

Apoptotsko djelovanje tienopiridinskog derivata na stanice humanog karcinoma grlića maternice

Jerčić, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:811463>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-25**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

I

KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET

Dora Jerčić

**APOPTOTSKO DJELOVANJE TIENOPIRIDINSKOG DERIVATA NA STANICE
HUMANOG KARCINOMA GRLIĆA MATERNICE**

Diplomski rad

Akademska godina:

2021./2022.

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

Split, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

I

KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET

Dora Jerčić

**APOPTOTSKO DJELOVANJE TIENOPIRIDINSKOG DERIVATA NA STANICE
HUMANOG KARCINOMA GRLIĆA MATERNICE**

Diplomski rad

Akademska godina:

2021./2022.

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

Split, rujan 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti

Znanstveno polje: Farmacija

Nastavni predmet: Medicinska biokemija

Tema rada prihvaćena je na 74. sjednici Vijeća studija Farmacije te potvrđena na 21. sjednici fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i 14. sjednici fakultetskog Vijeća Medicinskog fakulteta

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

Pomoć pri izradi: izv.prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

APOPTOTSKO DJELOVANJE TIENOPIRIDINSKOG DERIVATA NA STANICE HUMANOG KARCINOMA GRLIĆA MATERNICE

Dora Jerčić, broj indeksa 233

Naslov rada: Apoptotsko djelovanje tienopiridinskog derivata na stanice humanog karcinoma grlića maternice

Cilj: Cilj istraživanja bio je dokazati apoptotsko djelovanje tieno[2,3-*b*]piridinskog derivata (*E*)-3-amino-5-(3-(3-bromfenil)akrilolil)-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-6-metiltieno[2,3-*b*]piridin-2-karboksamida (inhibitor 8) na stanice humanog karcinoma grlića maternice staničnih linija HeLa i SiHa.

Materijali i metode: MTT testom provedeno je ispitivanje citotoksičnosti na staničnim linijama HeLa i SiHa te je određena potrebna koncentracija inhibitora 8 kojom je ispitivano njegovo apoptotsko djelovanje. Apoptotski učinak inhibitora 8 na stanične linije HeLa i SiHa praćen je protočnom citometrijom.

Rezultati: Prikazani su grafički kao postotak rane i kasne apoptoze i preživjelih stanica. Inhibitor 8 je inducirao ranu apoptozu kod obje ispitivane stanične linije. Nije pokazao značajan učinak na HeLa stanice u kasnoj apoptozi, dok je na SiHa stanice u ranoj apoptozi pokazan najznačajniji učinak.

Zaključci: *In vitro* izlaganje staničnih linija humanog karcinoma grlića maternice, HeLa i SiHa, tieno[2,3-*b*]piridinskom derivatu dovodi do povećanja postotka stanica u fazi apoptoze. Tretiranje karcinomskih stanica tieno[2,3-*b*]piridinskim derivatom mogao bi predstavljati novi terapijski pristup liječenja. Potrebna su daljnja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja na životinjskim modelima kako bi se potvrdilo djelovanje.

Ključne riječi: karcinom grlića maternice, tienopiridinski derivat, apoptoza

Rad sadrži: 52 stranice, 21 sliku, 11 tablica, 29 referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. Ana Šešelja Perišin, predsjednica
2. doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić, član
3. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, član – mentor

Datum obrane: 26.9.2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area: Biomedical sciences

Scientific field: Pharmacy

Course title: Medicinal biochemistry

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

Mentor: Assoc. professor Vedrana Čikeš Čulić, PhD

Technical assistance: Assoc. professor Vedrana Čikeš Čulić, PhD

APOPTOTIC EFFECT OF THIENOPYRIDINE DERIVATIVE ON HUMAN CERVICAL CARCINOMA CELLS

Dora Jerčić, index N^o 233

Diploma thesis title: Apoptotic effect of thienopyridine derivative on human cervical carcinoma cells

Objectives: The aim of the research was to prove the apoptotic action of the thieno[2,3-b]pyridine derivative (E)-3-amino-5-(3-(3-bromophenyl)acryloyl)-N-(3-chloro-2-methylphenyl)-6-methylthieno[2,3-b]pyridine-2-carboxamide (inhibitor 8) on human cervical carcinoma cells of HeLa and SiHa cell lines.

