000 žena umire od ove bolesti (1, 2). U Europi, karcinom jajnika je sedmi najčešći karcinom kod žena (odmah nakon dojke, kolona, pluća, endometrija, gušterače i melanoma), a po mortalitetu je na petom mjestu, između karcinoma gušterače i želuca (Slika 1) (1, 3).



**Slika 1.** Distribucija incidencije sedam najuobičajenijih karcinoma i ostalih karcinoma kod žena te distribucija mortaliteta kao posljedice karcinoma u Europi u 2022. godini prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije.

Izvor podataka: WHO: Cancer today (1) Napomena: WHO – Svjetska zdravstvena organizacija *od engl.* World health organisation

Prema Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo (HZJZ) i European Cancer Information System-u (ECIS), najčešći novodijagnosticirani karcinomi u Hrvatskoj 2022. godine su bili karcinom dojke (3018 novih slučajeva odnosno 24,8%), potom kolorektuma (1692; 13,5%), pluća (1157; 9,2%), endometrija (825; 6,6%), štitnjače (623; 5,0%) i jajnika (476; 3,8%). (Slika 2) (4). Navedeni podatci ukazuju na to da je stopa incidencije oboljenja od karcinoma jajnika 23 na 100,000 žena (5). U usporedbi s ostalim zemljama članicama Europske unije, prema procjenama za 2022. godinu, Hrvatska se nalazi na petom mjestu po stopi incidencije i po stopi smrtnosti od karcinoma jajnika (1, 3).



**Slika 2.** Distribucija incidencije najuobičajenijih karcinoma i ostalih karcinoma kod žena te distribucija mortaliteta kao posljedice karcinoma u Hrvatskoj u 2022. godini prema podacima ECIS.

IZVOR podataka: ECIS (4) Napomena: ECIS - European Cancer Information System

Mortalitet od karcinoma jajnika u Hrvatskoj je visok; prema najnovijim podacima iz CONCORD-3 studije, koja prati preživljenje oboljelih od karcinoma u Europi, petogodišnje preživljenje žena u Hrvatskoj kojima je karcinom jajnika dijagnosticiran u razdoblju od 2010. do 2014. godine iznosi 36%, što je ispod europskog prosjeka od 45%, a to Hrvatsku svrstava na 23. mjesto među 28 europskih zemalja (6). Razlog tome je uglavnom kasna dijagnoza bolesti, kada su već prisutne metastaze (7).

### 1.1.1. Dobna distribucija i trendovi

Karcinom jajnika najčešće pogađa žene u postmenopauzi, s vršnom incidencijom između 55. i 65. godine života, kako u Europi tako i u Hrvatskoj (8). To se objašnjava hormonalnim promjenama koje se događaju tijekom i nakon menopauze, kao i smanjenjem zaštitnih faktora poput trudnoća i dojenja koji su povezani s manjim rizikom od razvoja karcinoma jajnika (9, 10). Međutim, može se javiti i kod mlađih žena, uključujući one u reproduktivnoj dobi, iako je to znatno rjeđe (10). U Hrvatskoj, analiza trendova incidencije pokazuje blagi porast broja slučajeva u posljednjih deset godina, što se može pripisati boljoj dijagnostici koja omogućava

ranije i preciznije prepoznavanje bolesti, ukoliko se obavi na vrijeme, ali i promjenama u životnim navikama poput odgađanja majčinstva, smanjene plodnosti te povećane izloženosti hormonskim tretmanima koji mogu također doprinijeti većem riziku od razvoja bolesti (5, 11, 12).

## 1.2. Etiologija i čimbenici rizika

Tumor jajnika je izrazito heterogena bolest s nekoliko histoloških podtipova, od kojih epitelni karcinomi čine približno 90% svih slučajeva. (9) Unutar te grupe, na temelju histopatologije i molekularnih genetskih promjena serozni karcinomi su najčešći, a zatim slijede endometrioidni, svjetlostanični i mucinozni podtipovi (10). Detaljnije, serozni karcinom jajnika visokog stupnja (70%), endometrioidni (10%), svjetlostanični (10%), mucinozni (3%) i serozni niskog stupnja karcinomi (<5%) čine više od 95% slučajeva (13, 14). Serozni karcinomi, posebice visoko-gradusni serozni karcinom, najčešće se javljaju kod žena starijih od 50 godina, posebno u postmenopauzi. S druge strane, mucinozni i svjetlostanični podtipovi mogu se pojaviti i kod mlađih žena, iako su općenito rjeđi (15). Prema njihovoj invazivnosti i agresivnosti, karcinomi jajnika se u osnovi dijele na dva tipa: tip I niskog stupnja i tip II visokog stupnja (Tablica 1) (16).

**Tablica 1.** Podjela raka jajnika i neke karakteristike prema Testa i sur. (16)

Tumor	Tip	Porijeklo stanica	Prekursor	Češće mutacije	Obiteljski rizik
Endometrioidni	I	Epitel endometrija	Endometrioidni i borderline	<i>ARID1A, PIK3CA, TERT</i>	Lynchovsy
Svijetlostanični	I	Epitel endometrija	Endometrioidni i borderline	<i>ARID1A, PIK3CA, PTEN, CTNNB1, KRAS, TP53</i>	Lynchovsy.
Mucinozni	I	Nepoznato	Cistadenom, Brennerov ili mucinozni borderline	<i>KRAS, TP53, CDKN2A, BRAF, RNF43</i>	Nepoznato

Brennerov	I	Prijelazne poput-jajovoda	Benigni Brennerov	Sporadične mutacije	Nepoznato
Serozni niskog stupnja	I	Progenitor jajovoda ili žljezdani epitel	Serozni borderline	<i>KRAS, NRAS, BRAF, EIF1AXUSP9X, FFAR1, NF1, HRAS</i>	Nepoznato
Seromucinozni	I	Isto kao endometrioidni, serozni niskog stupnja ili mucinozni	Isto kao endometrioidni, serozni niskog stupnja ili mucinozni	<i>KRAS, PIK3CA, PTEN, ARID1A</i>	Nepoznato
Serozni visokog stupnja	II	Progenitor jajovoda ili žljezdani epitel	<i>STIC, SCOUT, TP53</i> biljeg	<i>TP53, BRCA1, BRCA2, CNAs, PTEN</i> delecija, <i>RBI</i> i <i>NF1</i> gubitak	<i>BRCA1/2, BRIP1, PALB1, RAD51C</i> i <i>RAD51D</i>
Ovarijski karcinosarkom	II	Nepoznato	Nepoznato	<i>TP53, PIK3CA, KRAS, PTEN, BCOR</i> , histon <i>H2</i> i <i>H2B, CHD4</i> ,	Nepoznato
Granulozastanični	Adultni Juvenilni	Granulozastanice	Nepoznato	<i>FOX2L</i> u 87% odraslih	Nepoznato
Sertoli-Leydigov	NA	Granuloza ili druge stromalne	Bez	<i>DICER1</i>	<i>DICER1</i> sy
Sitnostanični, hiperkalcemični tip	NA	Rezidnetne stanice ovarija	Bez	<i>SMARCA4</i>	<i>RTPS2</i>

Fibroidni	NA	Stromalne	Bez	/	Bez
-----------	----	-----------	-----	---	-----

Napomena: sy, sindrom; NA, ne može se odrediti

Etiologija karcinoma jajnika je multifaktorijalna, a glavni čimbenici rizika uključuju:

- Genetsku predispoziciju: Mutacije u *BRCA1* i *BRCA2* genima značajno povećavaju rizik razvoja karcinoma jajnika (17). U Hrvatskoj, učestalost ovih mutacija među pacijenticama iznosi oko 10-12% (18).
- Obiteljsku anamnezu: Prisutnost karcinoma jajnika ili dojke u obitelji povećava rizik od oboljenja (19).
- Reproktivne čimbenike: Rana menarha, kasna menopauza, izostanak trudnoće i neplodnost povezani su s većim rizikom (20).
- Hormonske čimbenike: Dugotrajna upotreba hormonske nadomjesne terapije nakon menopauze može povećati rizik iako su podatci oprečni (21).
- Životne navike: Pušenje, pretilost i prehrana bogata zasićenim mastima također su povezani s većim rizikom (20).

Najsnažniji prediktori smanjenog rizika od karcinoma jajnika su dojenje, podvezivanje jajovoda, histerektomija, uporaba kontracepcijskih pilula i bilateralna adnektomija (21–23).

### 1.2.1. Genetski čimbenici

*BRCA1* i *BRCA2* su tumor supresorski geni čije mutacije dovode do smanjenog kapaciteta stanica za popravak oštećenja DNA i povećavaju rizik od karcinoma jajnika i dojke (24, 25). Do 15% pacijenata sa seroznim karcinomom jajnika, jajovoda ili peritoneja visokog stupnja ima mutaciju u *BRCA* genima (17, 26, 27). Žene s *BRCA1* mutacijom imaju između 39% i 46% šanse razviti karcinom jajnika do 70. godine života, dok *BRCA2* mutacija nosi rizik od 10% do 27% (27). Jasna povezanost utvrđena je između pacijentica s karcinomom jajnika i dojke te onih sa sindromom policističnih jajnika (PCOS), posebno u kontekstu razine spolnih hormona i neplodnosti (28). Prema molekularnim nalazima, kod obje skupine žena često se pronalaze mutacije u *BRCA* genima (28, 29). *BRCA* mutacije su također povezane s povećanom osjetljivošću na kemoterapiju na bazi platine, iako ove pacijentice često razvijaju otpornost na terapiju nakon relapsa (30). Ostali genetski čimbenici uključuju mutacije u genima *RAD51C*, *RAD51D* i *BRIP1*, koji također povećavaju rizik za rak (27). U Hrvatskoj je provedeno nekoliko studija koje su utvrdile značajnu prisutnost ovih mutacija u populaciji, što ukazuje na

potrebu za genetskim testiranjem i savjetovanjem u svrhu boljeg i uspješnijeg liječenja (5, 30–32).

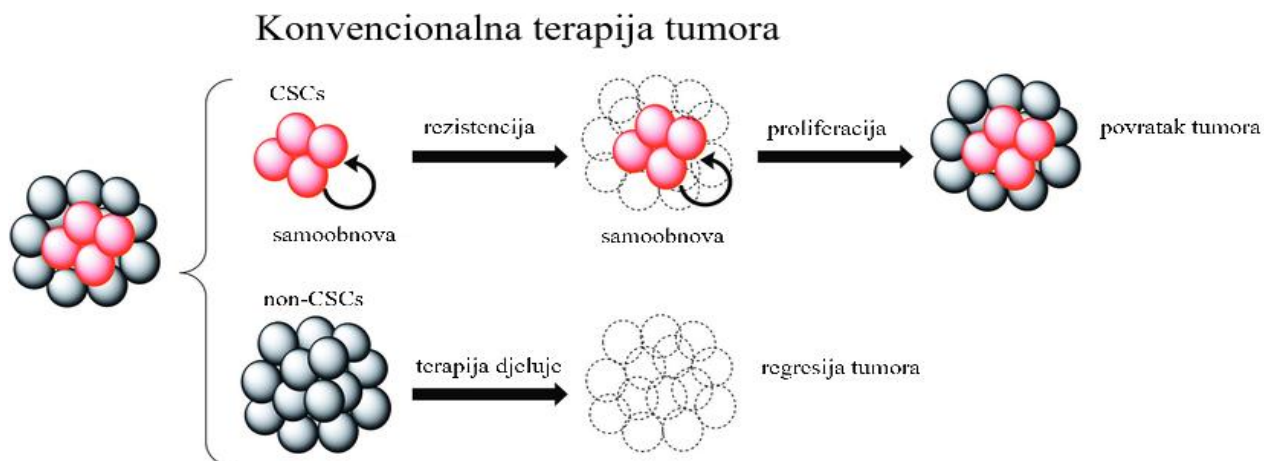
### **1.3. Patofiziologija karcinoma jajnika**

Patogeneza bolesti uključuje niz složenih genetskih i epigenetskih promjena koje utječu na ključne stanične procese poput proliferacije, apoptoze i popravka DNA (33,34). Na molekularnoj razini, disregulacija signalnih puteva poput PI3K/AKT/mTOR i RAS/RAF/MEK/ERK sudjeluje u progresiji karcinoma jajnika (34). Ovi signalni putevi kontroliraju stanični rast, preživljavanje i angiogenezu, proces kojim karcinomi stvaraju nove krvne žile za opskrbu hranjivim tvarima (35, 36). U mnogim slučajevima, posebno kod seroznih karcinoma visokog gradusa, dolazi do mutacija u *p53* genu, što dodatno otežava kontrolu nad rastom karcinoma i smanjuje učinkovitost standardnih terapija (36). Mutacije u genima koji imaju ključnu ulogu u popravku DNA putem homolognog rekombiniranja, poput *RAD51C*, *RAD51D* i *BRIP1*, također povećavaju rizik od razvoja karcinoma jajnika - ovi geni, odnosno njihova mutacija, mogu dovesti do nakupljanja genetskih oštećenja i progresije bolesti (36, 37). Nedavna istraživanja fokusirala su se na kombiniranje terapija poput inhibitora poli-ADP-riboza polimeraze (PARP) i inhibicije angiogeneze (npr. kroz inhibitore VEGF-a) kako bi se poboljšala stopa preživljenja pacijentica s mutacijama *BRCA* gena (31, 36–39).

### **1.4. Uloga matičnih stanica karcinoma (CSC)**

Matične stanice karcinoma (od engl. *cancer stem cells*, CSC) imaju ključnu ulogu u razvoju, progresiji i terapijskoj otpornosti karcinoma jajnika (22, 40). Njihova uloga u ovim procesima temelji se na karakteristikama koje dijele s normalnim matičnim stanicama, uključujući sposobnost samoobnavljanja, diferencijacije i održavanja heterogene populacije stanica unutar karcinoma (41). Ove stanice mogu prolaziti kroz asimetričnu diobu, pri čemu jedna stanica ostaje u stanju matične stanice, dok se druga diferencira u zrele stanice koje čine glavninu karcinomskog tkiva. Ova dioba omogućava CSC ne samo migraciju tumora već i održavaju njegov kontinuirani rast te konačno i relaps (Slika 3) (42, 43).





**Slika 3.** Asimetrična dioba CSC unutar tumorskog tkiva zbog koje može doći do relapsa bolesti nakon liječenja.

PREVEDENO I PREUZETO S: Terraneo i sur. Novel Therapeutic Strategies for Ovarian Cancer Stem Cells (43) Licenca: Creative Commons Attribution License (CC BY)

#### 1.4.1. Stanične linije OVCAR-3 i SK-OV-3

Nekoliko tumorskih staničnih linija karcinoma jajnika koristi se u svrhu istraživanja, od kojih su se u ovom istraživanju koristile stanične linije OVCAR-3 i SK-OV-3 adenokarcinoma jajnika. Stanične linije OVCAR-3 i SK-OV-3 su među najkorištenijim modelima za istraživanje karcinoma jajnika, osobito zbog svojih karakterističnih molekularnih profila, otpornosti na terapije i sposobnosti metastaziranja (44).

OVCAR-3 (HTB-161) stanična linija izolirana je iz ascitesa pacijentice s uznapredovalim seroznim karcinomom jajnika otpornim na brojne kemoterapeutike i dostupne su u komercijalnim bankama poput ATCC (American Tissue Culture Collection) (45–47). Uzgajaju se u DMEM mediju za uzgoj staničnih kultura obogaćenom fetalnim goveđim serumom (FBS), inzulinom i antibioticima. Optimalna temperatura za uzgoj je 37°C uz atmosferu s 5% CO<sub>2</sub> te zahtijevaju dodatak inzulina zbog inzulinske ovisnosti (48). Ove stanice imaju visoki izražaj estrogenskih receptora, a manje progesteronskih, što ih čini korisnim modelom za istraživanje hormonske terapije (49). OVCAR-3 pokazuje otpornost na širok spektar kemoterapijskih lijekova, uključujući cisplatin, adriamicin i metotreksat, čime je ključna u istraživanju mehanizama kemorezistencije. Koristi se u pretkliničkim ispitivanjima novih ciljanih terapija, uključujući inhibitore PI3K/AKT/mTOR signalnog puta (50).

SK-OV-3 (HTB-77) stanična linija izolirana je iz slabo diferenciranog adenokarcinoma jajnika pacijentice, pri čemu su stanice neosjetljive na cisplatin te je dostupna u bankama stanica poput ATCC (45, 46, 51). SK-OV-3 stanice uzgajaju se u McCoy's 5A mediju obogaćenom FBS-om. Kao i OVCAR-3, uzgajaju se na 37°C s 5% CO<sub>2</sub>. Ove stanice su visoko migratorne i invazivne, što ih čini pogodnima za studije metastaziranja (49). Ne eksprimiraju visoke razine estrogenskih ili progesteronskih receptora, ali eksprimiraju značajne razine HER2/neu receptora, što ih čini korisnim modelom za istraživanje HER2 pozitivnih karcinoma (52). Također, SK-OV-3 pokazuje visok stupanj otpornosti na cisplatin i druge platinaste spojeve, kao i na paklitaksel, što ih čini idealnim modelom za istraživanje otpornosti na kemoterapiju u metastatskom karcinomu jajnika (53, 54).

#### **1.4.2. Progresija karcinoma i metastaziranje**

Jedna od bitnih karakteristika CSC u karcinomu jajnika je njihova sposobnost da iniciraju metastaziranje, što je glavni uzrok smrtnosti kod pacijentica s karcinomom jajnika (55). CSC imaju veći potencijal za migraciju i invaziju u okolna tkiva, što im omogućava da napuštaju primarni karcinom, cirkuliraju kroz krvotok ili limfni sustav i formiraju sekundarna tumorska žarišta u drugim dijelovima tijela (56). Proces migracije i invazije često su potpomognuti aktivacijom signalnih putova kao što su Wnt, Notch i Hedgehog, koji služe za održavanje funkcije matičnih stanica (57). Ova tri signalna puta igraju sinergističku ulogu u održavanju CSC i njihovoj otpornosti na standardne terapije, čime doprinose recidivu i metastaziranju karcinoma (58). Također jedan od ključnih prenositelja signala unutar stanica jest fosfolipaza C (PLC), odnosno izoenzim unutar obitelji fosfolipaze C naziva fosfolipaza C gama (PLC- $\gamma$ ) (59). Djeluje u odgovoru na stimulaciju putem receptora tirozin kinaze, uključujući receptore za rast, poput čimbenika rasta epidermalnih stanica (EGF), čimbenika rasta trombocita (PDGF) i čimbenika rasta fibroblasta (FGF) (59). Nakon vezanja liganda na receptore tirozin kinaze, dolazi do fosforiliranja i aktivacije PLC- $\gamma$  (60). Potom, PLC- $\gamma$  razgrađuje fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (PIP<sub>2</sub>) u diacilglicerol (DAG) i inozitol trifosfat (IP<sub>3</sub>), slično kao i drugi izoenzimi PLC (PLC- $\alpha$  i PLC- $\beta$ ) te se pokreću dvije važne signalne osi: DAG aktivira protein kinazu C (PKC) što dalje vodi do aktivacije nizvodnih signalnih molekula koje potiču proliferaciju i sprječavaju apoptozu, dok IP<sub>3</sub> uzrokuje otpuštanje kalcija iz endoplazmatskog retikuluma (61–63). Kalcijeve signalne kaskade su uključene u migraciju i preživljavanje tumorskih stanica, što PLC- $\gamma$  čini ključnim regulatorom u procesu metastaziranja kod karcinoma jajnika (63).

Kalcij također sudjeluje u aktivaciji kalmodulinski ovisnih enzima, koji podržavaju preživljavanje CSC pod stresom, uključujući terapijski stres izazvan kemoterapijom (64).

Osim toga, PLC- $\gamma$  je uključen u aktivaciju Ras/MAPK signalnog puta, koji dodatno regulira proliferaciju CSC i njihov potencijal za invaziju (65). Ova interakcija između PLC- $\gamma$  i MAPK puta potiče maligni fenotip karcinomskih stanica, olakšava njihovu prilagodbu u različitim mikrookruženjima, i omogućava im izbjegavanje apoptoze (62). Signalizacija putem PLC povezana je s aktivacijom i drugih signalnih putova, uključujući MAPK/ERK i AKT/mTOR signalne kaskade, koje reguliraju proliferaciju, otpornost na apoptozu i održavanje stanične plastičnosti (66).

S obzirom na ulogu PLC- $\gamma$  u staničnom preživljavanju i migraciji, smatra se važnom terapijskom metom (67). Inhibicija PLC- $\gamma$  može smanjiti invazivnost CSC i oslabiti njihov metastatski potencijal, čime bi se smanjila sposobnost širenja karcinoma jajnika (68). Pretklinička istraživanja usmjerena na inhibitore PLC- $\gamma$  pokazala su obećavajuće rezultate u smanjenju proliferacije tumorskih stanica i poboljšanju terapijskih odgovora na standardne tretmane (69, 70).

Integracija PLC- $\gamma$  signalizacije s drugim putevima kao što su AKT/mTOR i ERK te PI3K/AKT, Notch, Wnt i Hedgehog, pojačava ulogu PLC- $\gamma$  u održavanju stanične otpornosti na terapiju, te stoga inhibicija PLC- $\gamma$  u kombinaciji s inhibitorima drugih signalnih puteva može dovesti do učinkovitijeg eliminiranja CSC i spriječiti recidiv i metastaziranje (58, 71).

### **1.4.3. Otpornost na terapiju i recidiv bolesti**

CSC u karcinomu jajnika pokazuju visoku razinu otpornosti na konvencionalne terapije poput kemoterapije i zračenja (17). Ova otpornost temelji se na nekoliko mehanizama. Prvo, CSC imaju sposobnost aktiviranja mehanizama za popravak oštećene DNK, čime izbjegavaju smrt stanica uzrokovanu terapijom. Drugo, zbog sporijeg ciklusa diobe stanica, matične stanice karcinoma izbjegavaju učinke kemoterapijskih agensa koji ciljaju brzorastuće stanice (72–74).

Uz to, CSC izražavaju visoke razine proteina za prijenos lijekova, poput ABC transportera, koji izbacuju kemoterapijske agense iz stanica prije nego što oni mogu izazvati smrt. Još jedan od važnijih transportera u ovom procesu je P-glikoprotein (P-gp), koji igra značajnu ulogu u višestrukoj rezistenciji CSC na lijekove (74, 75). P-gp djeluje kao ATP-ovisni transporter, izbacujući širok raspon kemoterapijskih agenasa iz stanica prije nego što oni mogu izazvati smrt karcinomskih stanica, što značajno smanjuje učinkovitost terapije (75–77). Istraživanja

pokazuju da je prekomjerni izražaj P-gp prisutna u mnogim vrstama tumora, pa tako i s karcinomom jajnika i direktno je povezana s neuspjehom kemoterapije (78). Razni citotoksični lijekovi koji ciljaju replikaciju DNK, kao i novi terapijski agensi, često su mete P-gp-a koji ih izbacuje iz stanica, smanjujući njihovu učinkovitost. Međutim, u kliničkim ispitivanjima suzbijanje P-gp nije donijelo očekivane rezultate (79).

Zbog svoje otpornosti na terapiju, CSC često preživljavaju inicijalne tretmane i ostaju latentni unutar tijela pacijentice (78). Nakon završenih konvencionalnih terapija, preostale stanice mogu uzrokovati povratak bolesti, često u agresivnijem obliku, budući da su razvile otpornost na uobičajene tretmane. Ovdje je od presudne važnosti uloga površinskih biljega specifičnih za CSC, koji omogućuju identifikaciju i ciljanje tih stanica (80). CD biljezi su molekule koje se nalaze na površini stanica i služe kao prepoznatljivi proteini koji pomažu u identifikaciji specifičnih tipova stanica, uključujući CSC u karcinomu jajnika. Klinički podaci pokazuju da pacijentice s većim izražajem CSC biljega, poput CD44 i CD133, imaju veću vjerojatnost recidiva i lošiji ukupni ishod liječenja (80–82). U istraživanjima karcinoma jajnika, najčešće korišteni CD biljezi su CD44, CD49, CD133 i ALDH (aldehid dehidrogenaza) (82, 83). U našem istraživanju fokusirali smo se na biljeg CD49 koji je poznat i kao integrin alfa-6 (ITG $\alpha$ 6). On predstavlja ključnu komponentu integrinskih kompleksa koji omogućuju stanicama interakciju s izvanstaničnim matriksom (ECM) (84). CD49 igra značajnu ulogu u adheziji stanica karcinoma na bazalne membrane, posebno putem vezivanja za laminin (85). Ova interakcija omogućava stanicama karcinoma da se uspješno vežu na ECM i okolna tkiva, čime promoviraju invaziju i metastaziranje te samim time visoki izražaj CD49 korelira s povećanim migracijskim i invazivnim sposobnostima tumorskih stanica (86, 87). Ovaj biljeg je također identificiran kao pokazatelj lošije prognoze u pacijentica s karcinomom jajnika, jer CD49<sup>+</sup> stanice imaju veću otpornost na standardne terapije, uključujući kemoterapiju na bazi platine (58, 61, 62).

#### **1.4.4. Razvoj ciljane terapije**

Zbog ključne uloge CSC u otpornosti na terapiju i ponovnoj pojavi karcinoma, razvoj terapijskih pristupa koji ciljano djeluju na ove stanice postao je fokus suvremenih istraživanja karcinoma jajnika (88). Inhibicija signalnih putova poput Notch, Wnt i Hedgehog i kaskadnog puta PLC- $\gamma$ , koji su kritični za održavanje funkcije CSC, pokazala je obećavajuće rezultate u pretkliničkim studijama (59, 69). Ovi signalni putovi kontroliraju proliferaciju i održavanje

CSC, a njihova inhibicija može smanjiti sposobnost CSC da prežive terapijske izazove i izazovu metastaziranje (90). Također, kombinacija standardnih terapija s inhibitorima ABC transportera ili epigenetskim modulacijama, usmjerenim na "isključivanje" gena koji omogućuju otpornost CSC, mogla bi dovesti do dugotrajnijih odgovora na liječenje i smanjenja stope recidiva (91). Ovaj višeslojni pristup CSC kao ciljevima terapije pruža novi put prema učinkovitijem liječenju karcinoma jajnika. Međutim, i dalje su potrebna opsežna klinička ispitivanja kako bi se potvrdila sigurnost i učinkovitost tih novih terapija (92, 93).