Materials and methods: The MTT test was used to test cytotoxicity on HeLa and SiHa cell lines, and the required concentration of inhibitor 8 was determined to test its apoptotic effect. The apoptotic effect of inhibitor 8 on HeLa and SiHa cell lines was monitored by flow cytometry.

Results: They are shown graphically as a percentage of early and late apoptosis and surviving cells. It can be concluded that inhibitor 8 is effective on both tested cell lines in early apoptosis and in early and late apoptosis overall. It did not show a significant effect on HeLa cells in late apoptosis, while the most significant effect was shown on SiHa cells in early apoptosis.

Conclusions: *In vitro* exposure of human cervical cancer cell lines, HeLa and SiHa, to a thieno[2,3-b]pyridine derivative leads to an increase in the percentage of cells in the apoptotic phase. Treatment of cancer cells with a thieno[2,3-b]pyridine derivative could represent a new therapeutic approach. Further *in vitro* and *in vivo* studies in animal models are required to confirm the effect.

Key words: cervical cancer, thienopyridine derivative, apoptosis

Thesis contains: 52 pages, 21 figure, 11 tables, 29 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ana Šešelja Perišin – PhD, chair person
2. Nikolina Režić Mužinić – PhD, member
3. Assoc. professor Vedrana Čikeš Čulić – PhD, member - supervisor

Defence date: 26.9.2022.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

Zahvala

Najveće hvala mojoj obitelji, posebno majci Danieli, na bezuvjetnoj ljubavi, razumijevanju i podršci u svakom trenutku školovanja.

Hvala mojoj Bubi, mojim prijateljima, kolegama i svima koji su bili uz mene tijekom ovih pet godina i učinili ih nezaboravnim.

Naposlijetku, veliko hvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić na posvećenom vremenu i trudu u izradi ovog diplomskog rada.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Rak	2
1.2. Onkogeni	4
1.3. Tumor supresorski geni	6
1.4. Apoptoza	10
1.5. Rak grlića maternice.....	12
1.6. Terapija raka grlića maternice.....	14
1.7. Epidemiologija raka grlića maternice u svijetu.....	15
1.8. Epidemiologija raka grlića maternice u Hrvatskoj.....	16
1.9. Tienopiridinski derivati	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	18
2.1. Cilj istraživanja	18
2.2. Hipoteza	20
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Stanične linije.....	21
3.1.1. HeLa	22
3.2.2. SiHa.....	23
3.2. Test apoptoze.....	25
3.3. Protočna citometrija	27
4. REZULTATI.....	28
4.1. HeLa.....	29
4.2. SiHa.....	33
5. RASPRAVA.....	37
6. ZAKLJUČAK	40
7. LITERATURA.....	42
8. SAŽETAK.....	46
9. SUMMARY	48
10. ŽIVOTOPIS	50

POPIS KRATICA:

Apaf-1 – (engl. *apoptotic protease activating factor 1*); faktor aktivacije proteaze u apoptozi

Bcl-2 – (engl. *B-cell lymphoma 2*); protein gena BCL-2

Bid – (engl. *BH3-interacting domain death agonist*); član Bcl-2 obitelji proteina koji reguliraju permeabilnost mitohondrijske membrane

BRCA 1, BRCA2 – (engl. *BReast CAncer gene*); geni čije su mutacije odgovorne za nasljednu sklonost za rak dojke

CDK – (engl. *cyclin-dependent kinases*); kinaze ovisne o ciklinima

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

CIN – cervikalna intraepitelna neoplazija

DNA – (engl. *deoxyribonucleic acid*); deoksiribonukleinska kiselina

DMEM – (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*); medij za uzgoj stanica

EGFR – (engl. *epidermal growth factor receptor*); receptor za epidermalni faktor rasta

EMA – (engl. *European Medicines Agency*); Europska agencija za lijekove

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

FBS – (engl. *Fetal bovin serum*); fetalni goveđi serum

FDA – (engl. *Food and Drug Administration*); Američka uprava za hranu i lijekove

MAP-kinaza – (engl. *mitogen-activated protein kinase*); mitogenom aktivirana protein kinaza

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

miRNA – (engl. *microRNA*); mala nekodirajuća RNK

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

PARP – (engl. *poly (ADP-ribose) polymerase*); poli (ADP-riboza) polimeraza

PBS – (engl. *phosphate-buffered saline*); izotonična otopina fosfatnog pufera s NaCl

P53 – gen za protein p53

p53 – tumor supresorski protein

Ras – (engl. *rat sarcoma*; protoonkogen); nazvan po otkriću transformirajućeg načela virusa štakorskog sarkoma

1. UVOD

1.1. Rak

U patologiji raka razlikujemo benigne od malignih tumora. Tumor je svaka nenormalna proliferacija stanica u tijelu koja može biti benigna ili maligna. Benigni tumor ostaje na mjestu na kojem je nastao i ne širi se u okolna tkiva dok se maligni tumor može proširiti na susjedna tkiva i čitav organizam preko krvožilnog ili limfatičkog sustava. Pojam rak odnosi se samo na zloćudne tumore. Slom regulacijskih mehanizama koji upravljaju ponašanjem normalne stanice, kao što su proliferacija, diferencijacija i preživljavanje, dovodi do nastanka raka. Postoji više od stotinu vrsta raka koji se jako razlikuju po ponašanju i odgovoru na liječenje jer rak može nastati zbog poremećaja proliferacije bilo koje vrste stanica u tijelu (1).

Rak predstavlja skup različitih bolesti koje se međusobno razlikuju prema svojoj biologiji, etiologiji, kliničkoj slici i načinu liječenja. Sve vrste raka nastaju od zdravih stanica procesom koji nazivamo zloćudnom pretvorbom. Stanice zbog određenih promjena izgube sposobnost adekvatnog odgovaranja na brojne signale pri čemu posljedično dolazi do nekontrolirane diobe zloćudno preobraženih stanica. Zloćudna pretvorba stanica uglavnom je posljedica promjena koje nazivamo genske mutacije te stoga možemo reći da je rak u osnovi genska bolest (2).

Douglas Hanahan i Robert A. Weinberg pokušali su sažeti i pojednostaviti kompleksnu sliku razlikovanja zdrave stanice od stanice raka. Predstavili su model s deset ključnih obilježja:

- a) samodostatnost s obzirom na signale rasta
- b) neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast
- c) neograničen potencijal umnažanja
- d) tumorska angiogeneza
- e) zaobilaženje apoptoze
- f) poremećen metabolizam
- g) sposobnost tkivne invazije i presađivanja
- h) sposobnost izbjegavanja imunološkog odgovora
- i) genomska nestabilnost

j) upala

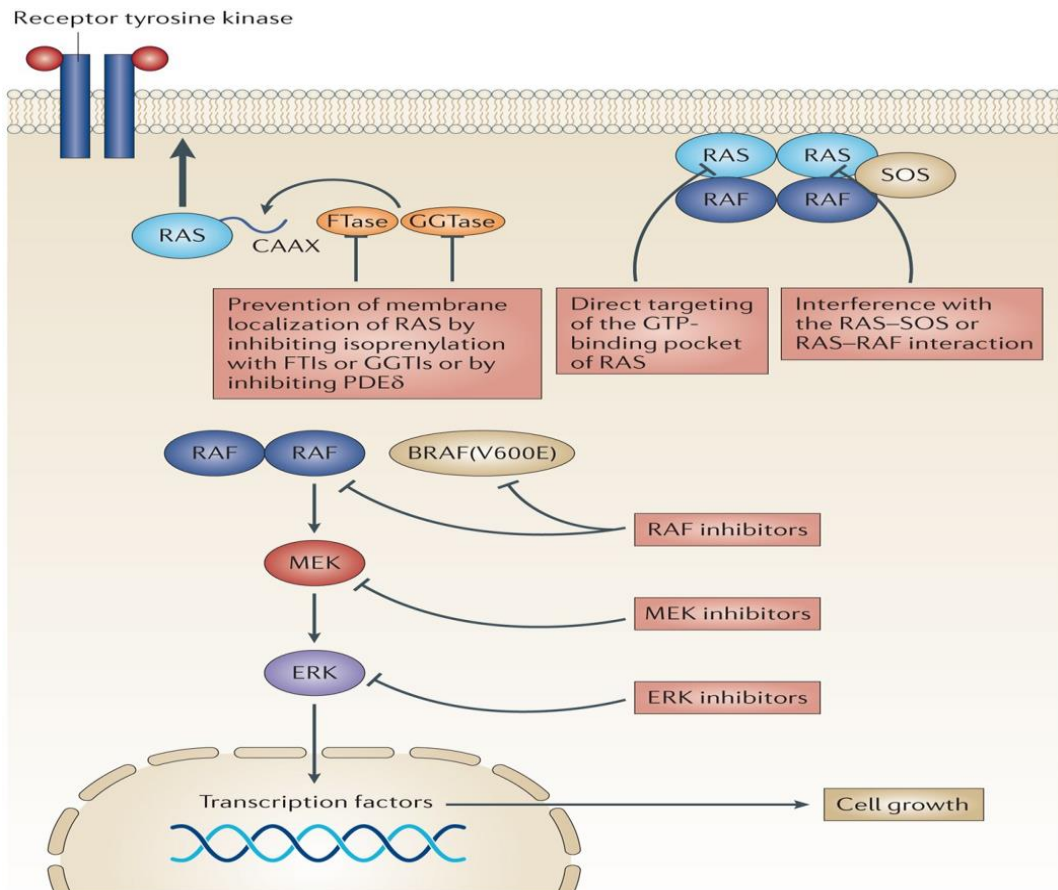
Tumorska progresija je proces kojim iz zdravoga tkiva u više koraka nastaje rak. Osim promjena u slijedu baza DNA, epigenetičke promjene kao što su modifikacije histona i metilacija DNA povezane su s nastankom i progresijom raka. Također, ulogu u nastanku i progresiji raka imaju miRNA i aktivnost telomeraza (2).