## **1.5. Dijagnostika karcinoma jajnika**

Karcinom jajnika, kao jedan od najsmrtonosnijih ginekoloških tumora, predstavlja velik izazov u dijagnostici zbog nespecifičnih simptoma koji se često javljaju tek u uznapredovalim fazama bolesti (stadij III ili IV) (2). Prema podacima iz Europske unije, samo oko 15% žena s karcinomom jajnika dijagnosticira se u stadiju I, dok se više od 60% slučajeva otkriva tek kada je bolest već značajno proširena (94). Dijagnoza se postavlja kombinacijom kliničkih pregleda, slikovnih metoda i laboratorijskih analiza, dok konačna potvrda dijagnoze zahtijeva patohistološku analizu uzoraka tkiva (95). Dijagnostika karcinoma jajnika još uvijek pati od niske specifičnosti i osjetljivosti dostupnih testova, što je veliki problem u ranom otkrivanju bolesti kada je prognoza kudikamo povoljnija (96). U ranim fazama (stadij I), petogodišnja stopa preživljenja može dosegnuti i do 92%, dok u kasnijim fazama (stadij III i IV) preživljenje pada na 30-40% (97).

### **1.5.1. Klinički pregled, rani simptomi i klasifikacija**

Klinički kontekst ranog otkrivanja karcinoma jajnika suočava se s ozbiljnim izazovima zbog nedostatka specifičnih simptoma u početnim fazama bolesti pa se samo kod 20% pacijentica karcinom jajnika dijagnosticira u fazama I ili II (98). Simptomi poput nadutosti, nelagode u trbuhu, promjena u funkciji crijeva (npr. proljev ili zatvor) te promjena u mokraćnim navikama (npr. učestalo mokrenje ili osjećaj neodgodive potrebe za mokrenjem) često su blagi i mogu se povezati s brojnim benignim stanjima, uključujući sindrom iritabilnog crijeva, upalne bolesti zdjelice ili čak nespecifične gastrointestinalne poremećaje (99). Također, simptomi kao što su neobjašnjivi gubitak težine i osjećaj sitosti nakon malog obroka mogu biti povezani s metaboličkim promjenama uzrokovanim napredovanjem karcinoma (98). Ipak, ti simptomi obično nisu prepoznati kao indikatori ozbiljne bolesti sve dok bolest ne uznapreduje

te se sam klinički pregled ne ubraja u potencijalne probirne metode dijagnoze karcinoma jajnika (100).

FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) klasifikacija karcinoma jajnika koristi se za određivanje stadija tumora i određivanje proširenosti bolesti. Najnovija klasifikacija dijeli karcinom jajnika u četiri glavna stadija, s podstadijima koji detaljnije opisuju širenje tumora (Tablica 2) (101).

**Tablica 2.** Klasifikacija stadija i proširenosti karcinoma jajnika prema FIGO klasifikaciji iz 2014. godine. IZVOR: FIGO ovarian cancer staging guidelines 2014.

<https://www.sgo.org/resources/new-figo-ovarian-cancer-staging-guidelines/> (101)

<b>Stadij</b>	<b>Opis</b>
<b>I</b>	<b>Tumor je ograničen na jedan ili oba jajnika ili jajovode</b>
IA	Tumor je ograničen na jedan jajnik ili jajovod bez prisutnosti malignih stanica u slobodnoj tekućini
IB	Tumor zahvaća oba jajnika ili jajovode bez malignih stanica u slobodnoj tekućini
IC	Tumor se širi unutar jajnika, s mogućim puknućem kapsule ili prisutnošću malignih stanica u ascitesu
<b>II</b>	<b>Tumor se proširio na zdjelične organe, ali ne premašuje zdjeličnu šupljinu</b>
IIA	Tumor na maternici, jajovodima ili jajnicima
IIB	Proširenje na druga tkiva unutar zdjelice
<b>III</b>	<b>Tumor se proširio izvan zdjelice, s potvrđenom peritonealnom ili limfnom invazijom</b>
IIIA	Mikroskopski dokaz o širenju na retroperitonealne limfne čvorove
IIIB	Makroskopske metastaze izvan zdjelice $\leq 2$ cm
IIIC	Makroskopske metastaze $> 2$ cm
<b>IV</b>	<b>Udaljene metastaze izvan trbušne šupljine</b>
IVA	Pozitivna citologija u pleuralnom izljevu
IVB	Metastaze u organima poput jetre, slezene ili izvan trbušne šupljine

### **1.5.2. Slikovne metode**

Slikovna dijagnostika karcinoma jajnika od esencijalne je važnosti za prepoznavanje bolesti i planiranje daljnjih terapijskih koraka.

Transvaginalni ultrazvuk (TVU) koristi se kao prva linija dijagnostike u oko 80% slučajeva sumnje na karcinom jajnika zbog svoje visoke osjetljivosti od 86-94% u detekciji zdjelčnih masa (102). TVU omogućava procjenu veličine, oblika i unutarnje strukture karcinoma, što olakšava razlikovanje solidnih od cističnih lezija (103). Međutim, njegova specifičnost, koja varira od 50% do 75%, može biti ograničena u razlikovanju benignih i malignih lezija, osobito kod postmenopausalnih žena (104).

Računalna tomografija (CT) ima ključnu ulogu u procjeni proširenosti bolesti izvan zdjelice, osobito u detekciji retroperitonealnih limfnih čvorova i metastaza na jetri ili plućima (105). Studije su pokazale da je osjetljivost CT-a u procjeni proširenosti karcinoma jajnika veća od 85%, dok je njegova specifičnost za detekciju limfnih čvorova i peritonealnih metastaza oko 90% (106).

Magnetska rezonancija (MRI) se koristi kao dopunska metoda kada su nalazi CT-a nejasni ili je potrebna bolja vizualizacija mekih tkiva, s posebno visokom osjetljivošću u procjeni invazivnosti karcinoma unutar zdjelice i okolnih organa (105,107). MRI ima prednost u razlikovanju karcinomskih masa od benignih cista, osobito u reproduktivnoj dobi (108).

Pozitronska emisijska tomografija - računalna tomografija (PET-CT) pokazuje izvanredne rezultate u detekciji udaljenih metastaza i recidiva bolesti, osobito kod pacijentica s povišenim markerom CA 125, ali nejasnim nalazima na CT-u ili MRI-u (109). Njegova osjetljivost za otkrivanje recidiva karcinoma jajnika iznosi 85%, dok je specifičnost veća od 90% (110).

Sve ove metode zajedno pomažu u točnijoj procjeni stadija bolesti, što je ključno za planiranje optimalne terapije, uključujući kirurški pristup i adjuvantnu kemoterapiju (109).

### **1.5.3. Tumorski markeri**

Mjerenje serumskih markera, kao što je CA 125, široko je prihvaćeno kao standardna laboratorijska metoda u dijagnostici i praćenju bolesti (111). Povišena razina CA 125 pronađena je u više od 80% pacijentica s uznapredovalim karcinomom jajnika, no njezina je specifičnost ograničena zbog toga što povišene razine mogu biti prisutne i kod benignih stanja, poput endometrioze, upalnih bolesti zdjelice i trudnoće (112). Zbog toga je od iznimne važnosti

ROCA test (od engl. *Risk of Ovarian Cancer Algorithm*). ROCA test je dijagnostički alat koji koristi promjene u razinama tumorskog markera CA125 kako bi izračunao vjerojatnost razvoja karcinoma jajnika kod žena (113). Test prati kako se razina CA125 mijenja tijekom vremena, a ne oslanja se samo na apsolutnu vrijednost (114). Posebno se koristi za žene s visokim rizikom, poput onih koje imaju *BRCA1/2* mutacije, kako bi omogućio rano otkrivanje karcinoma jajnika u asimptomatskim fazama, što povećava šanse za uspješno liječenje (17, 115). Nažalost omjer cijene i učinkovitosti nije pogodan za žene koje nemaju isključivo visoki rizik od karcinoma jajnika te se kod takvih pacijentica isti rijetko upotrebljava (112). CA 125 je od posebne važnosti u praćenju odgovora na terapiju i otkrivanju relapsa, ali zbog već navedene niske specifičnosti ne može se koristiti kao pouzdan alat za rano otkrivanje karcinoma jajnika (116). Uz CA 125, sve se više istražuju i drugi serumski markeri, uključujući HE4 (humani epididimalni protein 4), koji se pokazao korisnim u razlikovanju benignih i malignih lezija jajnika te kao dodatak CA 125 u povećanju specifičnosti dijagnostičkih testova (101, 102).

#### **1.5.4. Genetsko testiranje**

Genetsko testiranje na mutacije u *BRCA1* i *BRCA2* genima postalo je važan dio dijagnostičkog procesa, osobito kod pacijentica s obiteljskom poviješću karcinoma jajnika ili dojke (27). ALDO projekt iz 2023. godine također naglašava važnost genetskog testiranja u identificiranju žena s nasljednim mutacijama *BRCA1/2* (119). Ove mutacije ne samo da povećavaju rizik od razvoja karcinoma jajnika, već i pružaju informacije o mogućnostima ciljane terapije (120). Pacijentice s *BRCA* mutacijama posebno dobro reagiraju na PARP inhibitore, koji koriste koncept sintetičke letalnosti kako bi ciljano ubijali stanice koje nemaju sposobnost popravka oštećene DNA (121).

#### **1.5.5. Patohistološka analiza**

Patohistološka dijagnostika karcinoma jajnika predstavlja zlatni standard za konačnu potvrdu dijagnoze i omogućava preciznu klasifikaciju tumora (29). Proces uključuje procjenu uzoraka tkiva pod mikroskopom, što omogućava razlikovanje između različitih histoloških podtipova raka jajnika. Ključni kriteriji u patohistološkoj analizi uključuju stupanj nuklearne atipije, stanične mitotske aktivnosti i prisutnost invazije u okolna tkiva (122). Karcinomi se



ocjenjuju prema gradusu, što označava stupanj diferencijacije stanica, te utvrđivanje prisutnosti specifičnih markera poput WT1 i p53, koji imaju prognostičku vrijednost (123).

Patohistološka analiza također može identificirati mikroskopske metastaze u peritoneju i retroperitonealnim limfnim čvorovima, čime se određuje stadij bolesti. Uz standardne histološke metode, imunohistokemija je važna za razlikovanje između podtipova tumora, posebice u slučajevima s nedefiniranim citološkim karakteristikama (124). Konkretno, patohistološki adenokarcinomi jajnika pokazuju složenu arhitekturu s izraženom nuklearnom atipijom i visokim stupnjem mitotske aktivnosti. Osim toga, imunohistokemijska analiza koristi markere poput WT1, p53 i ER za diferencijaciju seroznih karcinoma od drugih podtipova, što je ključno za određivanje prognoze i terapijskih opcija (125, 126).

Patohistološka dijagnoza usmjerava terapijske odluke, osobito u kontekstu planiranja kirurških zahvata i adjuvantne kemoterapije, te se koristi za praćenje odgovora na liječenje i potencijalnih relapsa (127).

Jedan od najvećih izazova u dijagnostici karcinoma jajnika ostaje nedostatak specifičnih metoda za rano otkrivanje bolesti. Većina pacijentica dijagnosticira se u uznapređovalom stadiju bolesti, kada je mogućnost izlječenja značajno smanjena. Stoga se naglašava potreba za razvojem novih dijagnostičkih biomarkera i strategija za rano otkrivanje, kao i za poboljšanje dostupnosti genetskog testiranja (128).

## **1.6. Terapijski pristupi**

Standardno liječenje karcinoma jajnika uključuje kombinaciju kirurškog zahvata i kemoterapije. Kirurško odstranjenje karcinoma i zahvaćenih tkiva je prva linija liječenja koje ima za cilj maksimizirati citoredukciju, odnosno smanjiti tumor na manje od 1 cm (129). Studije pokazuju da pacijentice koje postignu potpuna ili gotovo potpuna citoredukcija pri čemu ostane manje od 1 cm tumorske mase, imaju značajno bolju prognozu (130, 131). Petogodišnja stopa preživljenja kod pacijentica s minimalnim preostalim tumorom nakon operacije može doseći 50-60%, dok kod pacijentica s većim tumorskim masama preostalim nakon operacije ta stopa pada na manje od 20% (130).

Adjuvantna kemoterapija kod karcinoma jajnika koristi se nakon kirurške intervencije kako bi se eliminirale preostale mikroskopske karcinomske stanice. Standardna adjuvantna terapija uključuje kombinaciju derivata platine (najčešće karboplatin) i taksana (najčešće

paklitaksel). Ova kombinacija produžava vrijeme bez progresije bolesti (PFS) te poboljšava ukupno preživljenje kod pacijentica s uznapredovanim stadijem karcinoma (132–134). Kliničke studije su pokazale da adjuvantna kemoterapija može povećati petogodišnju stopu preživljenja za 15-20%, osobito kada se primjenjuje kod pacijentica s optimalnom citoredukcijom (135).

### **1.6.1. Ciljane terapije i imunoterapija**

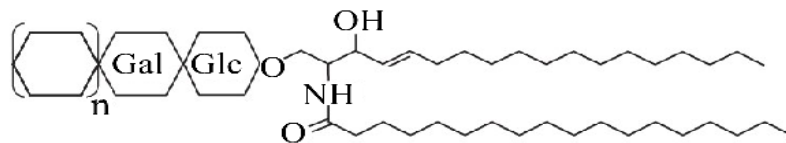
Ciljana terapija karcinoma jajnika doživjela je značajan napredak s razvojem PARP inhibitora koji blokiraju mehanizam popravka jednolančanih lomova DNA, osobito kod pacijentica s mutacijama *BRCA1* i *BRCA2* (39). Mehanizam djelovanja PARP inhibitora zasniva se na sintetičkoj letalnosti, konceptu u kojem stanice s defektnim genom za homologni rekombinacijski popravak, poput *BRCA*-mutiranih tumorskih stanica, ne mogu preživjeti inhibiciju dodatnog mehanizma popravka (78). Ove stanice nakupljaju prekomjerna oštećenja DNA, što rezultira smrću stanica. Važno je napomenuti da PARP inhibitori pokazuju učinkovitost ne samo kod *BRCA*-mutiranih karcinoma, već i kod onih s homolognim rekombinacijskim deficitom, proširujući tako spektar pacijentica koje mogu imati koristi od ove terapije (136). Studije poput SOLO1 i PRIMA pokazale su da olaparib i niraparib značajno produljuju PFS. Pacijentice su imale medijan PFS od 56 mjeseci u usporedbi s 13,8 mjeseci kod placebo grupe (137, 138).

Imunoterapija karcinoma jajnika istražuje nove pristupe korištenjem imunoloških sustava tijela za prepoznavanje i uništavanje tumorskih stanica (139). Glavni fokus je na inhibitorima kontrolnih točaka, poput PD-1 i PD-L1 blokatora, koji sprječavaju karcinomske stanice da inhibiraju T-stanice (140). Kliničke studije pokazale su ograničen uspjeh kod karcinoma jajnika u usporedbi s drugim karcinomima, no kombinacije imunoterapije s PARP inhibitorima i kemoterapijom pokazale su obećavajuće rezultate (141). Druge strategije uključuju vakcinaciju protiv tumorskih antigena i adoptivni prijenos T-stanica, no one su još u fazi istraživanja (142).

## **1.7. Uloga glikosfingolipida u karcinomu jajnika**

Glikosfingolipidi (GSL) su složeni glikolipidi koji se sastoje od sfingozinske okosnice vezane za jedan ili više šećernih ostataka (143) kao što je prikazano na slici 4. Njihova struktura obuhvaća hidrofobnu ceramidnu jezgru (kombinacija sfingozina i masnih kiselina) koja je

ugrađena u stanične membrane, dok se hidrofilni oligosaharidni lanci protežu prema vanjskoj strani membrane (144). Ova specifična struktura omogućava GSL-ima da igraju ključnu ulogu u održavanju strukture i funkcije lipidnih dvosloja u plazmatskoj membrani (145). Raznolikost ugljikohidratnih lanaca, koja se određuje vezama i kombinacijama monosaharida, stvara gotovo beskonačnu varijabilnost GSL-a, omogućavajući im širok spektar funkcionalnih uloga, uključujući staničnu komunikaciju, adheziju, signalizaciju i imunološku modulaciju (146).



**Slika 4 .** Struktura glikosfingolipida. Napomena: Gal, galaktoza; Glc, glukoza

GSL-i su klasificirani prema broju i poziciji sijalinskih kiselina, kao i prema njihovoj strukturi, u nekoliko glavnih skupina. Primjeri koji su bitni za disertaciju uključuju:

- Monosijalilni gangliozidi, poput GM3, koji sadrži jednu sijalinsku kiselinu i ima ključnu ulogu u inhibiciji stanične proliferacije;
- Disijalilni gangliozidi, kao što su GD2 i GD3, koji imaju dvije sijalinske kiseline i sudjeluju u signalizaciji povezanoj s invazivnošću i metastazama;
- Polisijalilni gangliozidi, poput GT3 i GQ1b, s tri ili više sijalinskih kiselina, uključeni su u složenije signalne procese;
- IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc<sub>4</sub>Cer i GalNAc-GM1b, koji predstavljaju složenije gangliozide, također s jednom sijalinskom kiselinom, poznate po modulaciji stanične adhezije i međustaničnih interakcija;
- Gg<sub>3</sub>Cer i Gb<sub>4</sub>Cer, neutralni GSL, nemaju sijalinsku kiselinu, a uključeni su u staničnu adheziju, migraciju i međustaničnu komunikaciju, važni za širenje karcinoma (147, 148).

Ove molekule igraju ključnu ulogu u post-translacijskoj modifikaciji proteina i specifične su za različite stanice i tkiva (145, 149). Kada se rak razvija, promjene u staničnoj membrani dovode do izmijenjenih uzoraka glikozilacije, što se često manifestira izlaganjem različitih GSL-a na površini tumorskih stanica (145). Jedna od bitnijih funkcija GSL-a je njihova sposobnost da utječu na razvoj karcinoma putem različitih mehanizama. Gangliozidi, specifična podskupina GSL-a, mogu aktivirati receptorske tirozin kinaze stvaranjem kompleksa bogatih kolesterolom, što rezultira stimulacijom signalnih puteva kao što su MAPK, PI3K-AKT i PLC (150, 151).

GD3 je jedan od najvažnijih gangliozida u karcinomu jajnika. GD3 aktivira PLC, može ubrzati razgradnju tumor supresora p27/Kip1 te vezivati i inaktivirati FGFR1, što doprinosi staničnoj proliferaciji i tumorigenezi (152). Također je povezan s imunosupresivnim signalima, omogućavajući tumorskim stanicama izbjegavanje imunološkog nadzora (153).

GM2 je još jedan značajan gangliozid koji je prekomjerno izražen u malignim stanicama karcinoma jajnika. Povezan je s promicanjem stanične adhezije i migracije, što olakšava invaziju karcinomskih stanica u okolna tkiva (154).

GM3, jedan od najjednostavnijih gangliozida, ima značajnu ulogu u regulaciji stanične proliferacije (155). GM3 inhibira aktivnost EGFR signalnog puta, što smanjuje proliferativni potencijal karcinomskih stanica (156). U karcinomu jajnika, smanjenje razine GM3 povezano je s agresivnijim fenotipom tumora, dok je njegova prisutnost povezana s usporavanjem rasta istih (157).

IV<sub>3</sub>Neu5Ac-nLc<sub>4</sub>Cer je složeniji gangliozid, prepoznat zbog svoje uloge u moduliranju stanične adhezije i međustanične interakcije (158). Njegov izražaj u stanicama karcinoma jajnika povezana je s progresijom karcinoma i stvaranjem metastaza. Kao dio složenih gangliozida, IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc<sub>4</sub>Cer može sudjelovati u stvaranju specifičnih mikrookruženja pogodnih za rast karcinoma i njihovu invazivnost (159, 160).

GalNAc-GM1b je gangliozid koji se u manjoj mjeri povezuje s karcinomom jajnika, a zbog čega je bio zanimljiv u ovoj disertaciji, pokazuje potencijalnu ulogu u modulaciji imunoloških odgovora kod istih. Njegova struktura omogućava interakciju s receptorima koji su uključeni u prijenos signalnih puteva povezanih s preživljavanjem stanica i izbjegavanjem imunološkog nadzora (161).

Gg<sub>3</sub>Cer (globotriaosil-ceramid) i Gb<sub>4</sub>Cer (globozil-ceramid) imaju važnu ulogu u staničnoj adheziji i migraciji (149). Ovi gangliozidi su uključeni u međustaničnu komunikaciju, što olakšava širenje stanica karcinoma jajnika i stvaranje metastaza (162). Kao i kod IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc<sub>4</sub>Cer, prekomjerni izražaj ovih molekula može doprinijeti stvaranju mikrookruženja pogodnog za rast karcinoma i progresiju bolesti (149).

Zajedničko za sve ove glikosfingolipide jest njihova uloga u stvaranju specifičnih signalnih domena unutar stanične membrane, tzv. lipidnih splavi, koje omogućuju interakciju s receptorima i drugim molekulama ključnim za staničnu proliferaciju, preživljavanje i metastaziranje (163). Povećani izražaj ovih molekula u karcinomu jajnika čini ih ne samo dijagnostičkim biomarkerima, već i potencijalnim terapijskim ciljevima.

Zbog svoje lokalizacije na staničnoj površini, GSL-i su lako dostupni za detekciju serološkim testovima i imunohistokemijskim analizama (164). Ova dostupnost čini ih korisnim alatima za rano otkrivanje karcinoma jajnika (165). Povišene razine GSL-a u serumu često ukazuju na agresivniji oblik karcinoma i lošiju prognozu. Stoga, detekcija GSL-a može omogućiti personalizirani pristup liječenju karcinoma kroz prilagodbu terapije u stvarnom vremenu, ovisno o reakciji karcinoma na terapiju (166). Drugim riječima, promjene u razinama GSL-a tijekom terapije mogu pomoći u praćenju uspješnosti liječenja (167). Na primjer, smanjenje razina GD2 nakon terapije može ukazivati na pozitivan odgovor na liječenje, dok povećane razine mogu signalizirati potrebu za promjenom terapijskog pristupa. GM3, s druge strane, igra dvojaku ulogu kao inhibitorni gangliozid koji može smanjiti proliferaciju karcinomskih stanica inhibicijom EGFR-a (168). GM3 je stoga pokazatelj stanične dinamike, a njegove razine mogu biti korisne za procjenu prognoze bolesti i potencijalne terapijske ciljeve (169).

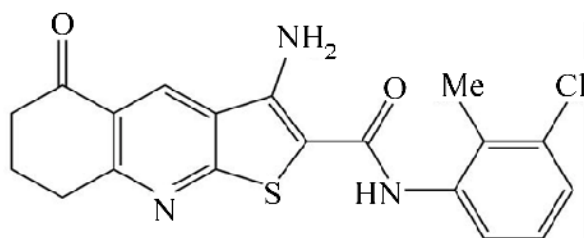
Terapijske mogućnosti koje ciljaju GSL-e uključuju imunoterapije, poput monoklonskih protutijela usmjerenih na GD2, koja induciraju specifičan imunološki odgovor protiv karcinoma (170). Dinutuksimab, lijek usmjeren na GD2, pokazao je značajan uspjeh u liječenju visokorizičnog neuroblastoma, a slične terapije istražuju se za druge tumore s visokim izražajem gangliozida (171). Uz to, istraživanja o inhibiciji biosinteze GSL-a pokazala su potencijal za smanjenje malignog potencijala karcinomskih stanica, otvarajući put novim strategijama ciljanog liječenja (172).

## 1.8. Novi terapijski spojevi i istraživanja

Kompleksna bolest zahtijeva složene oblike liječenja, a u slučaju karcinoma jajnika nema puno mogućnosti. Zbog toga je potrebno pronaći nove načine liječenja karcinoma jajnika, posebice onih koji se dijagnosticiraju kasno u razvoju bolesti (94), a tu bi ulogu mogli ispuniti novosintetizirani spojevi.

### 1.8.1. 3-amino-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamid

3-amino-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamid, u daljnjem tekstu Spoj 1, derivat je tieno[2,3-*b*]piridina i otkriven je korištenjem virtualnog visokopropusnog probira (vHTS) sa svrhom pronalaska mogućih modifikatora izoformi PLC-a (70). Kasnije se pokazalo da imaju antitumorske učinke na brojne tumorske stanične linije, uključujući karcinomske stanice jajnika (49). Struktura Spoja 1, prikazana na slici 5, uključuje tienopiridinski prsten vezan na kinolinsku jezgru (173). Ova jedinstvena kombinacija tienopiridinske i kinolinske strukture osigurava visoku specifičnost i afinitet prema karcinomskim stanicama, omogućujući ciljanje višestrukih signalnih puteva te daje Spoju 1 sposobnost da djeluje na više frontova u inhibiciji karcinomskih stanica (174).



**Slika 5.** Struktura 3-amino-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamida (Spoj 1)

Poznato je da derivati tieno[2,3-*b*]piridina moderiraju višestruke biološke ciljeve, kao što je G-protein spregnuti receptor (GPCR); P2Y12 receptor trombocita; enzim za popravak DNK; tirozil DNA fosfodiesteraza 1; tubulin na veznom mjestu kolhicina; fosfolipaza C- $\delta$ 1; PIM-1-slične kinaze; i eEF2K, elongacijske kinaze eukariotskog faktora 2 i ciklooksigenaznu aktivnost (175). Spoj 1 također djeluje inhibiranjem PLC, čime se prekida prijenos kalcijevih

iona unutar stanice, što rezultira smanjenjem stanične proliferacije i preživljenja (176). Interakcija sa PLC-om odvija se putem bočnih lanaca aminokiselina, uključujući histidin (His356), glutamin (Glu341), arginin (Arg549) i lizin (Lys438) (177, 178). Ovi aminokiselinski ostaci tvore vodikove veze sa Spojem 1, stabilizirajući njegovo vezanje unutar aktivnog mjesta enzima. Histidin veže kisik iz amidne skupine, dok glutamin reagira s amino grupom Spoja 1. Lizin i arginin dodatno stabiliziraju Spoj 1 vezanjem na karboksilnu skupinu cikloheksanonskog prstena, dok se fenilni dio Spoja 1 veže na lipofilni džep unutar enzima (179). Osim PLC-a, Spoj 1 cilja i druge signalne puteve, uključujući EGFR, FAK i Akt, čime dodatno smanjuje sposobnost karcinomskih stanica za preživljavanje i migraciju (180).