1.2. Onkogeni

Onkogeni su promijenjena inačica normalnih staničnih gena koji sudjeluju u regulaciji stanične proliferacije i diferencijacije, a nazivaju se protoonkogeni. Protoonkogeni sudjeluju u prijenosu signala u stanici i svi su evolucijski dobro očuvani. Uključeni su u prijenos signala putovima kojima se stanični rast, dioba, diferencijacija i preživljenje usklađuju s uvjetima u okolišu stanice. Stanica iz okoliša prima signale u obliku malih molekula, čimbenika rasta, koje se najčešće vežu za receptore na staničnoj membrani. Time dolazi do aktivacije receptora i prijenosa signala putem brojnih drugih molekula u stanici sve do transkripcijskih čimbenika koji potiču ekspresiju gena. Prijenos signala unutar stanice često se odvija fosforilacijom proteina što je iznimno značajno jer se za mnoge protoonkogene pokazalo da su geni za tirozin-kinaze, proteine koji mogu fosforilirati tirozinske ogranke drugih proteina. Ljudski genom ima 518 različitih gena za protein-kinaze, od kojih 90 čine geni za tirozin-kinaze (3).

Aktivacija onkogeni događa se ako se protoonkogeni promijene na način da oni sami ili njihovi proteinski produkti postanu aktivniji. Posljedično dolazi do nekontroliranog rasta i diobe stanice što uzrokuje nastanak raka. Postoji nekoliko načina kojima se onkogeni mogu aktivirati, a neki od njih su mutacije u samom genu, posljedice genske amplifikacije (povećanje broja kopije gena) ili posljedice kromosomske translokacije (kromosomski poremećaj u kojem se dio kromosoma odlomi i premjesti na drugi kromosom) pri čemu uvijek dolazi do pojačane, deregulirane aktivnosti odgovarajućeg onkoproteina (3).

Ras-Raf-MEK-ERK put prijenosa signala ima važnu ulogu u nastanku raka. Ras se aktivira pomoću EGFR receptora i nekih drugih receptora nakon čega dolazi do aktivacije serin/treonin-kinaze Raf, koja aktivira MEK-kinazu. MEK-kinaza aktivira ERK kinazu, koja se još naziva i MAP-kinaza, pri čemu se aktiviraju različiti transkripcijski čimbenici i neki drugi proteini (Slika 1.). U različitim tipovima raka mutirane su različite komponente ovog signalnog puta. Sorafenib, dabrafenib, trametinib, kobimetinib i vemurafenib su lijekovi koji djeluju specifično na taj put signalnog prijenosa. Do rezistencije na terapiju cetuksimabom i panitumumabom dolazi zbog mutacije gena RAS. Ciljna molekula lijekova temsirolimus i everolimus je protein mTOR do čije aktivacije dovodi put prijenosa signala u koji je uključen Ras. Razumijevanje uloge onkogeni i puteva prijenosa signala u nastanku raka dovelo je do razvoja ciljanih lijekova poput monoklonskih protutijela (trastuzumab, cetuksimab, pertuzumab), inhibitora protein-kinaza (imatinib, erlotinib, ibrutinib) i mnogih drugih (3).