Spoj 1 pokazuje ključni učinak u modulaciji glikofenotipa karcinomskih stanica, uključujući inhibiciju izražaja gangliozida GD2 i GM3, što je potvrđeno u studijama na stanicama karcinoma dojke i prostate (149). Ove molekule igraju važnu ulogu u međustaničnim interakcijama i adheziji, a njihova inhibicija otežava metastaziranje karcinoma i smanjuje agresivnost (181). Promjenom glikofenotipa, ovaj spoj može smanjiti invazivnost karcinomskih stanica, što ga čini korisnim u terapiji karcinoma jajnika (154, 182).

Nadalje, Spoj 1 značajno utječe na stanice karcinoma s obilježjima CSC, smanjujući njihov broj i sposobnost samoobnavljanja u modelima karcinoma dojke i prostate. To je ključno jer su CSC odgovorne za otpornost karcinoma na terapiju i ponovno javljanje bolesti nakon početnog liječenja (183). Inhibicijom signalnih puteva u CSC, spoj značajno smanjuje potencijal karcinoma za recidiv, osobito u kontekstu terapija koje uključuju PARP inhibitore (36, 38, 39).

Zbog svoje strukture i mehanizma djelovanja, Spoj 1 predstavlja obećavajuću molekulu za daljnje istraživanje u kontekstu ciljanih terapija karcinoma jajnika i drugih agresivnih karcinoma.

### **1.8.2. Metabolomika i karcinoma jajnika**

Metabolomika, kao ključni aspekt sistemske biologije, fokusira se na cjelovito mapiranje i kvantifikaciju malih molekula u stanicama, tkivima ili tjelesnim tekućinama, uključujući specifične promjene koje se događaju u staničnom metabolizmu tijekom karcinogeneze (184). U kontekstu karcinoma jajnika, metabolomika pruža detaljan uvid u metaboličke prilagodbe karcinomskih stanica koje im omogućuju preživljavanje, invazivnost i otpornost na terapiju (185).

Tehnologije poput MS i nuklearne magnetske rezonancije (NMR) omogućuju preciznu analizu metabolita i njihovih promjena u karcinomskim stanicama, identificirajući karakteristične metaboličke profile za različite podtipove raka jajnika (186). Tumorske stanice, uključujući stanice karcinoma jajnika, pokazuju izražene promjene u osnovnim metaboličkim putovima, poput aerobne glikolize (Warburgov efekt), pojačane sinteze lipida, kao i izmijenjenog metabolizma aminokiselina, posebno glutamina i serina (187).

Promjene u metabolizmu lipida ključne su za karcinom jajnika, s povećanim unosom i sintezom kolesterola te pojačanim metabolizmom fosfolipida i sfingolipida. Ti metabolički putevi povezani su s povećanom proliferacijom, rezistencijom na apoptozu i metastatskim sposobnostima karcinomskih stanica (188). Na primjer, povišene razine lipida poput fosfatidilkolina i fosfatidiletanolamina često su povezane s naprednim stadijima bolesti i lošijom prognozom (189).

Jedna od uloga metabolomike u karcinomu jajnika je identifikacija biomarkera koji omogućuju rano otkrivanje bolesti, praćenje progresije i odgovora na terapiju (190). Metabolički biomarkeri kao što su karnitin, laktat, hipurat i aminokiseline mogu pomoći u razlikovanju različitih stadija karcinoma jajnika i pružiti prognostičke informacije o ishodima liječenja. Studije su pokazale da promjene u koncentraciji ovih metabolita mogu predvidjeti terapijsku otpornost ili odgovor na specifične terapije, uključujući kemoterapiju i ciljanu terapiju (191–193).

Metabolomika je također ključna za identifikaciju novih terapijskih ciljeva (194). Karcinomske stanice često postaju ovisne o određenim metaboličkim putevima, kao što su biosinteza nukleotida i oksidativna fosforilacija, što ih čini ranjivima na inhibiciju tih specifičnih puteva (195). Pa tako inhibicija glutaminaze, enzima ključnog za metabolizam glutamina, pokazala se učinkovitom u smanjenju rasta karcinomskih stanica jajnika u pretkliničkim studijama, budući da ove stanice pokazuju povećanu ovisnost o glutaminu za sintezu nukleotida i energiju (196).

Kombinacija metabolomike s drugim "omikama", poput genomike i proteomike, dodatno pojačava mogućnost precizne personalizirane terapije. Integrirani podaci iz različitih "omika" omogućuju cjelovit uvid u biološke procese karcinoma, pružajući informacije o potencijalnim metaboličkim slabostima koje se mogu ciljati terapijom (190)



## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**

## 2.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je pokazati djelovanje derivata spoja tieno[2,3-*b*]piridina, 3-amino-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotien[2,3-*b*] kinolin-2-karboksamid (Spoj 1) na SK-OV-3 i OVCAR-3 stanične linije karcinoma jajnika.

Nakon primjene Spoja 1 na staničnim linijama SK-OV-3 i OVCAR-3 odrediti:

1. Metaboličku aktivnost karcinomskih stanica
2. Apoptozu u karcinomskim stanicama
3. Promjenu u sastavu metabolita karcinomskih stanica
4. Izražaj glikosfingolipida na CSC i ne-CSC stanicama (postotak stanica pozitivnih na GD3, nLc<sub>4</sub>Cer, Gg<sub>3</sub>Cer, Gb<sub>4</sub>Cer, IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc<sub>4</sub>Cer, GM2, GM3 i GalNAc-GM1b te geometrijsku srednju vrijednost intenziteta fluorescencije (engl. *Geometric Mean Fluorescence Intensity*, GMI)

## 2.2. Hipoteze

Primijenjene koncentracije novosintetiziranog Spoja 1 na stanične linije karcinoma jajnika potaknut će apoptozu, promijeniti metaboličku aktivnost, smanjiti postotak CSC, promijeniti metabolomiku karcinomskih stanica te će pomaknuti glikofenotip prema ne-CSC stanicama.

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

### 3.1. Kultura stanica karcinoma jajnika

Stanične linije karcinoma jajnika SK-OV-3 (ATCC HTB-77) i OVCAR-3 (ATCC HTB-161) kupljene su od ATCC® i uzgajane su u DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) s dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, EuroClone, Milano, Italija) i 1% antibiotika (penicilin/streptomycin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) u inkubatoru na 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2. Spoj: 3-amino-*N*-(3-klor-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamid

Spoj je nedavno sintetiziran u laboratoriju profesora Davida Barkera i dr. Lise I. Pilkington, Škola kemijskih znanosti, Sveučilište Auckland, Auckland, Novi Zeland. Ispitana su četiri različita derivata tieno[2,3-*b*]piridina.

### 3.3. Citotoksičnost

Proveden je MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) test kako bi se izmjerio postotak metabolički aktivnih stanica karcinoma jajnika i odredila polovica maksimalne inhibitorne koncentracije (IC<sub>50</sub>). Apsorbancije tretiranih stanica dobivene MTT testom podijeljene su s apsorbancijama za netretirane stanice kako bi se dobio postotak metabolički aktivnih stanica. Triplikati identičnog broja stanica stavljeni su na mikrotitarske ploče s 96 jažica, te su ploče inkubirane preko noći. Stanice su inkubirane 4, 24, 48 i 72 sata nakon što su tretirane medijem (kontrolne stanice) i otopinama 7 različitih koncentracija svakog derivata —0,05 μM, 0,2 μM, 0,5 μM, 1 μM, 2,5 μM, 5 μ i 10 μM. Nakon ovog tretmana, stanice su uzgajane 2 sata s 0,5 mg/mL MTT otopine.

Čitač mikrotitarskih ploča (HiPo MPP-96, Biosan, Riga, Latvija) korišten je za mjerenje apsorbancije na 570 nm nakon što je otopina uklonjena i dodan DMSO (dimetil sulfoksid) (68). IC<sub>50</sub> je izračunat pomoću programa GraphPad Prism 7.0 (San Diego, CA, SAD). Budući da ima najveću učinkovitost, tj. najnižu vrijednost IC<sub>50</sub>, odlučili smo se usredotočiti na 3-amino-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamid (u ostatku teksta nazvan Spoj 1).

### **3.4. Protočna citometrija**

Nakon MTT testova, izračunate su  $IC_{50}$  vrijednosti za 48 sati za obje stanične linije. Ta koncentracija od 5  $\mu$ M Spoja 1 primijenjena je na SK-OV-3 i OVCAR-3 staničnim linijama za analizu apoptoze i glikofenotipa CSC i ne-CSC.

#### **3.4.1. Apoptoza**

Jednak broj stanica ( $1 \times 10^5$  stanica) nasaden je u triplicatu na mikrotitarskim pločama sa 6 jažica i tretiran s koncentracijom od 5  $\mu$ M otopine Spoja 1 (tretirane stanice) ili s potpunim medijem (kontrolne stanice) kako bi se izvršio test apoptoze. Nakon tretmana Spojem 1, stanice su podvrgnute tripsinizaciji, nakon čega je slijedilo ispiranje u otopini s fosfatnim puferom (PBS) i resuspenzijom u 100  $\mu$ L pufera za vezanje koji je sadržavao 5  $\mu$ L propidijevog jodida (PI) i 5  $\mu$ L Annexin-V-fluorescein izotiocijanata (FITC) boju (Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, SAD). Ova vrsta specifičnog bojenja stanične površine koristi Annexin-V, protein ovisan o  $Ca^{2+}$  koji se veže na fosfolipide i služi kao marker rane apoptoze. Razlikovanje između rane i kasne apoptoze omogućeno je kombinacijom PI i Annexin-V-FITC. Na temelju kombinacije pozitivnih i negativnih ishoda ova dva spoja mogu se razlikovati apoptotične, nekrotične i stanice sposobne za život. Rane apoptotičke stanice bit će Annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>, kasne apoptotičke stanice Annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>, a žive stanice Annexin-V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>. Stanice su ispitane pomoću protočnog citometra (BD Accuri C6, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, SAD) nakon što su inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Za ispitivanje udjela apoptotskih stanica i standardnih devijacija korišten je program FlowLogic v. 8.0 (Inivai Victoria, Australija).

#### **3.4.2. Određivanje izražaja glikosfingolipida na CSC i ne-CSC jajnika**

Jednak broj stanica ( $1 \times 10^5$  stanica) obje stanične linije, SK-OV-3 i OVCAR-3, nasaden je u triplicatu na mikrotitarske ploče sa 6 jažica i tretiran s 5  $\mu$ M Spoja 1 (tretirane stanice) ili potpunim DMEM medijem (kontrolne stanice) tijekom 48 sata, nakon čega se stanice obje linije tripsiniziraju i isperu s PBS-om, a zatim oboje protu-GSL protutijelima. Protutijela na glikosfingolipide (GD3, nLc<sub>4</sub>Cer, Gg<sub>3</sub>Cer, Gb<sub>4</sub>Cer, IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc<sub>4</sub>Cer, GM2, GM3 i GalNAc-GM1b) koja su korištena bila su pileća poliklonska protutijela proizvedena u laboratoriju dr. J. Müthinga (197). Vezanje primarnih protu-GSL protutijela određeno je pomoću sekundarnih protutijela konjugiranih s eFluor 660 fluorokromom (Abcam).

Fluorescencija obojenih uzoraka mjerena je protočnim citometrom BD Accuri C6. Podaci su analizirani pomoću programa FlowLogic v. 8.0. CSCs su određene na SK-OV-3 i OVCAR-3 kao CD49f<sup>+</sup>. Stanice koje nisu CSC (ne-CSC) definirane su kao CD49f<sup>-</sup> na obje stanične linije. Izražaj GSL-a određen je na istim staničnim linijama - postotak stanica pozitivnih na gore navedene GSL-e i geometrijska srednja vrijednost intenziteta fluorescencije (GMI). Koristeći GMI na ovim slikama, kvantificiran je prosječni intenzitet fluorescencije pojedinih GSL-a na površini stanice. Ovi podaci su pokazali distribuciju i izražaj GSL-a na površini stanice, kao i kako se ti lipidi mijenjaju kao odgovor na različite tretmane, u našem slučaju, sa Spojem 1.

### **3.5. Ekstrakcija uzorka, derivatizacija i plinska kromatografija–masena spektrometrija (GC-MS)**

Stanice nasadene u ploče sa 6 jažica tretirane su s 5  $\mu$ M Spoja 1 (tretirane stanice) ili potpunim DMEM medijem (kontrola) tijekom 48 sati. Nakon perioda inkubacije, stanični medij je uklonjen, a stanice su temeljito isprane puferskom otopinom PBS-a, nakon čega je uslijedila fiksacija u hladnom metanolu, koji je učinkovito inhibirao metabolizam stanica. Bez struganja stanica, sakupljen je stanični supernatant i dodano je 20  $\mu$ L ribitola (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka) kao interni standard. Na kraju, uzorci su osušeni propuhivanjem dušikom (198).

Proces derivatizacije uključivao je dodavanje 25  $\mu$ L otopine koja se sastoji od 20 mg/mL metoksilamin hidroklorida u piridinu, nakon čega je uslijedilo stalno mućkanje tijekom 60 minuta na 50 °C i dodavanje MSTFA+1%TMCS uz inkubaciju na 50 °C tijekom 30 minuta za potpunu derivatizaciju. Uzorak je otopljen u 100  $\mu$ L piridina.

Uzorci su analizirani korištenjem Agilent 8890 GC sustava spojenog s trostrukim quad spektrometarskim sustavom MS 7000D GC/TQ. Kolona koja je korištena bila je HP-5 MS (30 m 0,25 mm 0,25  $\mu$ m, Agilent), s programom inkubatora koji je započeo na 60 °C, održavan 2 minute, a zatim povećan na 210 °C brzinom od 10 °C/min, prije nego što se poveća na 240 °C brzinom od 5 °C/min, poveća na 315 °C brzinom od 25 °C/min, i na kraju se drži na 315 °C 3 minute.

### **3.6. GC-MS pretprocesiranje podataka i statistička analiza**

Softver Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis v. 10.0 korišten je za spektralnu obradu (uključujući odabir vrha, poravnanje, označavanje i integraciju). Metaboliti su identificirani

pomoću NIST biblioteke. Vrijednost intenziteta za svaki metabolit normalizirana je na interni standardni signal ribitola. Odabrani su samo spojevi navedeni u bazi podataka ljudskog metaboloma (HMDB4.0). U uzorcima stanične kulture pronađena su ukupno 24 metabolita.

Objektive stanične linije korištene su za stvaranje panela različito izraženih metabolita pomoću MetaboAnalyst v. 6.0, platforme za analizu metabolomičkih podataka.

Za određivanje statističke značajnosti korišten je Studentov t-test. Jednosmjerna ANOVA je korištena da bi se ispitalo kako je Spoj 1 utjecao na dvije stanične linije. Nenadzirana tehnika klasteriranja, analiza glavnih komponenti (PCA), korištena je za razumijevanje ukupnih razlika u metaboličkim profilima. Analiza obogaćivanja metaboličkog skupa (MSEA) korištena je za razumijevanje veze između varijacija koncentracije metabolita i metaboličkih otisaka.

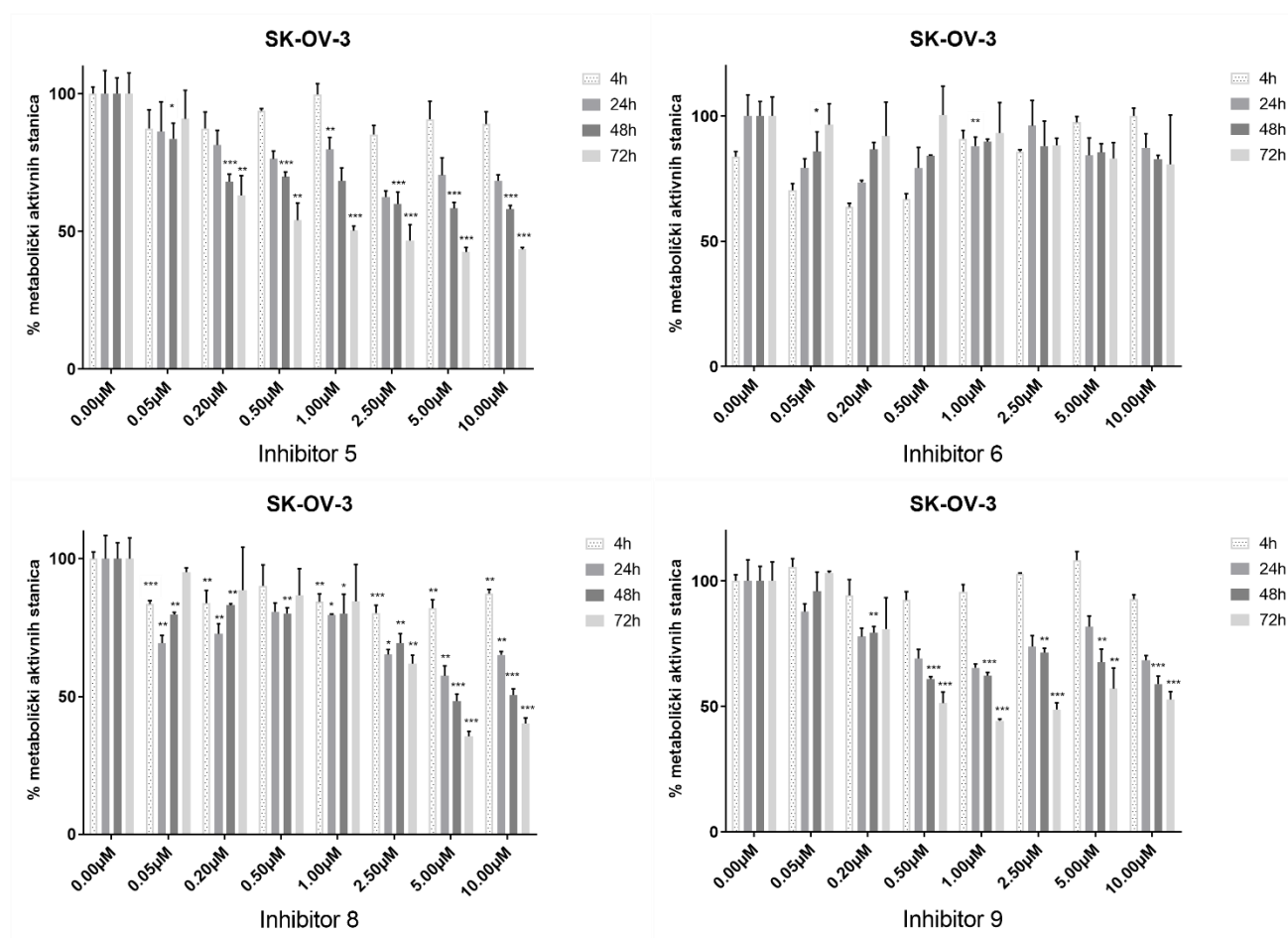
### **3.7. Statistička analiza**

Svi podaci obrađeni su ANOVA i post hoc Tukey testom ili Kruskal-Wallis testom u GraphPad Prism 7.0 (San Diego, CA, SAD). Statistička značajnost postavljena je na  $p < 0,05$  i niže.

#### **4. REZULTATI**



Započeto je istraživanje s 4 različita tieno[2,3-*b*]piridina naziva Inhibitori 5, 6, 8 i 9, tretmanom SK-OV-3 stanične linije. Korišten je MTT test za mjerenje postotka metabolički aktivnih stanica karcinoma jajnika i određivanje IC<sub>50</sub> vrijednosti (Slika 6). Utvrđeno je da je Inhibitor 5, odnosno spoj 3-amino-*N*-(3-klor-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboxamid, najpotentniji te je u daljnjem istraživanju označen nazivom Spoj 1. Temeljem rezultata na SK-OV-3 staničnoj liniji, nastavili smo istraživanje na OVCAR-3 staničnoj liniji Inhibitorom 5, također dalje u istraživanju pod nazivom Spoj 1.

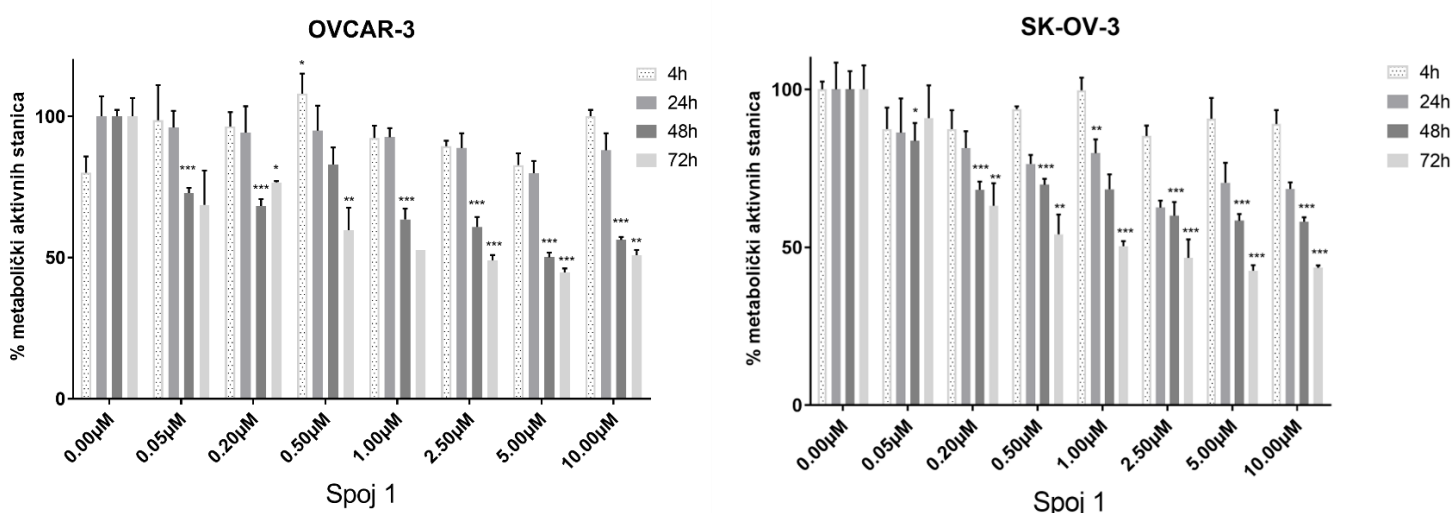


**Slika 6.** Preživljavanje stanica nakon izlaganja različitim derivatima tieno[2,3-*b*]piridina nazvanim Inhibitori 5, 6, 8 i 9 gdje se Inhibitor 5 pokazao najpotentnijim. Stanične linije SK-OV-3 tretirane su različitim dozama derivata tieno[2,3-*b*]piridina u različitim vremenima; test 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolij bromid (MTT) korišten je za mjerenje metaboličke aktivnosti stanica. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti iz eksperimenta, koji je izveden u triplicatu,  $\pm$ SD. Kolone, srednja vrijednost živih stanica; crte, SD, standardna devijacija; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

#### 4.1. Citotoksičnost Spoja 1

U početku je ispitivano preživljavanje stanica različitih staničnih linija, u različitim vremenima izloženosti, pomoću MTT testa. Tretmanom stanične linije OVCAR-3, Spoj 1 je pokazao značajnu citotoksičnost pri 50 nM nakon 48 sati (75% stanica je preživjelo), dok je 50% metabolički aktivnih stanica ostalo nakon 48 sati pri koncentraciji od 5  $\mu\text{M}$ . Najveća zabilježena citotoksičnost također je bila pri 5  $\mu\text{M}$ , a nakon 72 sata tretmana samo je 45% stanica preživjelo (Slika 7a).

Što se tiče stanične linije SK-OV-3, tretman sa Spojem 1 u koncentraciji od 50 nM pokazao je citotoksičnost nakon 48 sati, s 85% stanica koje su ostale metabolički aktivne. Kao što se očekivalo, najmanji broj metabolički aktivnih stanica izmjeren je nakon 72 h tretmana s 10  $\mu\text{M}$  Spoja 1, sa samo 45% aktivnih stanica (Slika 7b).



**Slika 7.** Preživljavanje stanica nakon izlaganja Spoju 1. Stanične linije OVCAR-3 (a) i SK-OV-3 (b) tretirane su različitim dozama Spoja 1 u različitim vremenima; test 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolij bromid (MTT) korišten je za mjerenje metaboličke aktivnosti stanica. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti iz eksperimenta, koji je izveden u triplicatu,  $\pm\text{SD}$ . Kolone, srednja vrijednost živih stanica; crte, SD, standardna devijacija; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

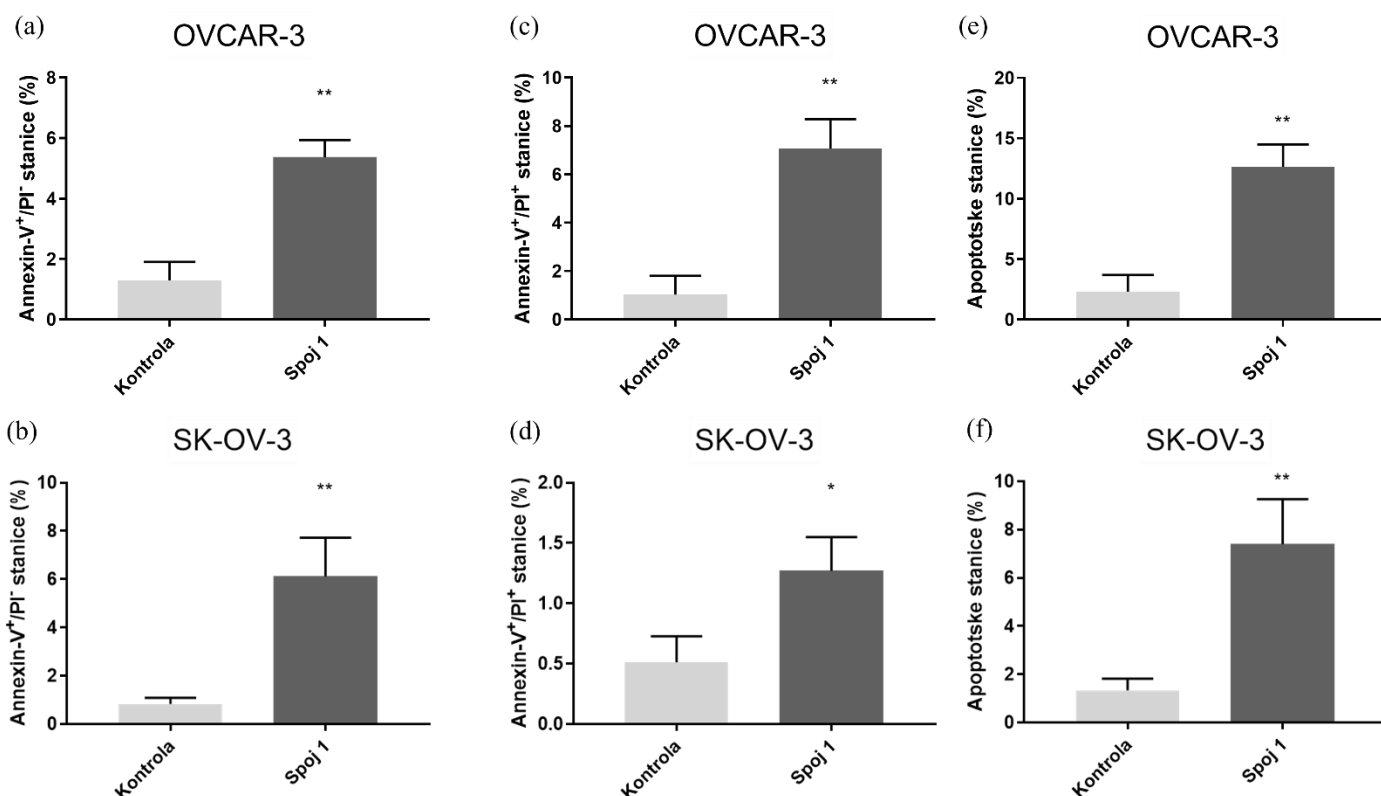
Rezultati na Slici 7 pokazuju vremensku ovisnost između koncentracije i citotoksičnosti. Zanimljivo je da je u obje stanične linije najniži postotak metabolički aktivnih stanica bio

nakon 72 sata izlaganja koncentraciji od 5  $\mu\text{M}$ , a ne s višim dozama od 10  $\mu\text{M}$  za isto razdoblje tretmana.

Konačno,  $\text{IC}_{50}$  za staničnu liniju SK-OV-3 nakon 48 sata tretmana sa Spojem 1 je iznosio 5,5  $\mu\text{M}$ , a za staničnu liniju OVCAR 3 je bio 5,0  $\mu\text{M}$ .

#### 4.2. Programirana stanična smrt—apoptoza

Kako bi se testirao učinak tretmana Spojem 1 na apoptozu, obje stanične linije su tretirane s 5  $\mu\text{M}$  Spoja 1 tijekom 48 sati. Utvrđeno je da je došlo do značajnog povećanja u omjeru ranih, kasnih i ukupnih apoptotskih stanica nakon tretmana u usporedbi s netretiranim stanicama (Slika 8).

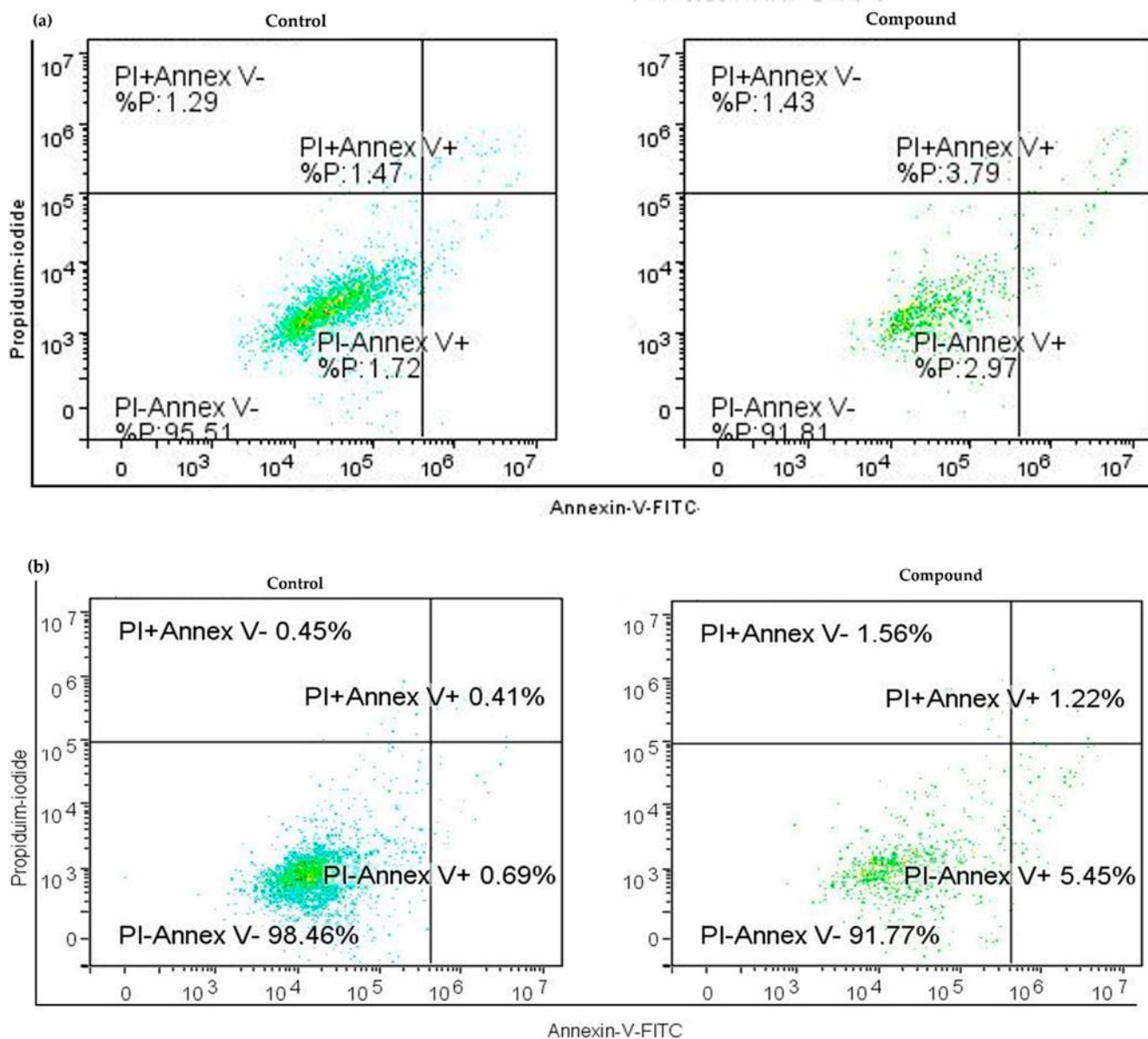


**Slika 8.** Postotak staničnih linija OVCAR-3 i SK-OV-3 u ranoj, kasnoj i ukupnoj apoptozi. Napomene: Postotak stanica u ranoj (a), kasnoj (c) i ukupnoj (e) apoptozi OVCAR-3 i ranoj (b), kasnoj (d) i ukupnoj (f) apoptozi SK-OV-3 stanica linije. Prikazani podaci dani su kao srednje vrijednosti iz eksperimenta koji je izveden u triplicatu,  $\pm\text{SD}$ . Kolone, srednja vrijednost živih stanica; crte, SD, standardna devijacija; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

U staničnoj liniji OVCAR-3, tretman Spojem 1 izazvao je povećanje postotka stanica u ranoj apoptozi ( $1,29 \pm 0,61\%$  bez i  $5,37 \pm 0,56\%$  s tretmanom,  $p < 0,01$ ), kasnoj apoptozi ( $1,03 \pm 0,76\%$  bez i  $7,07 \pm 1,2\%$  s tretmanom,  $p < 0,01$ ) i ukupnoj apoptozi ( $2,32 \pm 1,35\%$  bez i  $12,64 \pm 1,84\%$  s tretmanom,  $p < 0,01$ ).

U staničnoj liniji SK-OV-3 postotak stanica u ranoj apoptozi bio je  $5,45 \pm 1,6\%$  nakon tretmana i  $0,69 \pm 0,11\%$  u kontrolnoj skupini ( $p < 0,01$ ). U kasnoj apoptozi, nakon tretmana, bilo je  $1,22 \pm 0,28\%$  i  $0,41 \pm 0,21\%$  u kontrolnoj skupini ( $p < 0,05$ ), dok je u ukupnoj apoptozi bilo  $6,67 \pm 1,87\%$  u skupini stanica tretiranih Spojem 1 i  $1,34 \pm 0,48\%$  u skupini netretiranih stanica ( $p < 0,01$ ).

Reprezentativni točkasti grafikoni pokazuju da u usporedbi s netretiranim stanicama, tretirane stanice pokazuju povećanje rane stanične apoptoze (Annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> subpopulacija) u obje stanične linije (Slika 9 a i b). Ovi rezultati pokazuju povećanje i rane i kasne apoptoze, sugerirajući da Spoj 1 ima snažan učinak na indukciju stanične smrti kroz apoptotski put.



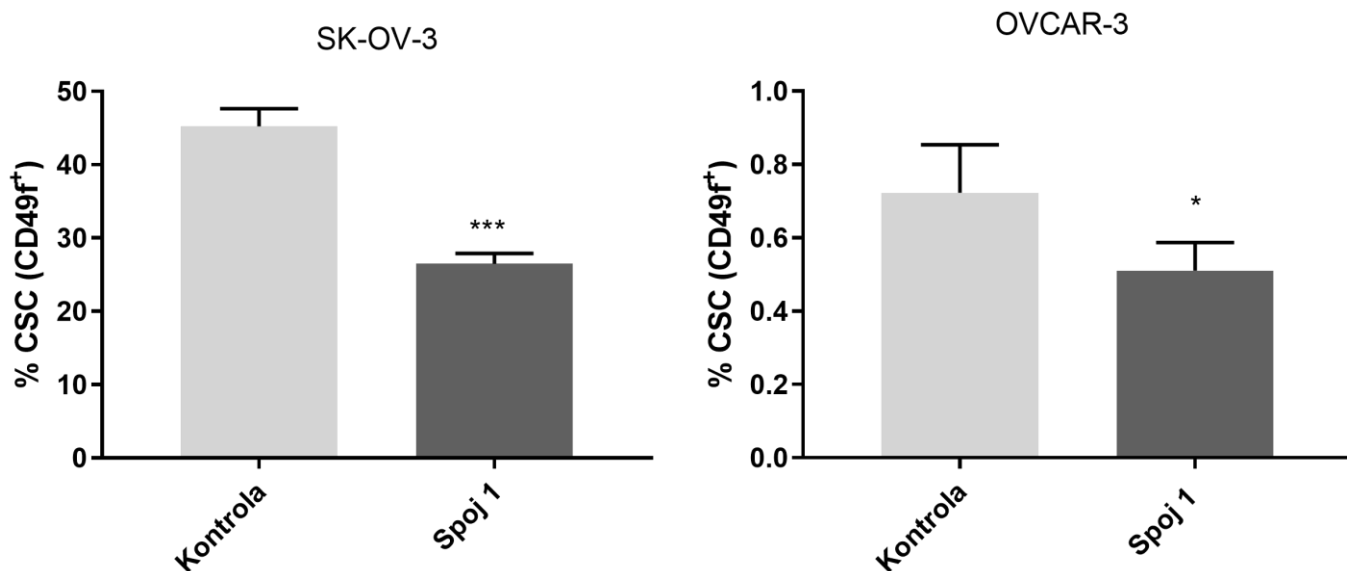
**Slika 9.** Apoptoza bez (lijevo) i s (desno) tretmanom Spojem 1. Napomene: Točkasti grafikoni apoptotičkih stanica u staničnim linijama OVCAR-3 (a) i SK-OV-3 (b) prije i nakon izlaganja tijekom 48 sati. Aneksin-V je prikazan na x-osi, a propidij jodid (PI) je predstavljen na y-osi.

### 4.3. Matične stanice karcinoma (CSC)

Za određivanje broja matičnih stanica, obje su stanične linije karcinoma tretirane s 5  $\mu\text{M}$  Spoja 1 i, nakon 48 sati, izračunat je postotak CSC, definirani kao  $\text{CD49}^{\text{f}}$ . Uočeno je da su obje stanične linije imale slične rezultate s i bez tretmana, iako je stanična linija OVCAR-3 imala znatno manju subpopulaciju CSC. OVCAR-3 općenito je manje invazivan od stanične linije SK-OV-3 (148): tretman sa Spojem 1 značajno je smanjio postotak CSC u staničnoj liniji SK-

OV-3 u usporedbi s netretiranim stanicama, uz smanjenje od gotovo 40% ( $26,47 \pm 1,41\%$  i  $45,21 \pm 2,41\%$ , odnosno,  $p < 0,001$ , Slika 10a).

Postotak CSC u staničnoj liniji OVCAR-3 značajno je smanjen, oko 30%, nakon tretmana ( $0,51 \pm 0,08\%$ ) u usporedbi s netretiranim stanicama ( $0,72 \pm 0,13\%$ ,  $p < 0,05$ , Slika 10b).



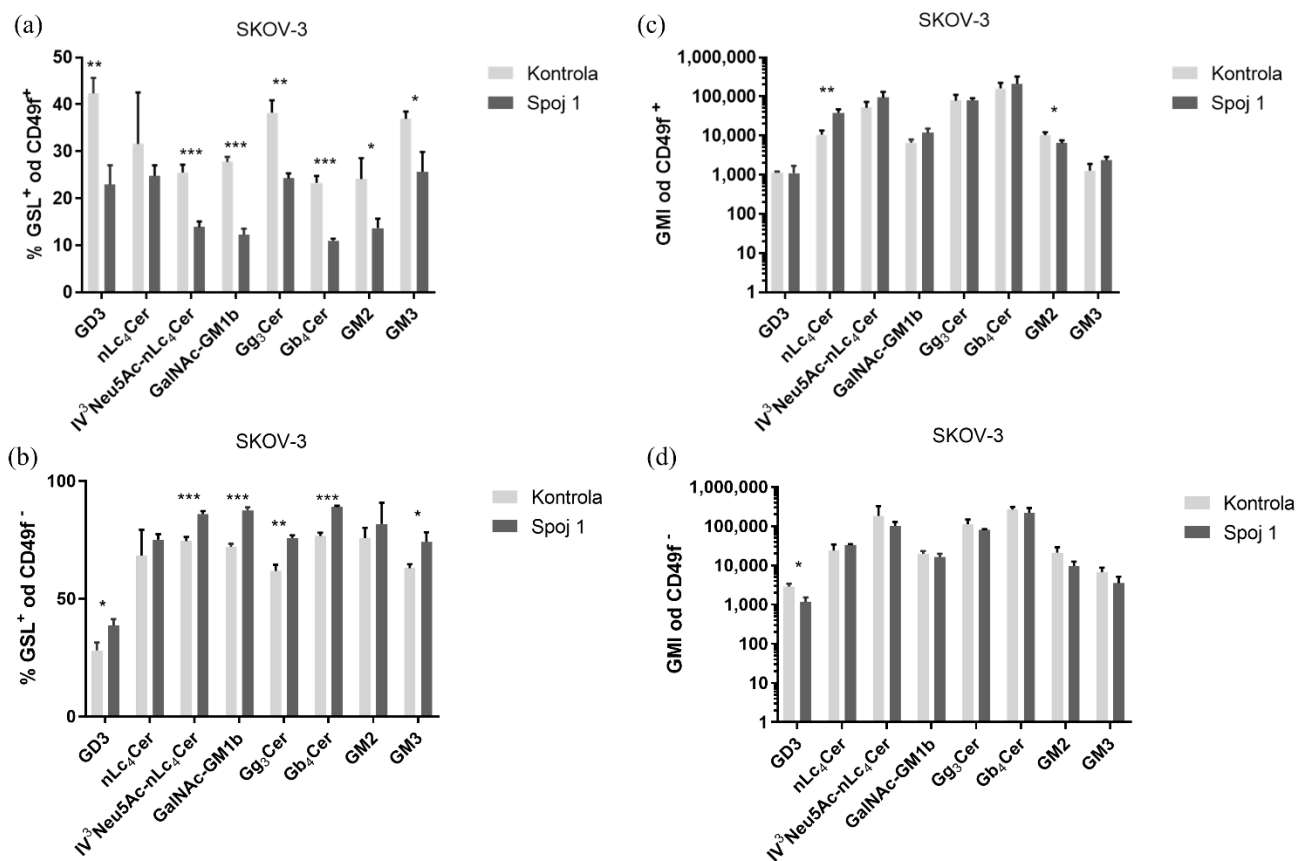
**Slika 10.** Postotak CSC nakon izlaganja Spoju 1. Bilješke: Postotak CD49f<sup>+</sup> (CSC) SK-OV-3 (a) i OVCAR-3 (b) stanične linije nakon tretmana sa Spojem 1 tijekom trajanja od 48 sati. Prikazani podaci dani su kao srednje vrijednosti iz eksperimenta koji je izveden u triplikatu,  $\pm$ SD. Kolone, srednja vrijednost stanica; crte, SD, standardna devijacija; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . CSC, matične stanice raka.

#### 4.4. Izražaj GSL-a na CSC i ne-CSC karcinoma jajnika

Kako bi se utvrdilo je li različiti sadržaj membranskih GSL-a povezan s citotoksičnim mehanizmom Spoja 1, određen je izražaj GSL na subpopulacijama stanica definiranih kao CD49f<sup>+</sup> ili CD49f<sup>-</sup> u obje stanične linije, OVCAR-3 i SK-OV-3.

Sve stanice, i CSC i ne-CSC, u staničnoj liniji SK-OV-3 pokazale su promijenjeni glikofenotip nakon tretmana Spojem 1. Postotak CSC (CD49f<sup>+</sup>) pozitivnih na GSL smanjio se sa statističkom značajnošću kod sedam od osam promatranih GSL-ova: GD3, GM2, GM3, IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc<sub>4</sub>Cer, GalNAc-GM1b, Gg<sub>3</sub>Cer i Gb<sub>4</sub>Cer, redom ( $p$ -vrijednost  $< 0,05$  u svim slučajevima). Postotak CSC pozitivnih na nLc<sub>4</sub>Cer također se smanjio nakon tretmana, ali ovaj

rezultat nije bio statistički značajan (Slika 11a). Geometrijska srednja vrijednost intenziteta fluorescencije (GMI) je pokazala statistički značajnu promjenu u dva označena GSL-a (nLc<sub>4</sub>Cer i GM2). Zanimljivo je da je GMI nLc<sub>4</sub>Cer povećan nakon tretmana, ali je vidljivo da se GMI GM2 smanjio (Slika 11c).

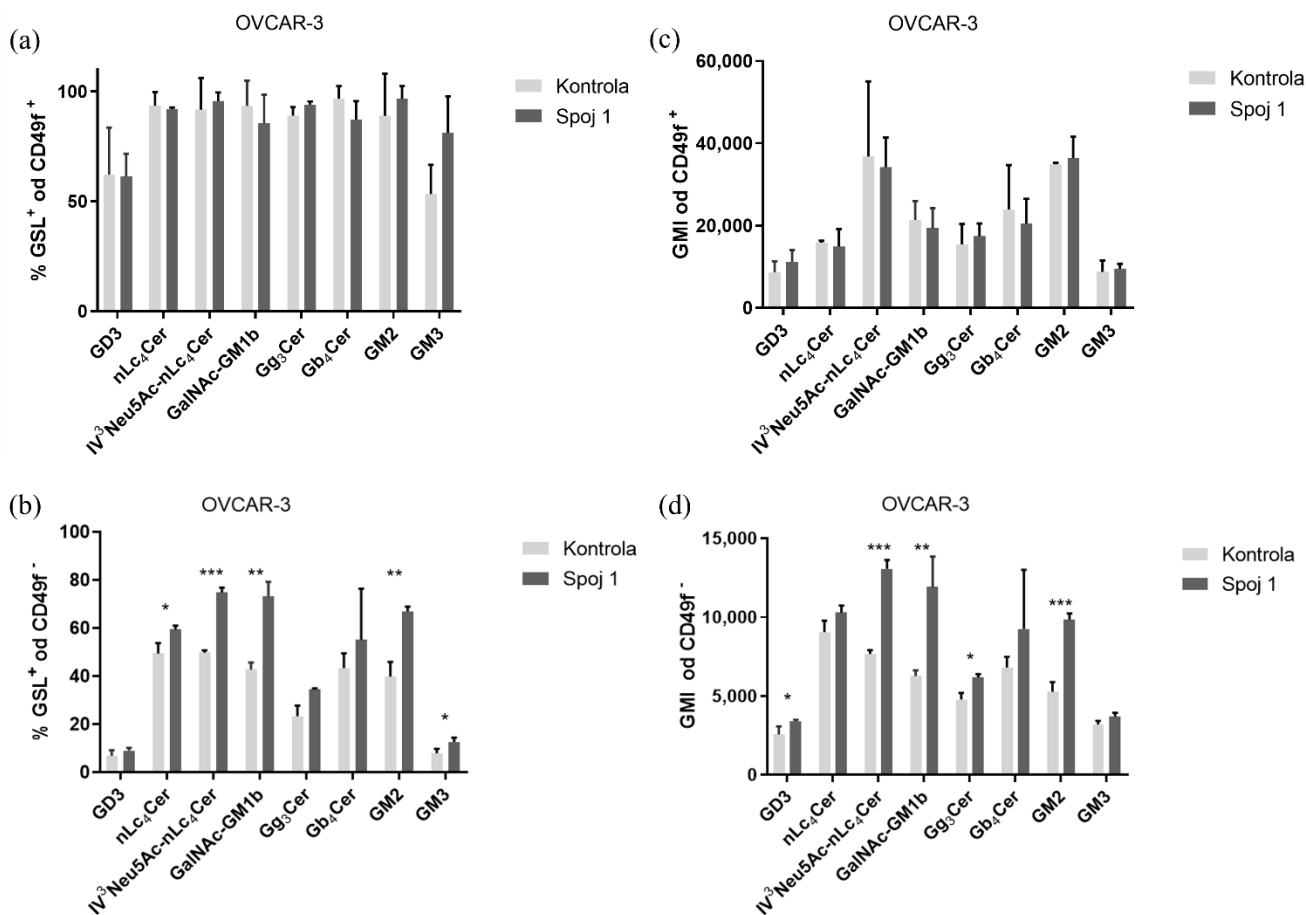


**Slika 11.** Postotak i geometrijska sredina intenziteta fluorescencije (GMI) glikosfingolipidnih pozitivnih staničnih subpopulacija u staničnoj liniji SK-OV-3. Napomene: Postotak CSC (a) i ne-CSC (b) nakon tretmana sa Spojem 1 tijekom trajanja od 48 sati. GMI CSC (c) i ne-CSC (d) nakon tretmana sa Spojem 1 tijekom trajanja od 48 sati. Podaci su izraženi kao srednje vrijednosti iz eksperimenta, koji je izveden u triplikatu,  $\pm$ SD. Kolone, medijani živih stanica; crte, SD, standardna devijacija; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . CSC, CD49f<sup>+</sup>; ne-CSC, CD49f<sup>-</sup>; Neu5Ac, N-acetilneuraminska kiselina. Klasifikacija gangliosida slijedi preporuke IUPAC-IUB (149) i nomenklaturu Svennerholma (116). GD3, II<sup>3</sup>(Neu5Ac)2-LacCer; neo-laktotetraozilceramid ili nLc<sub>4</sub>Cer, IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc<sub>4</sub>Cer; GalNAc-GM1b, IV<sup>3</sup>Neu5Ac-Gg<sub>3</sub>Cer; gangliotriaosilceramid ili Gg<sub>3</sub>Cer, GalNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Gal $\beta$ (1-4)Glc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 1)Cer; globotetraozilceramid ili Gb<sub>4</sub>Cer,

GalNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)Gal $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Glc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 1)Cer; GM2, II<sup>3</sup>Neu5AcGg<sub>3</sub>Cer; GM3, II<sup>3</sup>Neu5Ac-LacCer; GMI, geometrijski srednji intenzitet fluorescencije.

Nadalje, u populaciji ne-CSC (CD49<sup>-</sup>), došlo je do povećanja pozitivnih ne-CSC s izraženim svakim od osam promatranih GSL-a, sa statističkom značajnošću u šest od osam slučajeva (Slika 11b). GMI ne-CSC (CD49<sup>-</sup>) smanjio se u svih osam promatranih GSL-a, ali je samo GD3 ( $p < 0,05$ ) imao statistički značajnu promjenu. (Slika 11d). Slika 12a pokazuje da su se postotci GSL<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> stanica stanične linije OVCAR-3 također promijenili tretmanom sa Spojem 1, ali nijedan nije bio statistički značajan. Postotak GSL<sup>+</sup>CD49<sup>-</sup> stanica stanične linije OVCAR-3 bio je povećan za svih osam promatranih GSL-a, pri čemu je statistička značajnost pronađena u četiri GSL-a, u stanicama sa ili bez tretmana (Slika 12c). GMI CSC (CD49<sup>+</sup>) nije bio statistički značajno promijenjen za svih osam GSL-a u tretiranim u odnosu na netretirane stanice, dok su CD49<sup>-</sup> stanice imale povećane vrijednosti GMI-a za svih osam GSL-a nakon tretmana, sa statistički značajnim povećanjem u pet GSL-a (GD3, GM2, IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc<sub>4</sub>Cer, GalNAc-GM1b i Gg<sub>3</sub>Cer), kao što je prikazano na Slici 12 b i d.





**Slika 12.** Postotak i geometrijska sredina intenziteta fluorescencije (GMI) subpopulacija stanica pozitivnih na glikosfingolipid u staničnoj liniji OVCAR-3. Bilješke: Postotak CSC (a) i ne-CSC (b) nakon tretmana sa Spojem 1 (48 sati). GMI CSC (c) i ne-CSC (d) nakon tretmana sa Spojem 1 tijekom trajanja od 48 sati. Podaci su izraženi kao srednje vrijednosti iz eksperimenta, koji je izveden u triplikatu,  $\pm$ SD. Kolone, medijani živih stanica; crte, SD; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . CSC, CD49f<sup>+</sup>; ne-CSC, CD49f<sup>-</sup>; Neu5Ac, N-acetilneuraminska kiselina. Označavanje gangliozida slijedi preporuke IUPAC-IUB (149) i nomenklaturu Svennerholma (116). GD3, II<sup>3</sup>(Neu5Ac)2-LacCer; neolaktot-traozilceramid ili nLc<sub>4</sub>Cer, IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc<sub>4</sub>Cer; GalNAc-GM1b, IV<sup>3</sup>Neu5Ac-Gg<sub>5</sub>Cer; ganglio-triazilceramid ili Gg<sub>3</sub>Cer, GalNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Glc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 1)Cer; globotetraozilceramid ili Gb<sub>4</sub>Cer, GalNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)Gal $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Glc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 1)Cer; GM2, II<sup>3</sup>Neu5AcGg<sub>3</sub>Cer; GM3, II<sup>3</sup>Neu5Ac-LacCer; GMI, geometrijski srednji intenzitet fluorescencije; SD, standardna devijacija.