Nature Reviews | Drug Discovery

Slika 1. Ras-Raf-MEK-ERK put prijenosa signala

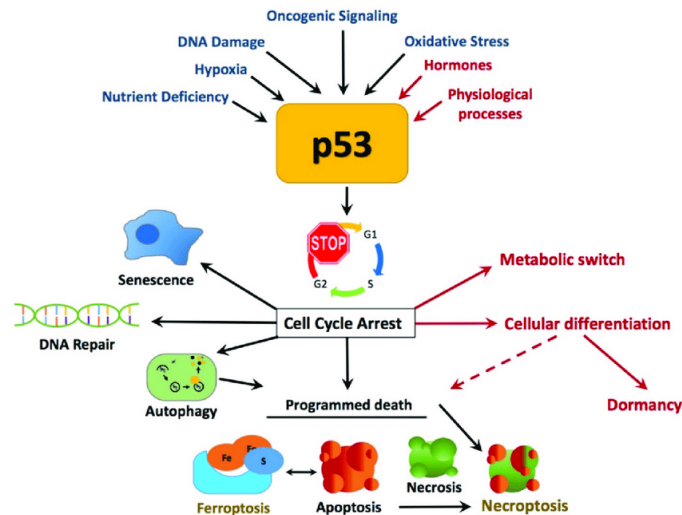
Preuzeto s <https://www.nature.com/articles/nrd4281>

Datum preuzimanja: 3.9.2022.

1.3. Tumor supresorski geni

Suprotno od onkogeni, zloćudni potencijal tumor supresorskih gena posljedica je njihove inaktivacije pri čemu dolazi do prestanka funkcioniranja nužnih kočnica u stanici koje sprječavaju diobu. Također, supresorski geni imaju ulogu u nadziranju izuzetno važnog procesa popravka oštećenja DNA (4).

Mutacije tumor supresorskih gena karakterizira potreba za inaktivacijom obaju alela da bi se očitovao njihov učinak. Inaktivacija tumor supresorskih gena može se dogoditi mutacijom, ali i epigenetički, metilacijom njihovih promotora. Prvi otkriveni tumor supresorski gen je RB koji je povezan s retinoblastomom, rakom mrežnice. Drugi važan tumor supresorski gen nazvan je p53 te je često mutiran u različitim tipovima raka u ljudi. Aktivirani p53 zaustavlja stanicu u određenoj fazi staničnog ciklusa i aktivira popravak nastalog oštećenja stanične DNA prije nego što se oštećena DNA replicira. Ukoliko se oštećenja ne poprave, p53 potiče programiranu staničnu smrt stanice (Slika 2.). Vjerojatnost nastanka raka povećana je kada p53 nedostaje ili je inaktiviran u stanici. Također, tumorska angiogeneza, kao i rezistencija na kemoterapiju i radioterapiju povezane su s inaktivacijom p53 u stanicama (5). Stanice koje nemaju p53, nakon zračenja ili djelovanja nekih lijekova koji oštećuju DNA, ne umiru apoptozom. Taj izostanak apoptoze nakon oštećenja DNA doprinosi otpornosti tumora na liječenje kemoterapijom. Također, gubitak p53 može omesti apoptozu koja je uzrokovana pomanjkanjem kisika ili faktora rasta (6).