#### 4.5. Metabolomika

Također smo usporedili metabolički odgovor staničnih linija SK-OV-3 i OVCAR-3 s i bez tretmana Spojem 1. Korištenjem GC-MS za profiliranje metabolizma, 20 metabolita pronađeno je u staničnoj liniji OVCAR-3, a 21 u staničnoj liniji SK-OV-3 (Tablica 3). Odabrane su samo tvari spomenute u bazi podataka ljudskog metaboloma (HMDB4.0). Rezultati uočeni za OVCAR-3 značajniji su od onih uočenih za SK-OV-3, prema provedenom Studentovom t-testu. Tablica 3 pokazuje da je u stanicama tretiranim OVCAR-3 osam metabolita bilo značajno različito ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s netretiranim stanicama, dok su u staničnoj liniji SK-OV-3 samo dva bila različita među tretiranim i netretiranim stanicama.

**Tablica 3.** Popis otkrivenih metabolita u karcinomskim staničnim linijama OVCAR-3 i SK-OV-3 nakon tretmana sa Spojem 1.

Br.	Metabolit	OVCAR-3		SK-OV-3	
		p-vrijednost	Omjer promjene	p-vrijednost	Omjer primjene
1	Laktat	0.09	-1.13	0.06	1.43
2	Cimetna kiselina	0.01 *	-4.02	0.37	5.59
3	Fenol	0.02 *	-3.12	-	-
4	Galaktoza	0.001 *	-1.59	0.09	0.80
5	Glukoza	<0.001 *	-1.80	0.05 *	0.52
6	Dibutil ftalat	0.09	-3.41	0.80	-0.16
7	Inozitol	<0.001 *	-2.8	0.005 *	1.57
8	Oktadekan-1-ol	0.01 *	-2.69	0.99	-0.01
9	Oktadekanska kiselina	0.09	2.41	-	-
10	Izopropil miristat	0.003 *	-2.42		-
11	Heptanoat	< 0.001 *	-1.45	0.29	-0.41
12	Monoglicerid	0.05 *	-0.56	0.50	0.19
13	Eikosan	0.32	-2.98	-	-
14	Heksadekanska kiselina	0.25	-1.19	0.57	-0.98
15	Fosfat	0.29	0.80	0.33	0.67
16	Fruktoza	0.68	-0.59	0.37	5.59
17	Stearinska kiselina	-	-	0.71	-0.49
18	Miristinska kiselina	-	-	0.70	-0.16

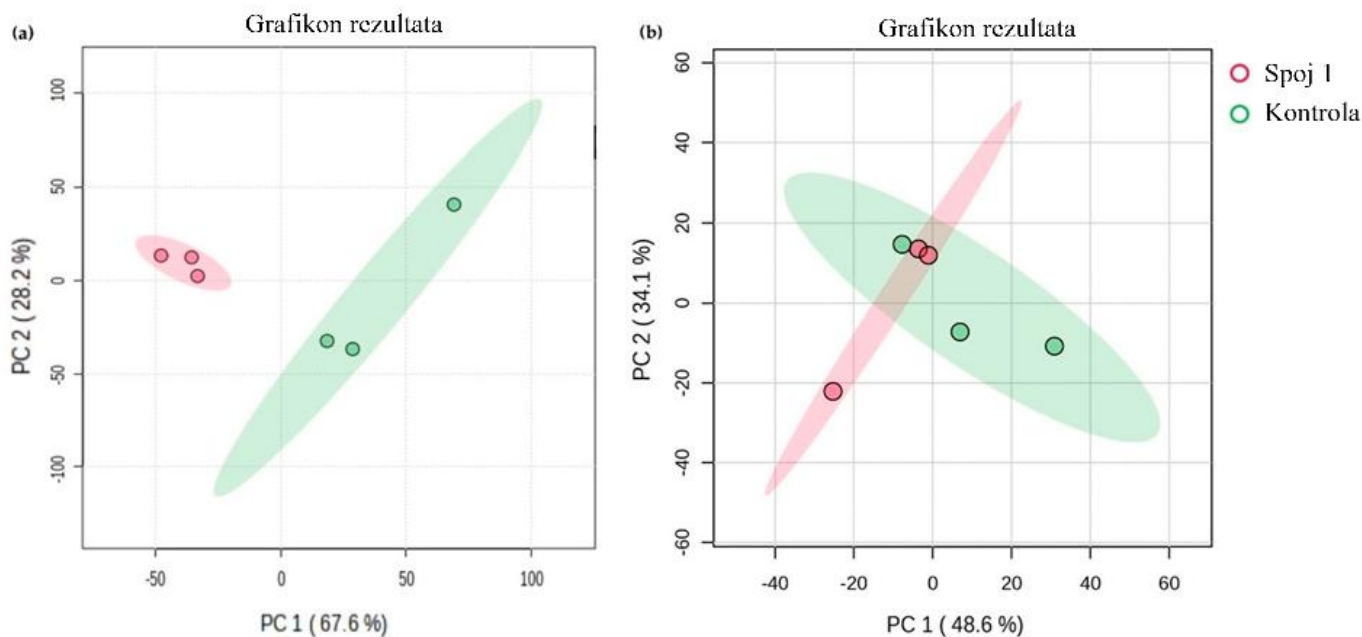
19	Stearat	-	-	0.40	-0.80
20	Manitol	-	-	0.003 *	2.55
21	Kolesterol	-	-	0.18	0.85
22	1-acilglicerol	-	-	0.56	-0.68
23	Glicerol	-	-	0.46	0.61
24	Ksiloz	-	-	0.93	0.06

Napomena: Nakon 48 sati tretmana sa Spojem 1, vrijednosti intenziteta za svaki metabolit u OVCAR-3 i SK-OV-3 stanicama normalizirane su na interni standardni signal ribitola. Promjena u omjeru (od engl. *fold change*) metabolita je omjer srednjeg intenziteta signala tretiranih stanica (iz tri odvojene studije) prema netretiranim stanicama — p-vrijednosti dobivene putem Studentovog t-testa.

\* statistički značajne promjene.

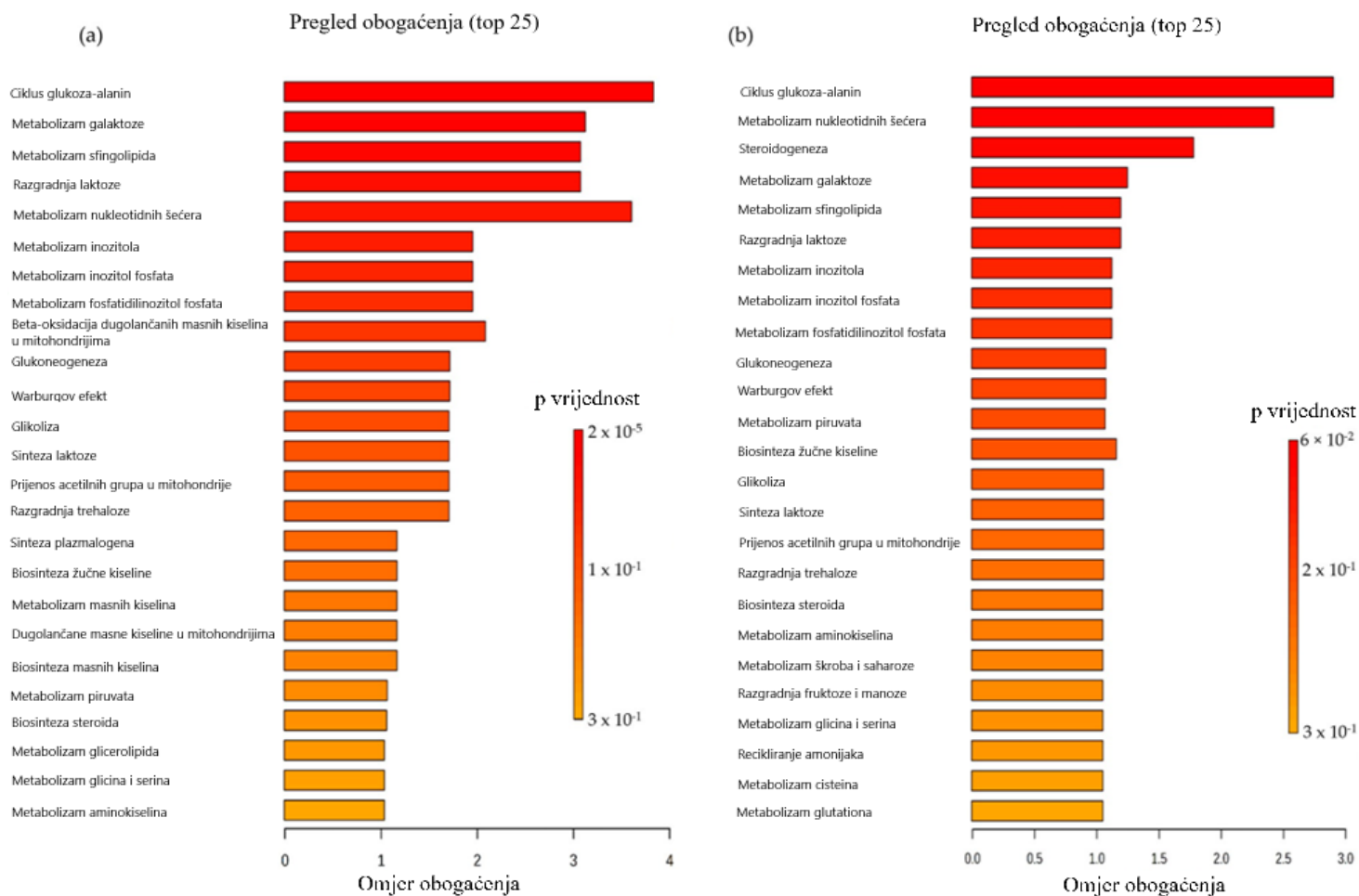
Nadalje su ispitane metaboličke razlike u obje tretirane stanične linije karcinoma i provedena usporedba s njihovim kontrolnim (netretiranim) pandanima korištenjem analize glavnih komponenti (PCA). Dijagrami PCA rezultata za OVCAR-3 stanice pokazuju kako se tretirane skupine grupiraju drugačije od kontrolnih skupina (Slika 13a), a na slici ispod može se jasno razlikovati kontrolna skupina od skupine tretirane Spojem 1. Prva glavna komponenta (PC1), koja se nalazi na x-osi i objašnjava 67,6% varijabilnosti, sadrži većinu informacija i varijabilnosti u izvornim podacima. Druga glavna komponenta (PC2), koja se nalazi na y-osi i objašnjava 28,2% varijabilnosti, još uvijek sadrži značajnu količinu informacija o strukturi podataka. Visoka razina varijacije u izvornim podacima (~96%) ukazuje na to da su dijagrami rezultata prikazani na Slici 15a izvrstan prikaz varijacija u podacima. Što se tiče stanične linije SK-OV-3, može se vidjeti da je vrijednost PC1 48,6%, dok je PC2 34,1%, a smjer metabolita kontrole i nakon učinka Spoja 1 manje je očit, s primjetnim preklapanjem u tretiranoj i netretiranoj skupini (Slika 13b). Ova analiza, koja podupire ranija otkrića, naglašava veći učinak Spoja 1 na stanice OVCAR-3 u usporedbi sa stanicama SK-OV-3.

Analiza pokazuje da su ti spojevi prisutni u različitim razinama nakon izlaganja Spoju 1, u usporedbi s kontrolnom skupinom.



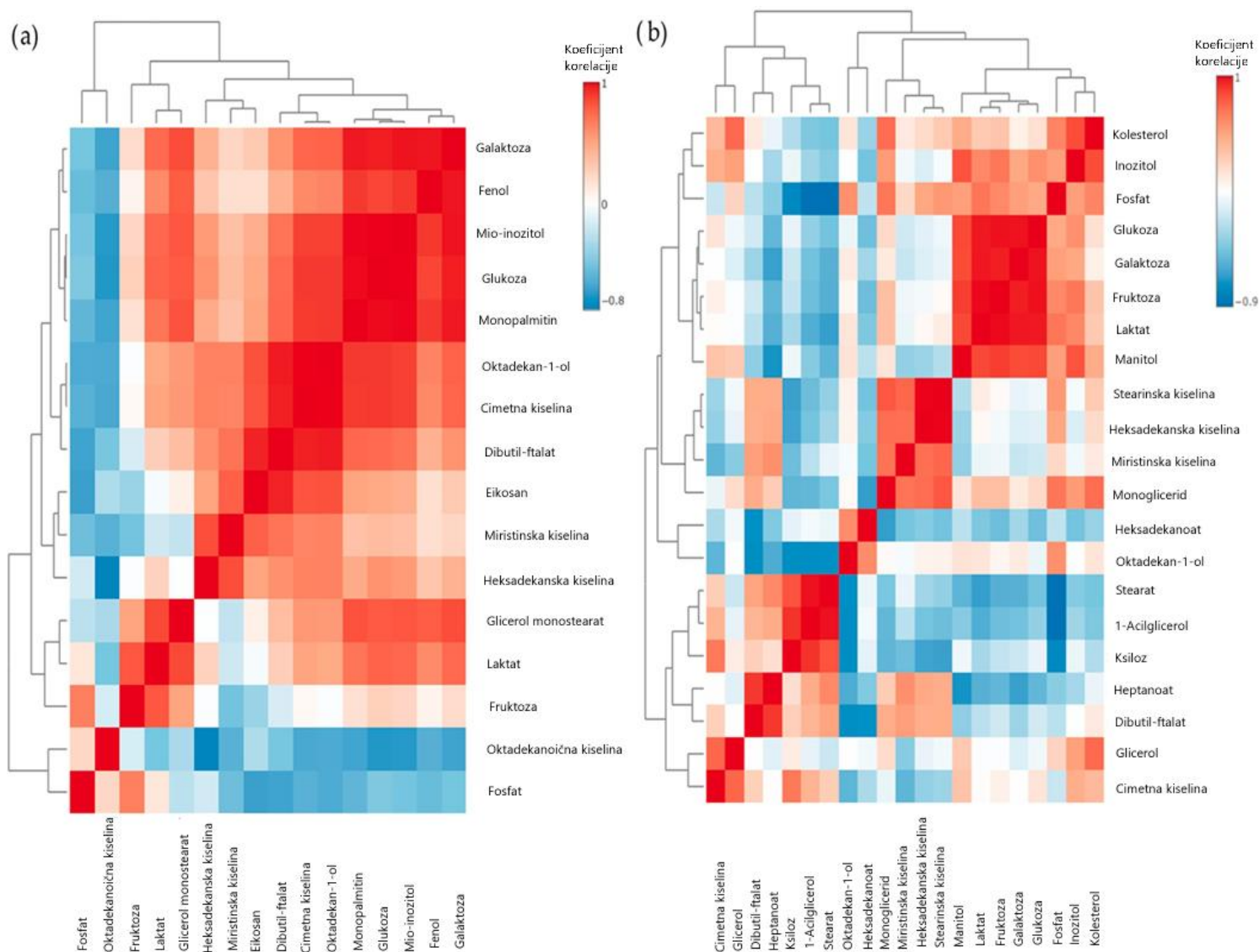
**Slika 13.** Skupine metabolita u obje tretirane stanične linije raka. Napomena: analiza glavne komponente (PCA) metaboličkih profila OVCAR-3 (a) i SK-OV-3 (b) staničnih linija raka s ili bez tretmana sa Spojem 1 tijekom trajanja od 48 sati.

Primjena kvantitativne analize obogaćivanja (EA) omogućila je identifikaciju obrazaca koncentracije metabolita i pružila uvid u potencijalne biološke mehanizme. Poredak molekularnih puteva temeljio se na p-vrijednosti koja se nalazi na popisu spojeva svakog puta za određeni broj značajno promijenjenih metabolita. Tretirana linija stanica raka OVCAR-3 imala je veliki utjecaj ( $p < 0,001$ ) na ciklus glukoze-alanina, galaktozu, metabolizam sfingolipida, nukleotidnog šećera i razgradnju laktoze (Slika 14a). Zanimljivo je da su u slučaju tretiranih stanica raka SK-OV-3 najzastupljeniji čimbenici glukoza-alaninski ciklus, metabolizam nukleotidnog šećera i steroidogeneza. Ipak, niti jedna od tih promjena nije bila statistički značajna ( $p > 0,06$  i više), kao što je prikazano na Slici 14b.



**Slika 14.** Metaboliti i metabolomski putevi staničnih linija OVCAR-3 i SK-OV-3 nakon tretmana sa Spojem 1. Napomena: analiza metabolomičkog obogaćivanja (a) OVCAR-3 i (b) staničnih linija SK-OV-3 nakon tretmana sa Spojem 1 tijekom 48 sati.

Koristeći korelacijsku matricu i kartu aktivnosti, pokazana je još uočljivija veza između metabolita nakon tretmana sa Spojem 1. Dodavanjem "klastera" izvan korelacijske matrice, grupirane su određene tvari. Time su stečene dodatne informacije u odnosu na korelacije, pozitivne ili negativne, unutar skupina metabolita (Slika 15 a i b). Može se vidjeti da posebno za stanice OVCAR-3 postoje skupine visoko pozitivno koreliranih metabolita.



**Slika 15.** Metabolomska korelacijska matrica staničnih linija OVCAR-3 i SK-OV-3 nakon tretmana sa Spojem 1. Bilješke: korelacijska matrica (a) OVCAR-3 i (b) metabolomike stanične linije SK-OV-3 nakon tretmana sa Spojem 1 tijekom 48 sati. Najveću pozitivnu korelaciju imaju tamnocrvene nijanse, a najveću negativnu tamnoplave nijanse. “Klasteri” tvari povezani su izvan matrice.

#### 4.6. Toksikološki profil tieno[2,3-*b*]piridina

Selektivna toksičnost klase spojeva tieno[2,3-*b*]piridina prethodno je testirana na različitim staničnim linijama koje je osigurao Nacionalni institut za rak (ploča NCI60), uključujući sedam staničnih linija karcinoma jajnika, a ti su podaci objavljeni u ranijim radovima (69,199). Nadalje, dva derivata tieno[2,3-*b*]piridina (6 i 7, Slika 16 (69)) odabrana



## **5. RASPRAVA**



Prema našim saznanjima, 3-amino-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamid (Spoj 1) nije temeljito istražen na karcinomskim stanicama jajnika. Testiran je samo na njegovu selektivnu toksičnost na različitim staničnim linijama u NCI60 panelu, koji uključuje, između ostalih karcinomskih staničnih linija, sedam staničnih linija karcinoma jajnika (69). Za stanice karcinoma dojke Marijan i sur. otkrili su da se maksimalna citotoksičnost Spoja 1 javlja nakon 72 sata pri koncentraciji od 5  $\mu\text{M}$ , a  $\text{IC}_{50}$  je postignut nakon 48 sati pri koncentraciji od 250 nM (149). U našem istraživanju,  $\text{IC}_{50}$  nakon 48 sati bio je 5,5  $\mu\text{M}$  za SK-OV-3 stanice i 5,0  $\mu\text{M}$  za OVCAR-3 stanice, pokazujući da je Spoj 1 citotoksičniji za stanice raka dojke nego za stanice karcinoma jajnika. Nadalje, ispitivanje toksičnosti na miševima pokazalo je da je Spoj 1 siguran i toleriran u visokim dozama kod atimičnih golih miševa (69).

Posebno je intrigantno promatrati oblik stanične smrti koju izaziva Spoj 1 u staničnim linijama karcinoma jajnika. Pokazalo se da primarno programirana stanična smrt (apoptoza) sudjeluje u ovom procesu utjecaja Spoja 1 na stanicu, a ne neprogramirana stanična smrt (nekroza). U obje stanične linije, tretirane stanice pokazale su značajan porast u postotku apoptotičkih stanica. U staničnoj liniji SK-OV-3 primijećen je izraženiji učinak na ranu apoptozu, s više od sedam puta većim postotkom u tretiranim stanicama u usporedbi s kontrolnim stanicama, dok je postotak stanica u kasnoj apoptozi bio oko dvostruko veći u tretiranim stanicama u usporedbi s netretiranim stanicama. U staničnoj liniji OVCAR-3 bio je približno četiri puta veći postotak stanica u ranoj apoptozi u odnosu na netretirane, dok je postotak bio gotovo sedam puta veći kod tretiranih stanica u kasnoj apoptozi.

Dokazano je da različiti signalni putevi kontroliraju sposobnost CSC da se razlikuju, održavaju i odupiru lijekovima. Pronalaženje signalnih mehanizama koji kontroliraju CSC je ključno za njihovu eliminaciju, što će zatim pomoći u smanjenju otpornosti na lijekove i recidiva karcinoma (200). Kao rezultat toga, značajno je smanjenje udjela CSC nakon tretmana sa Spojem 1, u odnosu na netretirane stanice. U istraživanju Suzukija i sur. potvrđuju se rezultati našeg istraživanja u važnosti signalnih puteva i CSC u otpornosti na terapiju što doprinosi boljem razumijevanju mehanizama rezistencije (201). Dok se većina dosad provedenih istraživanja temeljila na uobičajenim markerima CSC, kao što su CD133, CD44 ili ALDH, mi smo istraživali učinak na CSC označen kao CD49f<sup>+</sup>. CD49f<sup>+</sup>, također poznat u literaturi kao integrin  $\alpha$ -6 (ITGA6), slabo je proučavan kod karcinoma jajnika, ali je poznato da je prekomjerno izražen u SK-OV-3 stanicama otpornim na cisplatinu (55). Stanične linije SK-OV-3 i OVCAR-3 potječu iz adenokarcinoma jajnika, OVCAR-3 stanična linija je izolirana iz

ascitesa, dok SK-OV-3 stanična linija potječe iz bioptata. OVCAR-3 se smatra seroznim karcinomom visokog stupnja, dok je SK-OV-3 slabo diferencirani karcinom (148). OVCAR-3 ima puno manji postotak CSC u usporedbi s SKOV-3 i osjetljiviji je na citotoksični učinak Spoja 1 pod istim uvjetima liječenja. Postoci za CD49f<sup>+</sup> (ili ITGA6) bili su oko 30% niži u staničnoj liniji SK-OV-3 i 40% niži u staničnoj liniji OVCAR-3 nakon tretmana sa Spojem 1. To se može objasniti specifičnim ciljanjem Spoja 1 na membranske receptore u stanicama karcinoma i poremećajem signalnih puteva važnih za funkcioniranje stanica (202, 203).

Raspon promjena uočeni u izražaju GSL nakon tretmana sa Spojem 1 odražava različite ishode dokumentirane u postojećoj literaturi. Monosijalizirani GSL-i GM2 i GM3 smanjuju malignost karcinomskih stanica. Hakomori i sur. pokazali su u svom istraživanju da GM3 inhibira aktivaciju receptora čimbenika rasta (GFR), posebno receptor epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) (204). S druge strane, Huang i sur. pokazali su da prekomjerni izražaj GM3 može smanjiti apoptozu i otpornost na lijekove u staničnoj liniji SK-OV-3 (155). U našem istraživanju postotak izražaja GM3 na staničnoj liniji SK-OV-3 bio je smanjen, dok je u OVCAR-3 bio povišen, što znači da se moraju provesti daljnja istraživanja kako bi se objasnile te razlike u dvije stanične linije.

Nadalje, nakon tretmana sa Spojem 1, postotak stanica koje izražavaju gangliozid nLc<sub>4</sub>Cer ili njegovu sijaliziranu verziju, IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc<sub>4</sub>Cer, u staničnoj liniji SK-OV-3 je smanjen, ali izražaj se povećao u staničnoj liniji OVCAR-3. Ova je promjena izraženija na ne-CSC obje stanične linije u usporedbi s CSC. Sijalizirani glikosfingolipidi prisutni na staničnim membranama mogu posredovati u procesima metastaziranja. Sung i sur. pokazali su da inhibicija interakcija između sijaliziranih glikolipida i njihovih receptora na metastatskim stanicama može spriječiti ili usporiti metastaze (157).

Promjena u izražaju GSL-a kao što su GM2, GM3, nLc<sub>4</sub>Cer i IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc<sub>4</sub>Cer na CSC nakon tretmana sa Spojem 1 može ukazivati na nižu regulaciju ABCG2 (ATP-vezujuća kazeta podobitelji G član 2) transportera. ABCG2 može utjecati na razinu i distribuciju GSL-a u stanicama regulirajući njihov unos, lučenje ili recikliranje. Na primjer, ABCG2 je identificiran kao ključni čimbenik u regulaciji razina gangliozida u stanicama, a mutacije u genima *ABCG2* povezane su s promjenama u sastavu membranskih lipida i funkciji transportera ABCG2. Prijenosnik ABCG2 već je meta u liječenju karcinoma (205, 206).

Postotak stanica koje izražavaju različite neutralne GSL s terminalnim GalNAc (N-acetilgalaktozamin) varirao je za obje stanične linije. Naime, izražaj Gb<sub>4</sub>Cer primjetno je opao

nakon tretmana Spojem 1 u CSC obje stanične linije, dok je postotak Gb<sub>4</sub>Cer<sup>+</sup> ne-CSC povećan nakon tretmana. Promjene su bile izraženije u liniji stanica SK-OV-3, gdje su promjene bile statistički značajne. Istraživanje Tanake i sur. pokazalo je da stanice karcinoma jajnika s povišenim izražajem Gb<sub>4</sub>Cer pokazuju veću otpornost na kemoterapeutike (207). Uspoređujući naše rezultate s njihovima, ponovno smo pokazali antitumorsku aktivnost Spoja 1 i njegovu potencijalnu upotrebu kao antitumorskog lijeka, budući da je izražaj Gb<sub>4</sub>Cer na CSC smanjen nakon tretmana Spojem 1. Također smo primijetili promjene u izražaju Gg<sub>3</sub>Cer nakon tretmana sa Spojem 1.

Na CSC i ne-CSC stanične linije OVCAR-3 povećani su i postotak i GMI. Izražaj Gg<sub>3</sub>Cer smanjen je u CSC stanične linije SK-OV-3, a povećan u ne-CSC, što je u skladu s istraživanjem Marijan i sur. provedeno na CSC dojke. Objasnili su smanjenje delecijom laktozilceramid 4-alfa-galaktoziltransferaze (A4GALT), koja je bitan enzim u prijelazu epitelnih stanica u mezenhimalne, što može povećati kemorezistenciju (149, 208).

Postotak tretiranih stanica pozitivnih na GalNAc-GM1b povećan je u obje stanične linije karcinoma jajnika na ne-CSC i smanjen u CSC, a ovaj rezultat nije prethodno opisan u literaturi. Smanjeni postotak CSC koji izražavaju GalNAc-GM1b može ukazivati na usporavanje glikolize u CSC, što dodatno utječe na diferencijaciju fenotipova CSC-a i ne-SCC-a (149, 206).

Izražaj GD3 bio je povećan u ne-CSC obje stanične linije nakon tretmana spojem, kao što je bila u CSC stanične linije SK-OV-3. Nasuprot tome, postotak GD3<sup>+</sup> CSC u staničnoj liniji OVCAR-3 se smanjio. GD3 je GSL specifičan za karcinomske stanice i nema ga u normalnim stanicama, uzrokujući supresiju imunološkog sustava i dopuštajući karcinomima da izbjegnu imunitet (209). Stanične linije OVCAR-3 imaju znatno niži postotak CSC i to bi moglo biti objašnjenje za dobivene rezultate.

U našem istraživanju pokazali da Spoj 1 ima različit učinak na izražaj metabolita nakon tretmana na obje stanične linije, povećanjem ili smanjenjem njihovih koncentracija, mijenjajući metaboličke putove i utječući na staničnu signalizaciju.

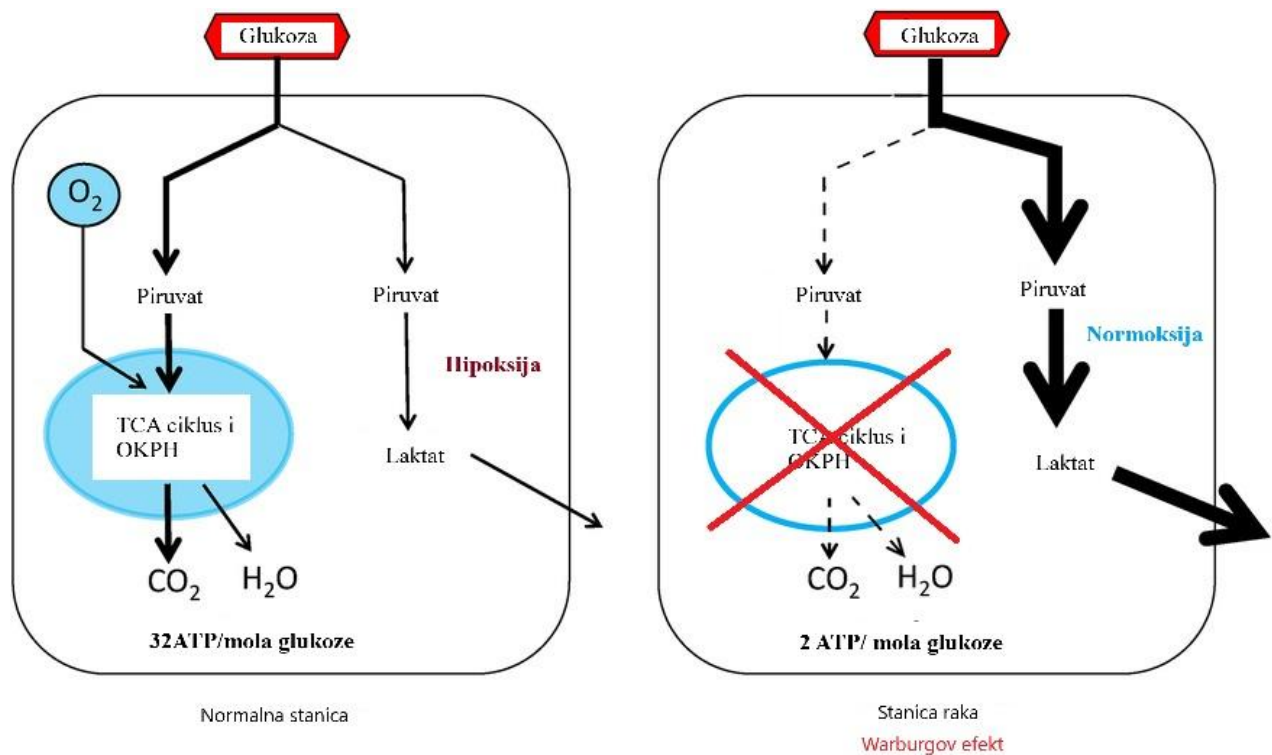
Zanimljivo je da je koncentracija inozitola značajno smanjena u staničnoj liniji OVCAR-3, dok je statistički značajno povećana u staničnoj liniji SK-OV-3. Budući da su obje stanične linije karcinomske stanice jajnika, razlike u metaboličkom odgovoru na Spoj 1 mogle bi potencijalno biti povezane s inherentnim razlikama u biološkim karakteristikama tih stanica.

Pretražujući literaturu, nismo pronašli prethodna istraživanja koja bi se mogla specifično usporediti s našim rezultatima metabolomike. Međutim, Alarcon-Zapata i sur. istaknuli su različitost ponašanja staničnih linija karcinoma jajnika SK-OV-3 i OVCAR-3 u svojim istraživanjima, gdje su pokazali da stanične linije SK-OV-3 i OVCAR-3 pokazuju različite značajke (210). U usporedbi jedna s drugom, SK-OV-3 stanice pokazuju ubrzanu migraciju, povećanu invazivnost i opsežnije metastaze u *in vivo* modelima. Obje stanične linije razvijaju rezistenciju na kemoterapeutske lijekove kao što je cisplatina, iako SK-OV-3 pokazuje veću stopu preživljenja nakon liječenja (210). To se može objasniti zašto su rezultati u ovom radu pokazali različite metaboličke izražaje u svakoj staničnoj liniji nakon tretmana Spojem 1. Pervan i sur., 2022. godine, također su potvrdili promjene u metaboličkim putevima stanica karcinoma dojke nakon tretmana s citotoksičnim tieno[2,3-*b*]piridinom, a koncentracija različitih metabolita nakon tretmana dodatno je potvrdila njegovu važnost u njegovom antitumorskom učinku (206).

Primijetili smo da je inozitol smanjen nakon tretmana sa Spojem 1. Spoj 1 djeluje na izoformu fosfolipaze C (PLC), koja sudjeluje u metabolizmu inozitola u stanicama. Povećana potreba za inozitolom može biti prisutna u stanicama karcinoma zbog povećane potrebe za membranskim lipidima i metaboličkim reprogramiranjem koje podržava brzi rast karcinoma (44). Nadalje, povećana razina inozitola može pridonijeti proliferaciji i preživljavanju stanica karcinoma, što ga čini potencijalnom metom za terapiju karcinoma, a to smo dokazali promatrajući učinak Spoja 1 na njih (211). Pretragom literature nismo pronašli slične rezultate na karcinomskim stanicama jajnika.

Također, vrlo značajno, koncentracija heptanoata je smanjena nakon tretmana sa Spojem 1. Budući da je inozitol prekursor heptanoata u nekim metaboličkim putevima, promjene u metabolizmu inozitola uzrokovane inhibicijom PLC mogu utjecati na dostupnost heptanoata, što dodatno utječe na njegovu smanjenu sintezu. Uloga heptanoata u karcinomskim procesima je složena i može imati različite implikacije na proliferaciju, preživljavanje i metastaze stanica karcinoma, što njega ili signalne puteve u koje je uključen, također čini potencijalnom metom u antitumorskoj terapiji (24, 212). U istraživanju Ali Khan i sur. heptanoat se spominje kao jedan od liganada korištenih u sintezi novih platinskih kompleksa. Uloga mu je bila u povećanju lipofilnosti spojeva, što omogućuje bolji prolaz platinskih kompleksa kroz stanične membrane i povećava njihovu citotoksičnost prema karcinomskim stanicama (213).

Stanice karcinoma obično pokazuju modificirani metabolički put koji se naziva "Warburgov učinak", pri čemu daju prednost anaerobnoj glikolizi za proizvodnju energije, čak i kada postoji okruženje s dovoljno kisika (Slika 17) (214, 215).



**Slika 17.** Shematski prikaz Warburgovog efekta. TCA, ciklus limunske kiseline; OKPH, oksidativna fosforilacija

Izvor: preuzeto i prevedeno – Vaupel et al. (2020) (216) Licenca: CC BY-NC 4.0

Zanimljivo je da je razina glukoze statistički povišena u stanicama karcinoma jajnika SK-OV-3 linije ( $p < 0,05$ ), dok je u OVCAR-3 liniji razina glukoze statistički značajno smanjena nakon tretmana Spojem 1 ( $p < 0,001$ ). Iako bi se očekivalo da će razina glukoze biti smanjena u mediju oko karcinomsakih stanica zbog povećane potrošnje glukoze, može doći do nakupljanja glukoze unutar karcinomskih stanica, kao što je slučaj s SK-OV-3 linijom, zbog promijenjenog metabolizma i poremećaja u regulaciji; međutim, dobiveni su oprečni rezultati.

## **6. ZAKLJUČCI**

Disertacija otkriva nekoliko važnih zapažanja o potencijalu korištenja spojeva tieno[2,3-*b*]piridina, posebno derivata 3-amino-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamida (Spoj 1), u liječenju stanica karcinoma jajnika. Prvo, ustanovljeno je da Spoj 1 ima značajne citotoksične učinke na stanične linije karcinoma jajnika SK-OV-3 i OVCAR-3, nadmašujući rezultate primijećene u prethodnim studijama na stanicama karcinoma dojke i prostate. Ova visoka citotoksičnost, zajedno sa sklonošću induciranju apoptoze u odnosu na neprogramirane puteve stanične smrti, naglašava njen potencijal kao antitumorski lijek koji obećava.

Učinak Spoja 1 na CSC označene kao CD49f<sup>+</sup> pokazao je da se njihov postotak značajno promijenio nakon tretmana. Ako uzmemo u obzir ulogu CSC u ciklusu ponovnog rasta karcinoma i razvoju otpornosti na lijekove, to bi CSC moglo učiniti potencijalnom metom.

Osim toga, disertacija je detaljno istražila promjene GSL-a i metabolita nakon tretmana. Značajno, promjene u izražaju GSL, posebno smanjena regulacija nekih gangliozida povezanih s metastazama i kemorezistencijom, sugerira da Spoj 1 može poremetiti ključne signalne puteve važne za napredovanje i širenje karcinoma.

Dobiveni rezultati daju veliki doprinos razumijevanju molekularnih mehanizama karcinomskih stanica i otvaraju mogućnosti za razvoj novih terapija. Ali, da bi se rezultati ovog istraživanja mogli uspješno prenijeti u kliničku praksu potrebno je provesti dodatna istraživanja uključujući predkliničke studije da bi se potvrdila učinkovitost i sigurnost Spoja 1 u *in vivo* modelima. Nadalje, potrebno je istražiti interakciju Spoja 1 sa drugim signalnim putevima i moguća sinergijska djelovanja s postojećim terapijama te razvoj skrininga ili biomarkera za pronalaženje pacijentica koje bi najviše imale korist od terapije Spojom 1.

Na kraju, mi se nadamo da će daljnji rad na ovom Spoju pomoći u poboljšanju rezultata liječenja pacijentica s karcinomom jajnika, posebno onih sa otpornim oblicima bolesti.

## **7. REFERENCE**



1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024 ;74(3):229-63. doi: 10.3322/caac.21834. Epub 2024 Apr 4.
2. Whitwell HJ, Worthington J, Blyuss O, Gentry-Maharaj A, Ryan A, Gunu R, et al. Improved early detection of ovarian cancer using longitudinal multimarker models. *Br J Cancer.* 2020 ;122(6):847-56. doi: 10.1038/s41416-019-0718-9. Epub 2020 Jan 15.
3. Wojtyła C, Bertuccio P, Giermaziak W, Santucci C, Odone A, Ciebiera M, et al. European trends in ovarian cancer mortality, 1990-2020 and predictions to 2025. *Eur J Cancer.* 2023 ;194:113350. doi: 10.1016/j.ejca.2023.113350. Epub 2023 Sep 26. European Commission; [cited 2024 Oct 5]. Available from: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>
5. Čerina D, Matković V, Katić K, Belac Lovasić I, Šeparović R, Canjko I, et al. Comprehensive Genomic Profiling in the Management of Ovarian Cancer-National Results from Croatia. *J Pers Med.* 2022 ;12(7):1176. doi: 10.3390/jpm12071176.
6. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet.* 2018 ;391(10125):1023-75. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3. Epub 2018 Jan 31.
7. Rendić-Miočević Z, Alvir M, Orešković I, Beketić-Orešković L. Fertility preservation in patients with gynecological cancer - is it possible?. *Libri Oncol [Internet].* 2022;50(2-3):131-7. <https://doi.org/10.20471/LO.2022.50.02-03.20>
8. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018 ;68(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21442. Epub 2018 Jan 4.
9. Kurman RJ, Shih IeM. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol.* 2016 ;186(4):733-47. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.11.011.
10. Berek JS, Renz M, Kehoe S, Kumar L, Friedlander M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: 2021 update. *Int J Gynaecol Obstet.* 2021 ;155 Suppl 1(Suppl 1):61-85. doi: 10.1002/ijgo.13878.
11. Svjetski dan borbe protiv raka jajnika [Internet]. [cited 2024 Oct 5]. Available from: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/svjetski-dan-borbe-protiv-raka-jajnika-4/>
12. Dalmartello M, La Vecchia C, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, Negri E, et al. European cancer mortality predictions for the year 2022 with focus on ovarian cancer. *Ann Oncol.* 2022 ;33(3):330-9. doi: 10.1016/j.annonc.2021.12.007. Epub 2022 Jan 26.
13. Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch.* 2012 ;460(3):237-49. doi: 10.1007/s00428-012-1203-5. Epub 2012 Feb 10.

14. Takano M, Kikuchi Y, Yaegashi N, Kuzuya K, Ueki M, Tsuda H, et al. Clear cell carcinoma of the ovary: a retrospective multicentre experience of 254 patients with complete surgical staging. *Br J Cancer*. 2006 ;94(10):1369–74.
15. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 ;70(1):7–30.
16. Testa U, Petrucci E, Pasquini L, Castelli G, Pelosi E. Ovarian Cancers: Genetic Abnormalities, Tumor Heterogeneity and Progression, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Medicines*. 2018 ;5(1):16. doi: 10.3390/medicines5010016.
17. Rosenthal AN, Fraser L, Manchanda R, Badman P, Philpott S, Mozersky J, et al. Results of annual screening in phase I of the United Kingdom familial ovarian cancer screening study highlight the need for strict adherence to screening schedule. *J Clin Oncol*. 2013 ;31(1):49–57. doi: 10.1200/JCO.2011.39.7638. Epub 2012 Dec 3.
18. Musani V, Sušac I, Ozretić P, Eljuga D, Levanat S. The first case report of a large deletion of the BRCA1 gene in Croatia. *Medicine (Baltimore)*. 2017 ;96(48):e8667. doi: 10.1097/MD.00000000000008667.
19. Wentzensen N, Massad LS, Mayeaux EJ, Khan MJ, Waxman AG, Einstein MH, et al. Evidence-Based Consensus Recommendations for Colposcopy Practice for Cervical Cancer Prevention in the United States. *J Low Genit Tract Dis*. 2017 ;21(4):216–22. doi: 10.1097/LGT.0000000000000322.
20. Bandera EV, Qin B, Moorman PG, Alberg AJ, Barnholtz-Sloan JS, Bondy M, et al. Obesity, weight gain, and ovarian cancer risk in African American women. *Int J Cancer*. 2016 ;139(3):593–600. doi: 10.1002/ijc.30115. Epub 2016 Apr 15.
21. Cibula D, Widschwendter M, Májek O, Dusek L. Tubal ligation and the risk of ovarian cancer: review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2011 ;17(1):55–67. doi: 10.1093/humupd/dmq030. Epub 2010 Jul 15.
22. Wheeler LJ, Desanto K, Teal SB, Sheeder J, Guntupalli SR. Intrauterine Device Use and Ovarian Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2019 ;134(4):791–800. doi: 10.1097/AOG.00000000000003463
23. Tsilidis KK, Allen NE, Key TJ, Dossus L, Lukanova A, Bakken K, et al. Oral contraceptive use and reproductive factors and risk of ovarian cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Br J Cancer*. 2011 ;105(9):1436–42. doi: 10.1038/bjc.2011.371. Epub 2011 Sep 13.
24. Chen W, Deng Z, Chen K, Dou D, Song F, Li L, et al. Synthesis and *in vitro* anticancer activity evaluation of novel bioreversible phosphate inositol derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015 ;93:172–81. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.01.064. Epub 2015 Feb 9.
25. Ordulu Z, Watkins J, Ritterhouse LL. Molecular Pathology of Ovarian Epithelial Neoplasms: Predictive, Prognostic, and Emerging Biomarkers. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2024 ;44(2):199–219. doi: 10.1016/j.cll.2023.08.004.

26. Piedimonte S, Power J, Foulkes WD, Weber E, Palma L, Schiavi A, et al. BRCA testing in women with high-grade serous ovarian cancer: gynecologic oncologist-initiated testing compared with genetics referral. *Int J Gynecol Cancer*. 2020 ;30(11):1757–61. doi: 10.1136/ijgc-2020-001261. Epub 2020 Aug 5.
27. Samuel D, Diaz-Barbe A, Pinto A, Schlumbrecht M, George S. Hereditary Ovarian Carcinoma: Cancer Pathogenesis Looking beyond BRCA1 and BRCA2. *Cells*. 2022 ;11(3):539. doi: 10.3390/cells11030539.
28. Chen H, Jiang Q, Yin Y. Increased risk of ovarian and breast malignancies in women with polycystic ovary syndrome: a review article. *Cell Mol Biol*. 2023 ;69(14):15–21. doi: 10.14715/cmb/2023.69.14.3.
29. Zamwar UM, Anjankar AP. Aetiology, Epidemiology, Histopathology, Classification, Detailed Evaluation, and Treatment of Ovarian Cancer. *Cureus*. 2022 ;14(10):e30561. doi: 10.7759/cureus.30561
30. Majić A, Miše BP, Matković V, Belac Lovasić I, Katić K, Canjko I, et al. Olaparib Outcomes in Patients with BRCA 1-2 Mutated, Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer in Croatia: A Retrospective Noninterventional Study. *J Oncol*. 2020 ;2020:6423936. doi: 10.1155/2020/6423936.
31. Skelin M, Šarčević D, Lešin Gaćina D, Mucalo I, Dilber I, Javor E. The effect of PARP inhibitors in homologous recombination proficient ovarian cancer: meta-analysis. *Journal of Chemotherapy*. 2023 ;35(2):150–7. doi: 10.1080/1120009X.2022.2073161. Epub 2022 May 13.
32. Philpott S, Raikou M, Manchanda R, Evans G, Edmondson R, Menon U, et al. 423 Results of the avoiding late diagnosis of ovarian cancer (ALDO) project; a pilot national surveillance program for BRCA mutation-carriers. *Int J Gynecol Cancer*. 2021 ;31(Suppl 3):A373.2. Available from: [https://ijgc.bmj.com/content/31/suppl\\_3/a373.2](https://ijgc.bmj.com/content/31/suppl_3/a373.2)
33. Awaji AA, Maigoro AY, Aborode AT, Akintola AA, Fatoba DO, Idris EB, et al. Identification of key molecular pathways and genes in BRCA1 and BRCA2-mutant ovarian cancer: evidence from bioinformatics analysis. *Genome Instab Dis*. 2024 ;5(4):164–82.
34. Skorda, A, Bay, ML, Hautaniemi, S, Lahtinen, A, Kallunki, T. Kinase Inhibitors in the Treatment of Ovarian Cancer: Current State and Future Promises. *Cancers*. 2022 ; 14(24):6257 <https://doi.org/10.3390/cancers14246257>
35. Lliberos C, Richardson G, Papa A. Oncogenic Pathways and Targeted Therapies in Ovarian Cancer. *Biomolecules*. 2024 ;14(5):585. doi: 10.3390/biom14050585.
36. Li H, Liu ZY, Wu N, Chen YC, Cheng Q, Wang J. PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications. *Molecular Cancer*. 2020 ;19(1):107. doi: 10.1186/s12943-020-01227-0.
37. Eoh KJ, Kim HM, Lee JY, Kim S, Kim SW, Kim YT, et al. Mutation landscape of germline and somatic BRCA1/2 in patients with high-grade serous ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2020 ;20(1):204. doi: 10.1186/s12885-020-6693-y.

38. Turinetto M, Scotto G, Tuninetti V, Giannone G, Valabrega G. The Role of PARP Inhibitors in the Ovarian Cancer Microenvironment: Moving Forward From Synthetic Lethality. *Front Oncol.* 2021 [cited 2024 Oct 7];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2021.689829/full>
39. O'Malley DM, Krivak TC, Kabil N, Munley J, Moore KN. PARP Inhibitors in Ovarian Cancer: A Review. *Target Oncol.* 2023 ;18(4):471–503. doi: 10.1007/s11523-023-00970-w. Epub 2023 Jun 3.
40. Liu J, Hong M, Li Y, Chen D, Wu Y, Hu Y. Programmed Cell Death Tunes Tumor Immunity. *Front Immunol.* 2022 ;13:847345. doi: 10.3389/fimmu.2022.847345.
41. Yang W, Kim D, Kim DK, Choi KU, Suh DS, Kim JH. Therapeutic Strategies for Targeting Ovarian Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2021 ;22(10):5059. doi: 10.3390/ijms22105059.
42. Lučić I, Kurtović M, Mlinarić M, Piteša N, Čipak Gašparović A, Sabol M, et al. Deciphering Common Traits of Breast and Ovarian Cancer Stem Cells and Possible Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci.* 2023 ;24(13):10683. doi: 10.3390/ijms241310683
43. Terraneo N, Jacob F, Dubrovska A, Grünberg J. Novel Therapeutic Strategies for Ovarian Cancer Stem Cells. *Front Oncol.* 2020 ;10. doi: 10.3389/fonc.2020.00319.
44. Alarcon-Zapata P, Perez AJ, Toledo-Oñate K, Contreras H, Ormazabal V, Nova-Lamperti E, et al. Metabolomics profiling and chemoresistance mechanisms in ovarian cancer cell lines: Implications for targeting glutathione pathway. *Life Sci.* 2023 ;333:122166. doi: 10.1016/j.lfs.2023.122166. Epub 2023 Oct 10.
45. Landen CN, Birrer MJ, Sood AK. Early Events in the Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer. *J Clin Oncol.* 2008 ;26(6):995–1005. doi: 10.1200/JCO.2006.07.9970. Epub 2008 Jan 14
46. ATCC: The Global Bioresource Center [Internet]. [cited 2024 Oct 10]. Available from: <https://www.atcc.org/>
47. NIH:OVCAR-3 [OVCAR3] - HTB-161 | ATCC [Internet]. [cited 2024 Oct 10]. Available from: <https://www.atcc.org/products/htb-161>
48. Kalamegam G, Sait KHW, Ahmed F, Kadam R, Pushparaj PN, Anfinan N, et al. Human Wharton's Jelly Stem Cell (hWJSC) Extracts Inhibit Ovarian Cancer Cell Lines OVCAR3 and SKOV3 in vitro by Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Front Oncol.* 2023 ;8:592. doi: 10.3389/fonc.2023.1171430.
49. Hallas-Potts A, Dawson JC, Herrington CS. Ovarian cancer cell lines derived from non-serous carcinomas migrate and invade more aggressively than those derived from high-grade serous carcinomas. *Sci Rep.* 2019 ;9(1):5515. doi: 10.1038/s41598-019-41941-4.
50. Yu D, Wolf JK, Scanlon M, Price JE, Hung MC. Enhanced c-erbB-2/neu expression in human ovarian cancer cells correlates with more severe malignancy that can be suppressed by E1A. *Cancer Res.* 1993 ;53(4):891–8.
51. SK-OV-3 [SKOV-3; SKOV3] - HTB-77 | ATCC [Internet]. [cited 2024 Oct 10]. Available from: <https://www.atcc.org/products/htb-77>

52. Wang W, Gao Y, Hai J, Yang J, Duan S. HER2 decreases drug sensitivity of ovarian cancer cells via inducing stem cell-like property in an NF $\kappa$ B-dependent way. *Biosci Rep*. 2019 ;39(3):BSR20180829. doi: 10.1042/BSR20180829.
53. Hasan AA, Kalinina E, Nuzhina J, Volodina Y, Shtil A, Tatarskiy V. Potentiation of Cisplatin Cytotoxicity in Resistant Ovarian Cancer SKOV3/Cisplatin Cells by Quercetin Pre-Treatment. *Int J Mol Sci*. 2023 ;24(13):10960. doi: 10.3390/ijms241310960.
54. Zhao Y, Li Q, Wu X, Chen P. Upregulation of p27Kip1 by demethylation sensitizes cisplatin-resistant human ovarian cancer SKOV3 cells. *Mol Med Rep*. 2016 ;14(2):1659–66. doi: 10.3892/mmr.2016.5399. Epub 2016 Jun 14.
55. Ma H, Tian T, Cui Z. Targeting ovarian cancer stem cells: a new way out. *Stem Cell Res Ther*. 2023 ;14(1):28. doi: 10.1186/s13287-023-03244-4.
56. Hallou A, Jennings J, Kabla AJ. Tumour heterogeneity promotes collective invasion and cancer metastatic dissemination. *R Soc Open Sci*. 2017 ;4(8):161007. doi: 10.1098/rsos.161007.
57. Kumar V, Vashishta M, Kong L, Wu X, Lu JJ, Guha C, et al. The Role of Notch, Hedgehog, and Wnt Signaling Pathways in the Resistance of Tumors to Anticancer Therapies. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2021 [cited 2024 Oct 8];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2021.650772/full>. doi: 10.3389/fcell.2021.650772.
58. Teeuwssen M, Fodde R. Wnt Signaling in Ovarian Cancer Stemness, EMT, and Therapy Resistance. *J Clin Med* [Internet]. 2019 [cited 2024 Oct 8];8(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31614568/> doi: 10.3390/jcm8101658.
59. Bill CA, Vines CM. Phospholipase C. *Adv Exp Med Biol*. 2020 ;1131:215–42. doi: 10.1007/978-3-030-12457-1\_9.
60. Park J, Lee C, Jang J, Ghim G, Kim Y, You S, et al. Phospholipase signalling networks in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2012 [cited 2024 Oct 9];12(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23076158/> doi: 10.1038/nrc3379. Epub 2012 Oct 18.
61. Braiman A, Barda-Saad M, Sommers CL, Samelson LE. Recruitment and activation of PLC $\gamma$ 1 in T cells: a new insight into old domains. *EMBO J*. 2006 ;25(4):774–84. doi: 10.1038/sj.emboj.7600978. Epub 2006 Feb 9.
62. Owusu Obeng E, Rusciano I, Marvi MV, Fazio A, Ratti S, Follo MY, et al. Phosphoinositide-Dependent Signaling in Cancer: A Focus on Phospholipase C Isozymes. *Int J Mol Sci*. 2020 ;21(7):2581. doi: 10.3390/ijms21072581.
63. Nakamura Y, Fukami K. Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C. *J Biochem*. 2017 ;161(4):315–21. doi: 10.1093/jb/mvw094.
64. Suh PG, Park JI, Manzoli L, Cocco L, Peak JC, Katan M, et al. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep*. 2008 ;41(6):415–34. doi: 10.5483/bmbrep.2008.41.6.415.