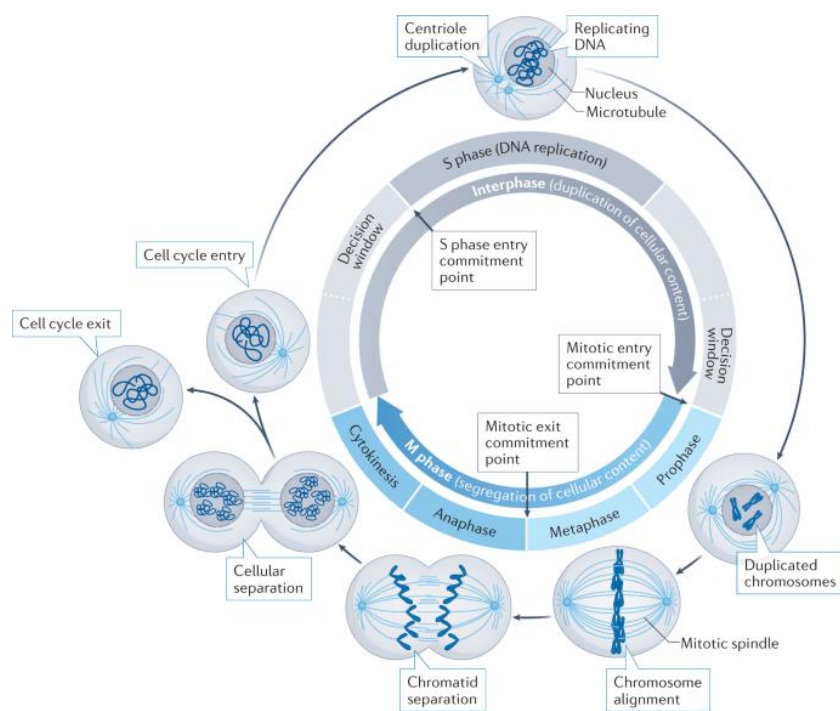


Slika 2. Uloge i djelovanje tumor supresorskog gena p53

Preuzeto s: https://www.researchgate.net/figure/p53-canonical-and-non-canonical-tumor-suppressor-roles-of-p53-p53-is-activated-by-a_fig1_325657277

Datum preuzimanja: 3.9.2022.

Nastanak raka može biti povezan i s poremećajem u regulaciji staničnog ciklusa koji se sastoji od četiriju faza. G1 fazu karakterizira pripremanje stanice za sintezu DNA, u S fazi DNA se udvostručuje, stanica se potom priprema za mitozu u fazi G2 te se konačno mitozom, u M fazi, dijeli na dvije stanice kćeri (Slika 3.). U kontrolnim točkama staničnog ciklusa, koji je vrlo složeno reguliran i pod utjecajem je različitih signala koji dolaze iz same stanice i njezinog okoliša, provjerava se može li stanica ući u sljedeću fazu ciklusa. Stanice s oštećenom DNA ne mogu proći dalje kroz stanični ciklus. Oštećena DNA karakterizira stanice raka za čiju je progresiju nužno da se regulacija staničnog ciklusa poremeti. Ciklini, kinaze ovisne o ciklinima (CDK) i inhibitori kinaza ovisnih o ciklinima imaju najvažniju ulogu u regulaciji staničnog ciklusa (5). Poremećaj aktivnosti CDK, bilo putem aktivacije proteina koji potiču aktivnost CDK ili inaktivacijom onkogenom induciranih putova starenja, česta je pojava kod raznih vrsta raka. Identificiranje i karakterizacija onih karcinoma koji zahtijevaju specifično djelovanje CDK za proliferaciju omogućava razumijevanje mehanizama za upotrebu CDK selektivnih inhibitora (7).



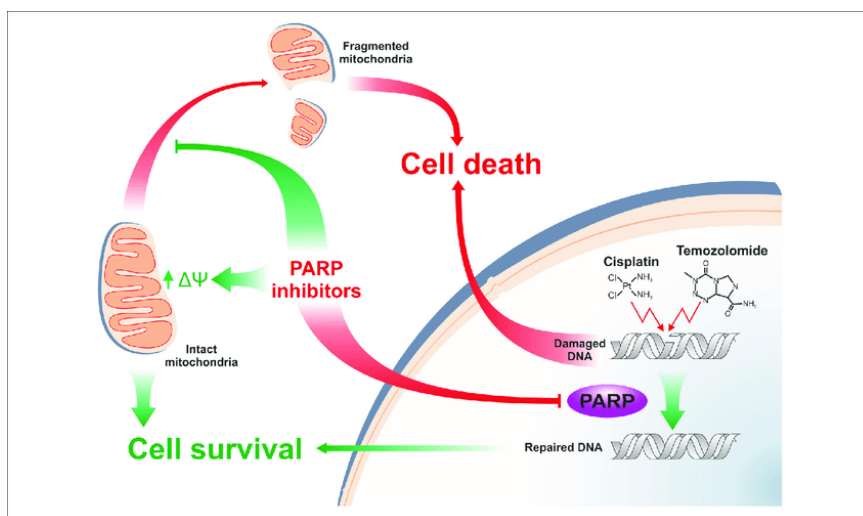
Slika 3. Faze staničnog ciklusa

Preuzeto s: <https://www.nature.com/articles/s41580-021-00404-3>

Datum preuzimanja: 4.9.2022.