65. Colic E, Patel PU, Kent OA. Aberrant MAPK Signaling Offers Therapeutic Potential for Treatment of Ovarian Carcinoma. *Onco Targets Ther.* 2022 ;15:1331–46. doi: 10.2147/OTT.S361512.
66. Madal S, Bandyopadhyay S, Tyagi K, Roy A. Recent advances in understanding the molecular role of phosphoinositide-specific phospholipase C gamma 1 as an emerging onco-driver and novel therapeutic target in human carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2021 [cited 2024 Oct 9];1876(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34454048/> doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188619. Epub 2021 Aug 25.
67. Yang YR, Follo MY, Cocco L, Suh PG. The physiological roles of primary phospholipase C. *Adv Biol Regul.* 2013 ;53(3):232–41. doi: 10.1016/j.jbior.2013.08.003. Epub 2013 Aug 27.
68. Koss H, Bunney TD, Esposito D, Martins M, Katan M, Driscoll PC. Dynamic Allosterism in PLC $\gamma$ 1 and Its Modulation by a Cancer Mutation Revealed by MD Simulation and NMR. *Biophys J.* 2018 ;115(1):31–45. doi: 10.1016/j.bpj.2018.05.031.
69. Reynisson J, Jaiswal JK, Barker D, D’mello SAN, Denny WA, Baguley BC, et al. Evidence that phospholipase C is involved in the antitumour action of NSC768313, a new thieno[2,3-b]pyridine derivative. *Cancer Cell Int.* 2016 ;16:18. doi: 10.1186/s12935-016-0293-6.
70. Reynisson J, Court W, O’Neill C, Day J, Patterson L, McDonald E, et al. The identification of novel PLC-gamma inhibitors using virtual high throughput screening. *Bioorg Med Chem.* 2009 ;17(8):3169–76. doi: 10.1016/j.bmc.2009.02.049. Epub 2009 Mar 3.
71. Jiang XL, Gao JC, Jiang L, Zhang PX, Kang TJ, Sun Q, et al. [Expression and significance of MAPK/ERK in the specimens and cells of epithelial ovarian cancer]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2019 ;54(8):541–7. doi: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2019.08.007.
72. Roberts CM, Cardenas C, Tedja R. The Role of Intra-Tumoral Heterogeneity and Its Clinical Relevance in Epithelial Ovarian Cancer Recurrence and Metastasis. *Cancers.* 2019 ;11(8):1083. doi: 10.3390/cancers11081083.
73. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res.* 2008 ;68(11):4311–20. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0364.
74. Agliano A, Calvo A, Box C. The challenge of targeting cancer stem cells to halt metastasis. *Seminars in Cancer Biology.* 2017 ;44:25–42. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.03.003. Epub 2017 Mar 18.
75. Seelig A. P-Glycoprotein: One Mechanism, Many Tasks and the Consequences for Pharmacotherapy of Cancers. *Front Oncol [Internet].* 2020 [cited 2024 Oct 8];10. doi: 10.3389/fonc.2020.576559.
76. Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018 ;18(7):452–64. doi: 10.1038/s41568-018-0005-8.

77. Schwarz FM, Kuhlmann JD, Kämpfer J, Klimova A, Klotz DM, Freitag L, et al. Induction of circulating ABCB1 transcripts under platinum-based chemotherapy indicates poor prognosis and a bone micrometastatic phenotype in ovarian cancer patients. *Mol Cancer*. 2024 ;23(1):174. doi: 10.1186/s12943-024-02087-8.
78. Ortiz M, Wabel E, Mitchell K, Horibata S. Mechanisms of chemotherapy resistance in ovarian cancer. *Cancer Drug Resist*. 2022 ;5(2):304–16. doi: 10.20517/cdr.2021.147.
79. Wang L, Wang X, Zhu X, Zhong L, Jiang Q, Wang Y, et al. Drug resistance in ovarian cancer: from mechanism to clinical trial. *Mol Cancer*. 2024 ;23(1):66. doi: 10.1186/s12943-024-01967-3.
80. Barzegar Behrooz A, Syahir A, Ahmad S. CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. *J Drug Target*. 2019 ;27(3):257–69. doi: 10.1080/1061186X.2018.1479756. Epub 2018 Jul 17.
81. Glumac P, LeBeau A. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin Transl Med* [Internet]. 2018 [cited 2024 Oct 8];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29984391/> doi: 10.1186/s40169-018-0198-1.
82. Marotta LLC, Almendro V, Marusyk A, Shipitsin M, Schemme J, Walker SR, et al. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44+CD24– stem cell–like breast cancer cells in human tumors. *J Clin Invest*. 2011 ;121(7):2723–35. doi: 10.1172/JCI44745.
83. Vassalli G. Aldehyde Dehydrogenases: Not Just Markers, but Functional Regulators of Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2019 ;(1):3904645. doi: 10.1155/2019/3904645.
84. Taniguchi H, Suzuki Y, Natori Y. The Evolving Landscape of Cancer Stem Cells and Ways to Overcome Cancer Heterogeneity. *Cancers*. 2019 ;11(4):532. doi: 10.3390/cancers11040532.
85. Saha S, Parte S, Roy P, Kakar SS. Ovarian Cancer Stem Cells: Characterization and Role in Tumorigenesis. In: Schatten H, editor. *Ovarian Cancer: Molecular & Diagnostic Imaging and Treatment Strategies* [Internet]. *Adv Exp Med Biol*. 2021 [cited 2024 Oct 8]. p. 151–69. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-73359-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-73359-9_10) doi: 10.1007/978-3-030-73359-9\_10.
86. Zong X, Nephew KP. Ovarian Cancer Stem Cells: Role in Metastasis and Opportunity for Therapeutic Targeting. *Cancers (Basel)*. 2019 ;11(7):934. doi: 10.3390/cancers11070934.
87. Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med*. 2017 ;23(10):1124–34. doi: 10.1038/nm.4409.
88. Wilczyński JR, Wilczyński M, Paradowska E. Cancer Stem Cells in Ovarian Cancer—A Source of Tumor Success and a Challenging Target for Novel Therapies. *Int J Mol Sc*. 2022 ;23(5):2496. doi: 10.3390/ijms23052496.
89. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, Garsed DW, George J, Fereday S, et al. Whole–genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature*. 2015 ;521(7553):489–94. doi: 10.1038/nature15716.

90. Wang B, Liu M, Zhuang R, Jiang J, Gao J, Wang H, et al. Long non-coding RNA CCAT2 promotes epithelial-mesenchymal transition involving Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in epithelial ovarian carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2018 ;15(3):3369–75. doi: 10.3892/ol.2017.7669. Epub 2017 Dec 20.
91. Ayub TH, Keyver-Paik MD, Debald M, Rostamzadeh B, Thiesler T, Schröder L, et al. Accumulation of ALDH1-positive cells after neoadjuvant chemotherapy predicts treatment resistance and prognosticates poor outcome in ovarian cancer. *Oncotarget.* 2015 ;6(18):16437–48. doi: 10.18632/oncotarget.4103.
92. Shi MF, Jiao J, Lu WG, Ye F, Ma D, Dong QG, et al. Identification of cancer stem cell-like cells from human epithelial ovarian carcinoma cell line. *Cell Mol Life Sci.* 2010 ;67(22):3915–25. doi: 10.1007/s00018-010-0420-9. Epub 2010 Jun 12.
93. Hu L, McArthur C, Jaffe RB. Ovarian cancer stem-like side-population cells are tumorigenic and chemoresistant. *Br J Cancer.* 2010 ;102(8):1276–83. doi: 10.1038/sj.bjc.6605626. Epub 2010 Mar 30.
94. O’Shea AS. Clinical Staging of Ovarian Cancer. *Methods Mol Biol.* 2022 ;2424:3–10. doi: 10.1007/978-1-0716-1956-8\_1.
95. Chien J, Poole EM. Ovarian Cancer Prevention, Screening, and Early Detection: Report From the 11th Biennial Ovarian Cancer Research Symposium. *Int J Gynecol Cancer.* 2017 ;27(9S Suppl 5):S20–2. doi: 10.1097/IGC.0000000000001118.
96. Sideris M, Menon U, Manchanda R. Screening and prevention of ovarian cancer. *The Med J Aust* [Internet]. 2024 [cited 2024 Oct 10];220(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38353066/> doi: 10.5694/mja2.52227. Epub 2024 Feb 14.
97. Gomes Ferreira M, Sancho De Salas M, González Sarmiento R, Doyague Sánchez MJ. Changes in the Management and Prognosis of Ovarian Cancer Due to the New FIGO and WHO Classifications: A Case Series Observational Descriptive Study. Seven Years of Follow-up. *Int J Gynecol Cancer.* 2018 ;28(8):1461–70. doi: 10.1097/IGC.0000000000001331.
98. Hasenburg A, Eichkorn D, Vossnagen F, Obermayr E, Geroldinger A, Zeillinger R, et al. Biomarker-based early detection of epithelial ovarian cancer based on a five-protein signature in patient’s plasma – a prospective trial. *BMC Cancer.* 2021 ;21:1037. doi: 10.1186/s12885-021-08682-y.
99. Leandersson P, Åkesson A, Hedenfalk I, Malander S, Borgfeldt C. A multiplex biomarker assay improves the diagnostic performance of HE4 and CA125 in ovarian tumor patients. *PLoS One.* 2020 ;15(10):e0240418. doi: 10.1371/journal.pone.0240418.
100. Smith RA, Andrews KS, Brooks D, Fedewa SA, Manassaram-Baptiste D, Saslow D, et al. Cancer screening in the United States, 2017: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin.* 2017 ;67(2):100–21. doi: 10.3322/caac.21392. Epub 2017 Feb 7.
101. New FIGO ovarian cancer staging guidelines [Internet]. Society of Gynecologic Oncology. [cited 2024 Oct 10]. Available from: <https://www.sgo.org/resources/new-figo-ovarian-cancer-staging-guidelines/>



102. Dochez V, Caillon H, Vaucel E, Dimet J, Winer N, Ducarme G. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *J Ovarian Res.* 2019 ;12(1):28. doi: 10.1186/s13048-019-0503-7.
103. Nebgen DR, Lu KH, Bast RC. Novel Approaches to Ovarian Cancer Screening. *Curr Oncol Rep.* 2019 ;21(8):75. doi: 10.1007/s11912-019-0816-0.
104. Barr CE, Funston G, Jeevan D, Sundar S, Mounce LTA, Crosbie EJ. The Performance of HE4 Alone and in Combination with CA125 for the Detection of Ovarian Cancer in an Enriched Primary Care Population. *Cancers.* 2022 ;14(9):2124. doi: 10.3390/cancers14092124.
105. Delvallée J, Rossard L, Bendifallah S, Touboul C, Collinet P, Bricou A, et al. Accuracy of peritoneal carcinomatosis extent diagnosis by initial FDG PET CT in epithelial ovarian cancer: A multicentre study of the FRANCOGYN research group. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2020 ;49(9):101867. doi: 10.1016/j.jogoh.2020.101867. Epub 2020 Jul 11.
106. Fabbro M, Lamy PJ, Touraine C, Floquet A, Ray-Coquard I, Mollevi C. HE4 and CA-125 kinetics to predict outcome in patients with recurrent epithelial ovarian carcinoma: the META4 clinical trial. *Front Oncol.* 2024 ;13:1308630. doi: 10.3389/fonc.2023.1308630
107. Vargas Ha, Barrett T, Sala E. MRI of ovarian masses. *J Magn Reson Imaging [Internet].* 2013 [cited 2024 Oct 16];37(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23355430/>
108. Sala E, Rockall Ag, Freeman Sj, Mitchell Dg, Reinhold C. The added role of MR imaging in treatment stratification of patients with gynecologic malignancies: what the radiologist needs to know. *Radiology [Internet].* 2013 [cited 2024 Oct 16];266(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23431227/> doi: 10.1148/radiol.12120315
109. Engbersen MP, Van Driel W, Lambregts D, Lahaye M. The role of CT, PET-CT, and MRI in ovarian cancer. *Br J Radiol.* 2021 ;94(1125):20210117. doi: 10.1259/bjr.20210117.
110. Hynninen J, Auranen A, O C, Dean K, Seppänen M, Kemppainen J, et al. FDG PET/CT in staging of advanced epithelial ovarian cancer: frequency of supradiaphragmatic lymph node metastasis challenges the traditional pattern of disease spread. *Gynecol Oncol [Internet].* 2012 [cited 2024 Oct 16];126(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22542580/> doi: 10.1016/j.ygyno.2012.04.023. Epub 2012 Apr 24.
111. Bonifácio VBD. Ovarian Cancer Biomarkers: Moving Forward in Early Detection. *Adv Exp Med Biol [Internet].* 2020 [cited 2024 Oct 10];1219. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32130708/> doi: 10.1007/978-3-030-34025-4\_18.
112. Naumann Rw, Brown J. Ovarian cancer screening with the Risk of Ovarian Cancer Algorithm (ROCA): Good, bad, or just expensive? *Gynecol Oncol [Internet].* 2018 [cited 2024 Oct 10];149(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29398069/> doi: 10.1016/j.ygyno.2018.01.029. Epub 2018 Feb 15
113. Menon U, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Singh N, Ryan A, Karpinskyj C, et al. Ovarian cancer population screening and mortality after long-term follow-up in the UK collaborative trial of ovarian cancer screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial.

Lancet. 2021 ;397(10290):2182-93. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00731-5. Epub 2021 May 12.

114. Skates SJ, Greene MH, Buys SS, Mai PL, Brown P, Piedmonte M, et al. Early Detection of Ovarian Cancer using the Risk of Ovarian Cancer Algorithm with Frequent CA125 Testing in Women at Increased Familial Risk - Combined Results from Two Screening Trials. *Clin Cancer Res.* 2017 ;23(14):3628–37. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2750. Epub 2017 Jan 31.
115. Wei X, Sun L, Slade E, Fierheller Ct, Oxley S, Kalra A, et al. Cost-Effectiveness of Gene-Specific Prevention Strategies for Ovarian and Breast Cancer. *JAMA Netw Open* [Internet]. 2024 [cited 2024 Oct 10];7(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38334999/> doi: 10.1001/jamanetworkopen.2023.55324
116. Pinsky PF, Yu K, Kramer BS, Black A, Buys SS, Partridge E, et al. Extended mortality results for ovarian cancer screening in the PLCO trial with median 15years follow-up. *Gynecol Oncol.* 2016 ;143(2):270–5. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.08.334. Epub 2016 Sep 9.
117. Kim B, Park Y, Kim B, Ahn HJ, Lee K, Chung JE, Han SW. Diagnostic performance of CA 125, HE4, and risk of Ovarian Malignancy Algorithm for ovarian cancer. *J Clin Lab Anal.* 2019 ;33(1):e22624.; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.22624> doi: 10.1002/jcla.22624. Epub 2018 Jul 15.
118. AlSomairi A, Himayda S, Altelmesani A, Lee YJ, Lee JY. Prognostic value of HE4 in advanced-stage, high-grade serous ovarian cancer: Analysis of HE4 kinetics during NACT, predicting surgical outcome and recurrence in comparison to CA125. *Gynecol Oncol.* 2024 ;181:155–61. doi: 10.1016/j.ygyno.2023.12.021. Epub 2024 Jan 3.
119. Philpott S, Raikou M, Manchanda R, Lockley M, Singh N, Scott M, et al. The avoiding late diagnosis of ovarian cancer (ALDO) project; a pilot national surveillance programme for women with pathogenic germline variants in BRCA1 and BRCA2. *J Med Genet.* 2023 ;60(5):440–9. doi: 10.1136/jmg-2022-108741. Epub 2022 Nov 1.
120. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene.* 2006 ;25(43):5864–74. doi: 10.1038/sj.onc.1209874.
121. Langelier MF, Riccio AA, Pascal JM. PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. *Nucleic Acids Res.* ;42(12):7762–75. doi: 10.1093/nar/gku474. Epub 2014 Jun 13.
122. Köbel M, Kang EY. The Evolution of Ovarian Carcinoma Subclassification. *Cancers.* 2022 ;14(2):416. doi: 10.3390/cancers14020416.
123. Chen L, Li L, Chen F, He D. Immunoexpression and prognostic role of p53 in different subtypes of epithelial ovarian carcinoma. *J Biomed Res.* 2012 ;26(4):274–7. doi: 10.7555/JBR.26.20110103. Epub 2012 Apr 24.
124. Atallah GA, Kampan NC, Chew KT, Mohd Mokhtar N, Md Zin RR, Shafiee MN bin, et al. Predicting Prognosis and Platinum Resistance in Ovarian Cancer: Role of

- Immunohistochemistry Biomarkers. *Int J Mol Sci.* 2023 ;24(3):1973. doi: 10.3390/ijms24031973.
125. Kim J, Park EY, Kim O, Schilder JM, Coffey DM, Cho CH, et al. Cell Origins of High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancers (Basel).* 2018 ;10(11):433. doi: 10.3390/cancers10110433.
126. Kurman RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Ann Oncol.* 2013 ;24 Suppl 10:x16-21. doi: 10.1093/annonc/mdt463.
127. Karnezis AN, Cho KR, Gilks CB, Pearce CL, Huntsman DG. The disparate origins of ovarian cancers: pathogenesis and prevention strategies. *Nat Rev Cancer.* 2017 ;17(1):65–74. doi: 10.1038/nrc.2016.113. Epub 2016 Nov 25.
128. Bast RC, Lu Z, Han CY, Lu KH, Anderson KS, Drescher CW, et al. Biomarkers and Strategies for Early Detection of Ovarian Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2020 ;29(12):2504–12. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-20-1057. Epub 2020 Oct 13.
129. Vanderpuye VD, Clemenceau JRV, Temin S, Aziz Z, Burke WM, Cevallos NL, et al. Assessment of Adult Women With Ovarian Masses and Treatment of Epithelial Ovarian Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *JCO Glob Oncol.* 2021 ;(7):1032–66. doi: 10.1200/GO.21.00085
130. Psomiadou V, Prodromidou A, Fotiou A, Lekka S, Iavazzo C. Robotic interval debulking surgery for advanced epithelial ovarian cancer: current challenge or future direction? A systematic review. *J Robot Surg.* 2021 ;15(2):155–63. doi: 10.1007/s11701-020-01155-7. Epub 2020 Oct 9.
131. Delga B, Classe JM, Houvenaeghel G, Blache G, Sabiani L, El Hajj H, et al. 30 Years of Experience in the Management of Stage III and IV Epithelial Ovarian Cancer: Impact of Surgical Strategies on Survival. *Cancers (Basel).* 2020 ;12(3):768. doi: 10.3390/cancers12030768.
132. Zoń A, Bednarek I. Cisplatin in Ovarian Cancer Treatment-Known Limitations in Therapy Force New Solutions. *Int J Mol Sci.* 2023 ;24(8):7585. doi: 10.3390/ijms24087585
133. Song M, Cui M, Liu K. Therapeutic strategies to overcome cisplatin resistance in ovarian cancer. *Eur J Med Chem.* 2022 ;232:114205. doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114205. Epub 2022 Feb 17.
134. Falandry C, Rousseau F, Mouret-Reynier MA, Tinquaut F, Lorusso D, Herrstedt J, et al. Efficacy and Safety of First-line Single-Agent Carboplatin vs Carboplatin Plus Paclitaxel for Vulnerable Older Adult Women With Ovarian Cancer: A GINECO/GCIG Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2021 ;7(6):853–61. doi: 10.1001/jamaoncol.2021.2471.
135. Pignata S, Breda E, Scambia G, Pisano C, Zagonel V, Lorusso D, et al. A phase II study of weekly carboplatin and paclitaxel as first-line treatment of elderly patients with advanced ovarian cancer. A Multicentre Italian Trial in Ovarian cancer (MITO-5) study. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008 ;66(3):229–36. doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.12.005. Epub 2008 Feb 1.

136. Yazinski SA, Comaills V, Buisson R, Genois MM, Nguyen HD, Ho CK, et al. ATR inhibition disrupts rewired homologous recombination and fork protection pathways in PARP inhibitor-resistant BRCA-deficient cancer cells. *Genes Dev.* 2017 ;31(3):318–32. doi: 10.1101/gad.290957.116. Epub 2017 Feb 27.
137. DiSilvestro P, Banerjee S, Colombo N, Scambia G, Kim BG, Oaknin A, et al. Overall Survival With Maintenance Olaparib at a 7-Year Follow-Up in Patients With Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer and a BRCA Mutation: The SOLO1/GOG 3004 Trial. *J Clin Oncol.* 2023 ;41(3):609–17. doi: 10.1200/JCO.22.01549. Epub 2022 Sep 9.
138. Bachy E, Seymour JF, Feugier P, Offner F, López-Guillermo A, Belada D, et al. Sustained Progression-Free Survival Benefit of Rituximab Maintenance in Patients With Follicular Lymphoma: Long-Term Results of the PRIMA Study. *J Clin Oncol.* 2019 ;37(31):2815–24. doi: 10.1200/JCO.19.01073. Epub 2019 Jul 24.
139. Sanmamed MF, Chen L. A Paradigm Shift in Cancer Immunotherapy: From Enhancement to Normalization. *Cell.* 2018 ;175(2):313–26. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.008.
140. Jiang Y, Chen M, Nie H, Yuan Y. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. *Hum Vaccin Immunother.* 2019 ;15(5):1111–22. doi: 10.1080/21645515.2019.1571892. Epub 2019 Mar 19
141. Li T, Wang X, Qin S, Chen B, Yi M, Zhou J. Targeting PARP for the optimal immunotherapy efficiency in gynecologic malignancies. *Biomed Pharmacother.* 2023 ;162:114712. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114712. Epub 2023 Apr 17.
142. Saha C, Bojdo J, Dunne NJ, Duary RK, Buckley N, McCarthy HO. Nucleic acid vaccination strategies for ovarian cancer. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 ;10:953887. doi: 10.3389/fbioe.2022.953887.
143. Sillence DJ. New insights into glycosphingolipid functions--storage, lipid rafts, and translocators. *Int Rev Cytol.* 2007 ;262:151–89. doi: 10.1016/S0074-7696(07)62003-8.
144. Wennekes T, van den Berg RJBHN, Boot RG, van der Marel GA, Overkleeft HS, Aerts JMFG. Glycosphingolipids--nature, function, and pharmacological modulation. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009 ;48(47):8848–69. doi: 10.1002/anie.200902620.
145. He X, Guan F, Lei L. Structure and function of glycosphingolipids on small extracellular vesicles. *Glycoconj J.* 2022 ;39(2):197–205. doi: 10.1007/s10719-022-10052-0. Epub 2022 Feb 24.
146. Hakomori SI. Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. *Biochim Biophys Acta.* 2008 ;1780(3):325–46. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.08.015. Epub 2007 Sep 6.
147. Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 2006 ;20(1):1–15. doi: 10.1101/gad.1376506
148. Zafar A, Sari S, Leung E, Pilkington LI, van Rensburg M, Barker D, et al. GPCR Modulation of Thieno[2,3-b]pyridine Anti-Proliferative Agents. *Molecules.* 2017 ;22(12):2254. doi: 10.3390/molecules22122254

149. Marijan S, Markotić A, Mastelić A, Režić-Mužinić N, Pilkington LI, Reynisson J, et al. Glycosphingolipid expression at breast cancer stem cells after novel thienof[2,3-b]pyridine anticancer compound treatment. *Sci Rep.* 2020 ;10(1):11876. doi: 10.1038/s41598-021-87310-y.
150. Groux-Degroote S, Guérardel Y, Delannoy P. Gangliosides: Structures, Biosynthesis, Analysis, and Roles in Cancer. *Chembiochem.* 2017 ;18(13):1146–54. doi: 10.1002/cbic.201600705. Epub 2017 Apr 24.
151. Sandhoff R, Schulze H, Sandhoff K. Ganglioside Metabolism in Health and Disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018 ;156:1–62. doi: 10.1016/bs.pmbts.2018.01.002. Epub 2018 Mar 28.
152. Liu J, Zheng X, Pang X, Li L, Wang J, Yang C, et al. Ganglioside GD3 synthase (GD3S), a novel cancer drug target. *Acta Pharm Sin B.* 2018 ;8(5):713–20. doi: 10.1016/j.apsb.2018.07.009. Epub 2018 Jul 25.
153. Tiper IV, Temkin SM, Spiegel S, Goldblum SE, Giuntoli RL, Oelke M, et al. VEGF Potentiates GD3-Mediated Immunosuppression by Human Ovarian Cancer Cells. *Clin Cancer Res.* 2016 ;22(16):4249–58. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2518. Epub 2016 Apr 13.
154. Ravindranath MH, Muthugounder S, Presser N, Selvan SR, Santin AD, Bellone S, et al. Immunogenic gangliosides in human ovarian carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 ;353(2):251–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.001. Epub 2006 Dec 14.
155. Hakomori SI, Handa K. GM3 and cancer. *Glycoconj J.* 2015 ;32(1–2):1–8. doi: 10.1007/s10719-014-9572-4. Epub 2015 Jan 23.
156. Prinetti A, Aureli M, Illuzzi G, Prioni S, Nocco V, Scandroglio F, et al. GM3 synthase overexpression results in reduced cell motility and in caveolin-1 upregulation in human ovarian carcinoma cells. *Glycobiology.* 2010 ;20(1):62–77. doi: 10.1093/glycob/cwp143. Epub 2009 Sep 16
157. Huang S, Bijangi-Vishehsaraei K, Saadatzadeh MR, Safa AR. Human GM3 Synthase Attenuates Taxol-Triggered Apoptosis Associated with Downregulation of Caspase-3 in Ovarian Cancer Cells. *J Cancer Ther.* 2012 ;3(5):504–10. doi: 10.4236/jct.2012.35065.
158. Müthing J, Burg M, Möckel B, Langer M, Metelmann-Strupat W, Werner A, et al. Preferential binding of the anticancer drug rViscumin (recombinant mistletoe lectin) to terminally alpha2-6-sialylated neolacto-series gangliosides. *Glycobiology.* 2002 ;12(8):485–97. doi: 10.1093/glycob/cwf062.
159. Pinto D, Parameswaran R. Role of Truncated O-GalNAc Glycans in Cancer Progression and Metastasis in Endocrine Cancers. *Cancers (Basel).* 2023 ;15(13):3266. doi: 10.3390/cancers15133266
160. Matsas A, Stefanoudakis D, Troupis T, Kontzoglou K, Eleftheriades M, Christopoulos P, et al. Tumor Markers and Their Diagnostic Significance in Ovarian Cancer. *Life.* 2023 ;13(8):1689. doi: 10.3390/life13081689.

161. Tanaka K, Murakami I, Mikami M, Aoki D, Iwamori M. Reduced expression of gangliosides with GM2-determinant in cervical carcinoma-derived cells after subcutaneous transplantation into nude mice. *Hum Cell*. 2023 ;36(3):1199. doi: 10.1007/s13577-023-00864-z. Epub 2023 Mar 17.
162. Markotić A, Omerović J, Marijan S, Režić-Mužinić N, Čulić VČ. Biochemical Pathways Delivering Distinct Glycosphingolipid Patterns in MDA-MB-231 and MCF-7 Breast Cancer Cells. *Curr Issues Mol Biol*. 2024 ;46(9):10200. doi: 10.3390/cimb46090608.
163. Ruzzi F, Cappello C, Semprini MS, Scalambra L, Angelicola S, Pittino OM, et al. Lipid rafts, caveolae, and epidermal growth factor receptor family: friends or foes? *Cell Commun Signal*. 2024 ;22(1):489. doi: 10.1186/s12964-024-01876-4
164. Criolioli E, Giordano Attianese GMP, Coukos G, Irving M. CAR T cells targeting the ganglioside NGcGM3 control ovarian tumors in the absence of toxicity against healthy tissues. *Front Immunol*. 2022 ;13:951143. doi: 10.3389/fimmu.2022.951143.
165. Novak A, Binnington B, Ngan B, Chadwick K, Fleshner N, Lingwood CA. Cholesterol masks membrane glycosphingolipid tumor-associated antigens to reduce their immunodetection in human cancer biopsies. *Glycobiology*. 2013 ;23(11):1230–9. doi: 10.1093/glycob/cwt059. Epub 2013 Jul 31.
166. Yu J, Hung JT, Wang SH, Cheng JY, Yu AL. Targeting glycosphingolipids for cancer immunotherapy. *FEBS Lett*. 2020 ;594(22):3602–18. doi: 10.1002/1873-3468.14250.
167. Labrada M, Dorvignit D, Hevia G, Rodríguez-Zhurbenko N, Hernández AM, Vázquez AM, et al. GM3(Neu5Gc) ganglioside: an evolution fixed neoantigen for cancer immunotherapy. *Semin Oncol*. 2018 ;45(1–2):41–51. doi: 10.1053/j.seminoncol.2018.04.003. Epub 2018 May 7.
168. Wilken JA, Badri T, Cross S, Raji R, Santin AD, Schwartz P, et al. EGFR/HER-targeted therapeutics in ovarian cancer. *Future Med Chem*. 2012 ;4(4):447–69. doi: 10.4155/fmc.12.11.
169. Mastelić A, Čikeš Čulić V, Režić Mužinić N, Vuica-Ross M, Barker D, Leung EY, et al. Glycophenotype of breast and prostate cancer stem cells treated with thieno[2,3-b]pyridine anticancer compound. *Drug Des Devel Ther*. 2017 ;11:759–69. doi: 10.2147/DDDT.S121122.
170. Levin G, Matanes E, Yasmeeen A, Meyer R, Brodeur MN, Salvador S, et al. GD2 and GD3 gangliosides as prognostic biomarkers in high grade serous ovarian cancer. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2024 ;54(1):102860. doi: 10.1016/j.jogoh.2024.102860.
171. Buffone A, Weaver VM. Don't sugarcoat it: How glycocalyx composition influences cancer progression. *J Cell Biol*. 2020 ;219(1):e201910070. doi: 10.1083/jcb.201910070.
172. Galan A, Papaluca A, Nejatie A, Matanes E, Brahimi F, Tong W, et al. GD2 and GD3 gangliosides as diagnostic biomarkers for all stages and subtypes of epithelial ovarian cancer. *Front Oncol*. 2023 ;13:1134763. doi: 10.3389/fonc.2023.1134763

173. Hough E, Hansen LK, Birknes B, Jynge K, Hansen S, Hordvik A, et al. High-resolution (1.5 Å) crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Nature*. 1989 ;338(6213):357–60. doi: 10.1038/338357a0.
174. Leung E, Pilkington LI, van Rensburg M, Jeon CY, Song M, Arabshahi HJ, et al. Synthesis and cytotoxicity of thieno[2,3-*b*]quinoline-2-carboxamide and cycloalkyl[*b*]thieno[3,2-*e*]pyridine-2-carboxamide derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2016 ;24(5):1142–54. doi:10.1016/j.bmc.2016.01.047
175. Hung JM, Arabshahi HJ, Leung E, Reynisson J, Barker D. Synthesis and cytotoxicity of thieno[2,3-*b*]pyridine and furo[2,3-*b*]pyridine derivatives. *Eur J Med Chem*. 2014 ;86:420–37. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.09.001. Epub 2014 Sep 3
176. Binsaleh NK, Wigley CA, Whitehead KA, van Rensburg M, Reynisson J, Pilkington LI, et al. Thieno[2,3-*b*]pyridine derivatives are potent anti-platelet drugs, inhibiting platelet activation, aggregation and showing synergy with aspirin. *Eur J Med Chem*. 2018 ;143:1997–2004. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.014>
177. Zhao Y, Su L, Li K, Zhao B. Discovery of novel PC-PLC activity inhibitors. *Chem Biol Drug Des*. 2020 ;95(3):380–7. doi: 10.1111/cbdd.13606. Epub 2019 Dec 19
178. Litosch I. Novel Mechanisms for Feedback Regulation of Phospholipase C-β Activity. *IUBMB Life*. 2002 ;54(5):253–60. doi: 10.1080/15216540215673.
179. Eurtivong C, Pilkington LI, van Rensburg M, White RM, Brar HK, Rees S, et al. Discovery of novel phosphatidylcholine-specific phospholipase C drug-like inhibitors as potential anticancer agents. *Eur J Med Chem*. 2020 ;187:111919. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111919. Epub 2019 Nov 27.
180. Wu X, Wang J, Liang Q, Tong R, Huang J, Yang X, et al. Recent progress on FAK inhibitors with dual targeting capabilities for cancer treatment. *Biomed Pharmacother*. 2022 ;151:113116. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113116. Epub 2022 May 19.
181. Horwacik I, Rokita H. Targeting of tumor-associated gangliosides with antibodies affects signaling pathways and leads to cell death including apoptosis. *Apoptosis*. 2015 ;20(5):679–88. doi: 10.1007/s10495-015-1103-7.
182. Miljan EA, Meuillet EJ, Mania-Farnell B, George D, Yamamoto H, Simon HG, et al. Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides. *J Biol Chem*. 2002 ;277(12):10108–13. doi: 10.1074/jbc.M111669200. Epub 2002 Jan 16.
183. Markowska A, Sajdak S, Huczyński A, Rehlis S, Markowska J. Ovarian cancer stem cells: A target for oncological therapy. *Adv Clin Exp Med*. 2018 ;27(7):1017–20. doi: 10.17219/acem/73999.
184. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 2016 ;23(1):27–47. doi: 10.1016/j.cmet.2015.12.006.
185. Saorin A, Di Gregorio E, Miolo G, Steffan A, Corona G. Emerging Role of Metabolomics in Ovarian Cancer Diagnosis. *Metabolites*. 2020 ;10(10):419. doi: 10.3390/metabo10100419.

186. Zhang A hua, Sun H, Qiu S, Wang X jun. Metabolomics in noninvasive breast cancer. *Clinica Chimica Acta*. 2013 ;424:3–7. doi: 10.1016/j.cca.2013.05.003. Epub 2013 May 10.
187. Armitage EG, Barbas C. Metabolomics in cancer biomarker discovery: current trends and future perspectives. *J Pharm Biomed Anal*. 2014 ;87:1–11. doi: 10.1016/j.jpba.2013.08.041. Epub 2013 Sep 14.
188. Cantor JR, Sabatini DM. Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces. *Cancer Discov*. 2012 ;2(10):881. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0345. Epub 2012 Sep 25.
189. Bifarin OO, Sah S, Gaul DA, Moore SG, Chen R, Palaniappan M, et al. Machine Learning Reveals Lipidome Remodeling Dynamics in a Mouse Model of Ovarian Cancer. *J Proteome Res* 2023 ;2023.01.04.520434. doi: 10.1021/acs.jproteome.3c00226. Epub 2023 May 23.
190. Govorov I, Sitkin S, Pervunina T, Moskvina A, Baranenko D, Komlichenko E. Metabolomic Biomarkers in Gynecology: A Treasure Path or a False Path? *Curr Med Chem*. 2020 ;27(22):3611–22. doi: 10.2174/0929867326666190104124245.
191. Han J, Li Q, Chen Y, Yang Y. Recent Metabolomics Analysis in Tumor Metabolism Reprogramming. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2021 [cited 2024 Oct 22];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-biosciences/articles/10.3389/fmolb.2021.763902/full>. doi: 10.3389/fmolb.2021.763902.
192. Liu M, Liu Y, Feng H, Jing Y, Zhao S, Yang S, et al. Clinical Significance of Screening Differential Metabolites in Ovarian Cancer Tissue and Ascites by LC/MS. *Front Pharmacol* [Internet]. 2021 [cited 2024 Oct 22];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2021.701487/full>. doi: 10.3389/fphar.2021.701487.
193. Ahmed-Salim Y, Galazis N, Bracewell-Milnes T, Phelps DL, Jones BP, Chan M, et al. The application of metabolomics in ovarian cancer management: a systematic review. *Int J Gynecol Cancer* [Internet]. 2021 [cited 2024 Oct 22];31(5). Available from: <https://ijgc.bmj.com/content/31/5/754> doi: 10.1136/ijgc-2020-001862. Epub 2020 Oct 26.
194. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical Applications of Metabolomics in Oncology: A Review. *Clin Cancer Res*. 2009 ;15(2):431–40. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1059.
195. Beger RD. A Review of Applications of Metabolomics in Cancer. *Metabolites*. 2013 ;3(3):552–74. doi: 10.3390/metabo3030552
196. Masamha CP, LaFontaine P. Molecular targeting of glutaminase sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapy. *J Cell Biochem*. 2018 ;119(7):6136–45. doi: 10.1002/jcb.26814. Epub 2018 Apr 10.
197. Wang M, Zhang J, Wu Y. Tumor metabolism rewiring in epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2023 ;16:108. doi: 10.1186/s13048-023-01196-0.
198. Markotić A, Culić VC, Kurir TT, Meisen I, Büntemeyer H, Boraska V, et al. Oxygenation alters ganglioside expression in rat liver following partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 ;330(1):131–41. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.02.139.



199. Arabshahi HJ, Leung E, Barker D, Reynisson J. The development of thieno[2,3-b]pyridine analogues as anticancer agents applying in silico methods. *Med Chem Commun.* 2014 ;5(2):186–91. doi: <https://doi.org/10.1039/C3MD00320E>
200. Shoemaker RH. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer.* 2006 ;6(10):813–23. doi: [10.1038/nrc1951](https://doi.org/10.1038/nrc1951).
201. Suzuki T, Conant A, Jung Y, Bax R, Antonissen A, Chen W, et al. A Stem-like Patient-Derived Ovarian Cancer Model of Platinum Resistance Reveals Dissociation of Stemness and Resistance. *Int J Mol Sci.* 2024 ;25(7):3843. doi: [10.3390/ijms25073843](https://doi.org/10.3390/ijms25073843)
202. Ediriweera MK, Tennekoon KH, Samarakoon SR. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance. *Semin Cancer Biol.* 2019 ;59:147–60. doi: [10.1016/j.semcancer.2019.05.012](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.05.012). Epub 2019 May 22.
203. Chen F, Zhu M, Li W. Advances in research on malignant transformation of endometriosis-associated ovarian cancer. *Front Oncol.* 2024 ;14:1475231. doi: [10.3389/fonc.2024.1475231](https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1475231)
204. Wei L, Yin F, Chen C, Li L. Expression of integrin  $\alpha$ -6 is associated with multi drug resistance and prognosis in ovarian cancer. *Oncol Lett.* 2019 ;17(4):3974–80. doi: [10.3892/ol.2019.10056](https://doi.org/10.3892/ol.2019.10056). Epub 2019 Feb 20.
205. Sung PL, Wen KC, Horng HC, Chang CM, Chen YJ, Lee WL, et al. The role of  $\alpha$ 2,3-linked sialylation on clear cell type epithelial ovarian cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2018 ;57(2):255–63. doi: [10.1016/j.tjog.2018.02.015](https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.02.015).
206. Mihanfar A, Aghazadeh Attari J, Mohebbi I, Majidinia M, Kaviani M, Yousefi M, et al. Ovarian cancer stem cell: A potential therapeutic target for overcoming multidrug resistance. *J Cell Physiol.* 2019 ;234(4):3238–53. doi: [10.1002/jcp.26768](https://doi.org/10.1002/jcp.26768). Epub 2018 Oct 14.
207. Pervan M, Marijan S, Markotić A, Pilkington LI, Haverkate NA, Barker D, et al. Novel Thieno [2,3-b]pyridine Anticancer Compound Lowers Cancer Stem Cell Fraction Inducing Shift of Lipid to Glucose Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2022 ;23(19):11457. doi: [10.3390/ijms231911457](https://doi.org/10.3390/ijms231911457).
208. Tanaka K, Kiguchi K, Mikami M, Aoki D, Iwamori M. Involvement of the MDR1 gene and glycolipids in anticancer drug-resistance of human ovarian carcinoma-derived cells. *Hum Cell.* 2019 ;32(4):447–52. doi: [10.1007/s13577-019-00261-5](https://doi.org/10.1007/s13577-019-00261-5). Epub 2019 Jul 26.
209. Liang YJ, Ding Y, Lavery SB, Lobaton M, Handa K, Hakomori S itiroh. Differential expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells vs. cancer non-stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013 ;110(13):4968–73. doi: [10.1073/pnas.1302825110](https://doi.org/10.1073/pnas.1302825110). Epub 2013 Mar 11.
210. Bartish M, Del Rincón SV, Rudd CE, Saragovi HU. Aiming for the Sweet Spot: Glyco-Immune Checkpoints and  $\gamma\delta$  T Cells in Targeted Immunotherapy. *Front Immunol.* 2020 ;11:564499. doi: [10.3389/fimmu.2020.564499](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.564499).
211. Dinicola S, Fabrizi G, Masiello MG, Proietti S, Palombo A, Minini M, et al. Inositol induces mesenchymal-epithelial reversion in breast cancer cells through cytoskeleton

- rearrangement. *Exp Cell Res.* 2016 ;345(1):37–50. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.05.007. Epub 2016 May 26.
212. Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer.* 2013 ;13(4):227–32. doi: 10.1038/nrc3483. Epub 2013 Feb 28.
213. Ali Khan SR, Huang S, Shamsuddin S, Inutsuka S, Whitmire KH, Siddik ZH, et al. Synthesis, characterization and cytotoxicity of new platinum(IV) axial carboxylate complexes: crystal structure of potential antitumor agent [Pt IV ( trans -1 R ,2 R -diaminocyclohexane) trans (acetate) 2 Cl 2 ]. *Bioorg Med Chem.* 2000 ;8(3):515–21. doi: 10.1016/s0968-0896(99)00313-2.
214. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab.* 2013 ;18(2):153–61. doi: 10.1016/j.cmet.2013.05.017. Epub 2013 Jun 20.
215. Alberghina L. The Warburg Effect Explained: Integration of Enhanced Glycolysis with Heterogeneous Mitochondria to Promote Cancer Cell Proliferation. *Int J Mol Sci.* 2023 ;24(21):15787. doi: 10.3390/ijms242115787.
216. Vaupel P, Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J Physiol.* 2021 ;599(6):1745–57. doi: 10.1113/JP278810. Epub 2021 Jan 4.

## **8. SAŽETAK**

Ciljevi doktorske disertacije "Učinak C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S na izražaj glikosfingolipida, citotoksičnost, apoptozu i metabolomiku u staničnoj liniji adenokarcinoma jajnika" su istražiti potencijal antitumorskog spoja na staničnim linijama karcinoma jajnika SK-OV-3 i OVCAR-3 s fokusom na citotoksičnost, apoptozu, postotak matičnih stanica raka (CSC), izražaj glikosfingolipida (GSL) i metabolomiku.

Proučavani spoj, 3-amino-*N*-(3-klor-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-*b*]kinolin-2-karboksamid (Spoj 1), sintetiziran je umjetno i upotrijebljen je za procjenu njegovih potencijalnih inhibicijskih učinaka na stanične linije raka jajnika. Citotoksičnost spoja je provedena korištenjem MTT testa koji je pokazao da je Spoj 1 bio znatno toksičan za obje stanične linije, IC<sub>50</sub> vrijednosti od 5,5 μM za SK-OV-3 i 5,0 μM za OVCAR-3 stanične linije prilikom izloženosti Spoju 1 u trajanju od 48 sati. Nadalje, Spoj 1 dovodi do indukcije apoptoze, pri čemu je primijećeno da je statistički značajno veći udio i ranih i kasnih apoptotskih stanica u obje linije nakon tretmana. Osim toga, udio CSC (matične stanice karcinoma) se značajno smanjio nakon tretmana Spojem 1, čime se ukazuje na potencijalnu značajnu ulogu u smanjenju recidiva tumora i neuspjeha liječenja. Promjene u izražaju GSL-a zabilježene su i na CSC i na ne-CSC. U SK-OV-3 staničnoj liniji, sedam od osam promatranih GSL-a pokazalo je smanjenje CSC-a, dok su ne-CSC-i pokazali povećanje izražaja GSL-a. Stanična linija OVCAR-3 pokazala je slične trendove, iako su promjene bile manje statistički značajne. Metaboličko profiliranje provedeno uz pomoć GC-MS na staničnim linijama raka jajnika prije i nakon tretmana Spojem 1 pronašla je specifične metaboličke promjene u tretiranim stanicama u odnosu na netretirane. Metabolomika je otkrila 20 metabolita u OVCAR-3 i 21 u SK-OV-3 staničnim linijama. Stanice OVCAR-3 pokazale su značajnije promjene, s osam metabolita koji su se značajno razlikovali u tretiranim naspram netretiranih stanica, dok su samo dva metabolita pokazala značajne razlike u SK-OV-3 liniji.

Rezultati pokazuju da Spoj 1 ne samo da dovodi do značajne stanične smrti, već također utječe na nekoliko ključnih signalnih puteva odgovornih za regulaciju izražaja GSL-a u staničnim linijama raka jajnika. Naglašavajući njegovu sposobnost da inducira apoptozu, smanji populaciju CSC-a i promijeni metaboličke puteve tumorskih stanica, potencijal Spoja 1 kao terapijskog agensa protiv raka jajnika je izniman.

## **9. SUMMARY**

**Effect of C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S on the expression of glycosphingolipids, cytotoxicity, apoptosis and metabolomics in the ovarian adenocarcinoma cell line:** The objectives of the doctoral dissertation "Effect of C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S on the expression of glycosphingolipids, cytotoxicity, apoptosis and metabolomics in the ovarian adenocarcinoma cell line" are to investigate the potential of the antitumor compound on the ovarian cell lines SK-OV-3 and OVCAR-3 with a focus on cytotoxicity, apoptosis, percentage of cancer stem cells (CSC), glycosphingolipid (GSL) expression and metabolomics.

The studied compound, 3-amino-*N*-(3-chloro-2-methylphenyl)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-*b*]quinoline-2-carboxamide (Compound 1), is artificially synthesized and we used it to evaluate its potential inhibitory effects on ovarian cancer cell lines. The cytotoxicity of the compound was performed using the MTT assay which showed that Compound 1 was significantly toxic to both cell lines, with IC<sub>50</sub> values of 5.5 μM for SK-OV-3 and 5.0 μM for OVCAR-3 cell lines when exposed to the compound in duration of 48 hours. Furthermore, Compound 1 leads to the induction of apoptosis, with a statistically significantly higher proportion of both early and late apoptotic cells observed in both lines after treatment. In addition, CSCs show that their proportion significantly decreased after treatment with Compound 1, thus indicating the important role of Compound 1 in tumor recurrence and treatment failure. Changes in the expression of GSLs were noted in both CSCs and non-CSCs. In the SK-OV-3 cell line, seven of the eight observed GSLs showed a decrease in CSCs, while non-CSCs showed increased GSL expression. The OVCAR-3 cell line showed similar trends, although the changes were less statistically significant. Metabolic profiling performed with GC-MS on ovarian cancer cell lines before and after treatment with Compound 1 found specific metabolic changes only in treated cells. Metabolomics revealed 20 metabolites in OVCAR-3 and 21 in SK-OV-3 cell lines. OVCAR-3 cells showed more significant changes, with eight metabolites significantly different in treated versus untreated cells, while only two metabolites showed significant differences in the SK-OV-3 line.

The results show that Compound 1 not only induces significant cell death, but also affects several key signaling pathways responsible for the regulation of GSL expression in ovarian cancer cell lines. Emphasizing its ability to induce apoptosis, reduce the population of CSCs, and alter the metabolic pathways of tumor cells, the potential of Compound 1 as a therapeutic agent against ovarian cancer is exceptional.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNNE INFORMACIJE**

**Ime:** Zdravko  
**Prezime:** Odak  
**Datum/mjesto rođenja:** 22. ožujka 1986. / Split  
**Adresa i mjesto stanovanja:** Ulica Antuna Branka Šimića, Split  
**Državljanstvo:** hrvatsko

### **• EDUKACIJA**

2024. – danas      Subspecijalizacija ginekološke onkologije Klinike za ženske bolesti i porode, KBC Split

2021. – danas      Poslijediplomski studij „Translacijska istraživanja u biomedicini”, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2014. – 2019.      Specijalizacija ginekologije i opstetricije Klinike za ženske bolesti i porode, KBC Split

2005. – 2011.      Integrirani dodiplomski studij Medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2000. – 2004.      Druga jezična gimnazija, Split

### **• RADNO ISKUSTVO**

2014. – danas      Klinički bolnički centar Split, Klinika za ženske bolesti i porode, liječnik

2012. – 2014.      Dom zdravlja Splitsko - dalmatinske županije, liječnik

2011. – 2012.      Klinički bolnički centar Split, stažist

### **• NASTAVNE AKTIVNOSTI**



2024. – danas                      Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Katedra za ginekologiju i  
porodništvo, vanjski suradnik

• **ISTRAŽIVAČKI PROJEKTI**

2023.                                  European network for Gynaecological Rare Cancer research: From  
Concept to Cure (GYNOCARE) Action CA18117;  
<https://www.cost.eu/actions/CA18117/>; znanstvenik-suradnik

•                      **PUBLIKACIJE**

2024. Odak Z, Marijan S, Radan M, Pilkington LI, Čikeš Botić M, Barker D, et al.  
Deciphering the Interplay: Thieno[2,3-b]pyridine's Impact on Glycosphingolipid Expression,  
Cytotoxicity, Apoptosis, and Metabolomics in Ovarian Tumor Cell Lines. International  
Journal of Molecular Sciences. 2024 Jan;25(13):6954. <https://doi.org/10.3390/ijms25136954>

2024. Puljak L, Bojčić R, Botić MC, Odak Z, Riva N, Gold VR, et al. Trials of interventions  
for ovarian and testicular germ cell tumors registered in ClinicalTrials.gov: a cross-sectional  
study. European Journal of Surgical Oncology [Internet]. 2024 Jul 11 [cited 2024 Jul 21];0(0).  
Available from: [https://www.ejso.com/article/S0748-7983\(24\)00597-3/abstract](https://www.ejso.com/article/S0748-7983(24)00597-3/abstract)

2017. Odak Z, Roje D, Vulić M. Disseminated genital herpes and mode of delivery. Case  
Reports in Perinatal Medicine. 2017 Sep;6(2). Available from:  
<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/crpm-2016-0071/html>

2013. Mašković I, Odak Z, Meštrović Z, Vulić M, Roje D. Porođaji donešene hipertrofične  
novorođenčadi u splitskom rodilištu. Medica Jadertina [Internet]. 2013;43(4):215-221.  
Available from: <https://hrcak.srce.hr/113423>

2013. Odak Z, Roje D, Mašković I, Vulić M, Meštrović Z, Barać M. Prijevremeni porođaji u  
splitskom rodilištu. medicina fluminensis. 2013;49(2).

- **ZNAČAJNIJI KONGRESI I RADIONICE**

- 2024. Hugo™ RAS System, robotski asistirana operacija u ginekologiji, Bruxelles, operater
- 2023. Laparoscopic gynecology surgery Course, Univerzitetni klinički center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija; sudionik
- 2023. Clinical Immersion – TruClear mechanical hysteroscopic tissue removal course, Univerzitetni klinički center Maribor, Maribor, Slovenija; sudionik
- 2023. 4. hrvatski kongres ginekološke onkologije s međunarodnim sudjelovanjem, Poreč, Hrvatska; sudionik, predavač slobodnog priopćenja
- 2022. Oncology A: Gynecologic and Breast cancers, Open Medical Institute, Salzburg, Austria; sudionik, predavač slobodnog priopćenja
- 2021. Hrvatski poslijediplomski tečaj ginekološke kirurgije i endoskopije s međunarodnim sudjelovanjem “Kurt Semm”, Hrvatsko društvo za ginekološku endoskopiju; sudionik
- 2017. Radionica napredne laparoskopije u ginekologiji, Univerzitetni klinički center Maribor, Maribor, Slovenija; sudionik
- 2014. 27. perinatalni dani „Ante Dražančić“; sudionik, predavač slobodnog priopćenja, nagrada za najboljeg mladog znanstvenika

- **ČLANSTVA**

- 2022. – danas Hrvatsko onkološko društvo
- 2022. – danas Hrvatsko društvo za ginekološku endoskopiju (HDGE), član.
- 2022. – danas Hrvatski liječnički sindikat, član
- 2011. – danas Hrvatski liječnički zbor, član
- 2011. – danas Hrvatska liječnička komora, član