Kod raka su prisutne česte promjene u genima uključenima u regulaciju staničnog ciklusa, stoga je važno naglasiti značaj kontrole staničnog ciklusa za normalan rast, diferencijaciju i diobu stanica. U regulaciji važnu ulogu ima i tumor supresorski gen RB čija je uloga narušena u većini stanica različitih tipova raka, zbog mutacija u njemu samome ili primjerice zbog pojačane ekspresije ciklina D. Palbociklib i ribociklib lijekovi su za rak koji su izravno usmjereni na mehanizme regulacije staničnog ciklusa inhibirajući CDK. Rak je manje agresivan što su stanice raka diferenciranije, ali je u većini tipova raka regulacija stanične diferencijacije djelomično ili potpuno blokirana. Također, poremećeni su mehanizmi popravka oštećenja stanične DNA kojima se ispravljaju greške nastale prilikom replikacije DNA ili zbog djelovanja mutagena. Posljedično dolazi do genomske nestabilnosti čime se povećava vjerojatnost da će se u istoj stanici dogoditi više različitih mutacija u ključnim onkogenima i tumor supresorskim genima. U skupinu gena povezanih s očuvanjem genomske stabilnosti ubrajaju se i tumor supresorski geni BRCA1 i BRCA2 koji su povezani s nasljednim rakom jajnika i dojke. U slučaju mutacije spomenutih gena, koji sudjeluju u mehanizmu popravka dvolančane DNA, stanice raka oslanjaju se na alternativne mehanizme popravka DNA. Olaparib, rucaparib, talazoparib i niraparib lijekovi su odobreni od strane Europske agencije za

lijekove (EMA) i Američke uprave za hranu i lijekove (FDA) te djeluju kao PARP-inhibitori ometajući popravak DNA (5, 8) (Slika 4.).



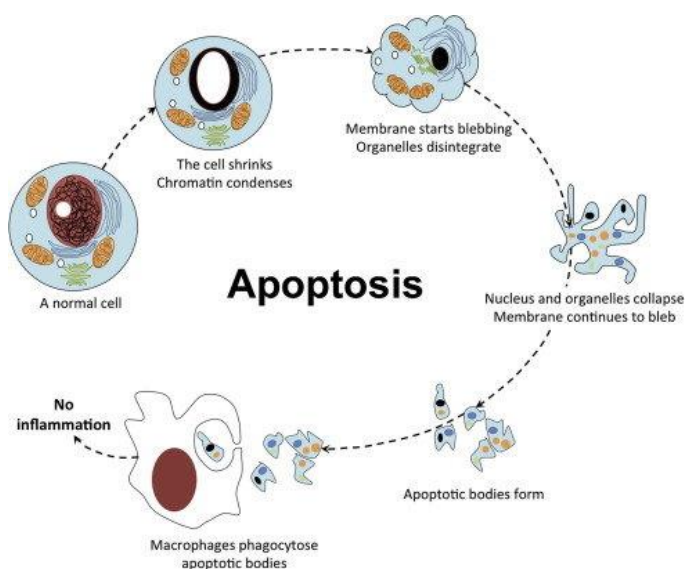
Slika 4. Princip djelovanja PARP-inhibitora

Preuzeto s: https://www.researchgate.net/figure/Effects-of-pharmacologic-PARP-inhibition-in-B16F10-melanoma-cells-Schematic-model-on_fig5_332904402

Datum preuzimanja: 4.9.2022.

1.4. Apoptoza

Apoptoza je aktivni proces programirane stanične smrti koji ima neizostavnu i nezamjenjivu ulogu u fiziološkim i patološkim stanjima. Anomalije u apoptozi povezuju se sa širokim spektrom patoloških stanja poput neurodegenerativnih bolesti, autoimunih bolesti, raka i drugih. Apoptoza je u ravnoteži sa staničnom proliferacijom i sudjeluje u održavanju konstantnog broja stanica u tijelu. Također, predstavlja i obrambeni mehanizam pomoću kojeg se potencijalno opasne stanice, primjerice one s oštećenjem DNA ili s mutacijama koje mogu dovesti do nastanka karcinoma, uklanjaju. Proces apoptoze karakterizira fragmentacija DNA zbog kidanja između nukleosoma pri čemu se kromatin kondenzira, a jezgra se raspada u male dijelove. Konačno, dolazi do raspadanja stanice u komadiće okružene membranom koje nazivamo apoptotičkim tjelešcima. Apoptotičke stanice i fragmenti podliježu fagocitozi djelovanjem makrofaga i susjednih stanica koje ih prepoznaju (Slika 5.). Jedan od signala putem kojeg se odvija prepoznavanje apoptotičkih stanica je ekspimiranje fosfatidilserina na staničnoj površini, koji je u normalnim stanicama ograničen na unutarnji sloj stanične membrane. *Ced-3* i *ced-4* dva su gena nužna za zbivanje apoptoze. Treći gen, *ced-9* djeluje kao negativni regulator apoptoze te ukoliko dođe do njegove inaktivacije zbog mutacije, stanice, koje bi normalno preživjele, umiru apoptozom. *Ced-9* inhibira *ced-4*, a *ced-4* potiče *ced-3*. Kaspaze su konačni izvršitelji apoptoze, a nastaju kodiranjem gena *ced-3*. Inhibitor DNaze, koji je odgovoran za fragmentaciju jezgrine DNA, jedna je od ključnih meta kaspaza. Kaspaze također kidaju jezgrine lamine pri čemu dolazi do fragmentacije jezgara, kidaju citoskeletne proteine uzrokujući raspad citoskeleta i dovode do fragmentacije Golgijevog aparata kidajući proteine Golgijevog matriksa. Signali koji uzrokuju apoptozu potiču aktivaciju inicijatorskih kaspaza, koje onda kidaju i aktiviraju efektorske kaspaze zaslužne za razgradnju ciljnih staničnih proteina. Kaspaza-9 ključna je inicijatorska kaspaza u stanicama sisavaca. Aktivira se vezanjem na Apaf-1 u kompleksu od više podjedinica nazvanom apoptosom. Za tvorbu ovog kompleksa potreban je i citokrom c. Konačno, kad je kaspaza-9 aktivirana u apoptosomu, ona kida i aktivira nizvodne efektorske kaspaze kao što su kaspaza-3 i kaspaza-7 što posljedično dovodi do stanične smrti (9).

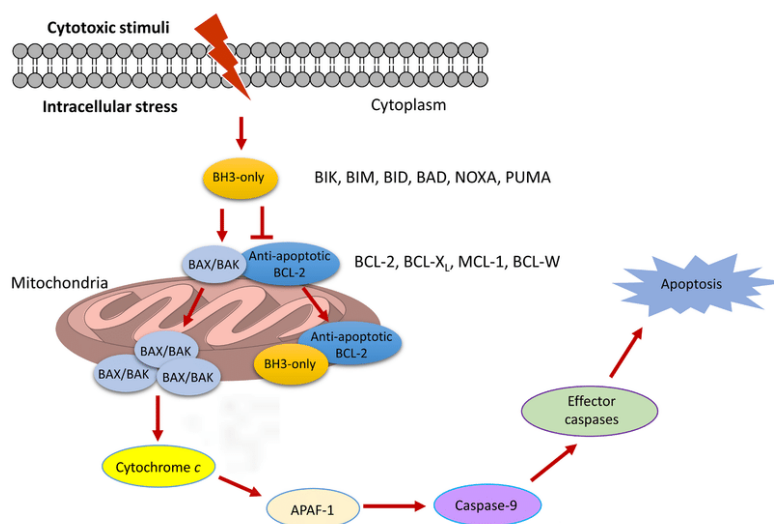


Slika 5. Proces apoptoze

Preuzeto s: <https://www.onlinebiologynotes.com/apoptosis-programmed-cell-death/>

Datum preuzimanja: 4.9.2022.

Porodica Bcl-2 uključena je u regulaciju programirane stanične smrti, a sastoji se od proapoptotičkih i antiapoptotičkih članova, dakle može poticati ili kočiti apoptozu. Bcl-2 jedan je od antiapoptotičkih članova porodice koji sprječava apoptozu. Nasuprot tome, proapoptotički članovi porodice kao što su Bax i Bak aktiviraju kaspaze i induciraju apoptozu. Stoga, Bcl-2 obitelj proteina, međusobnom regulacijom, djeluje kao kritična točka odluke o životu i smrti stanice unutar puta apoptoze (10).



Slika 6. Uloga porodice Bcl-2 proteina

Preuzeto s: https://www.researchgate.net/figure/BCL-2-family-proteins-regulate-mitochondria-mediated-intrinsic-apoptosis-pathway_fig1_343723575

Datum preuzimanja: 4.9.2022.

1.5. Rak grlića maternice

Rak grlića maternice četvrti je najčešći rak kod žena. Infekcija humanim papiloma virusom (HPV) najvažniji je čimbenik u nastanku ove bolesti. Virusni onkoproteini, najčešće E6 i E7, odgovorni su za početne promjene u epitelnim stanicama. Oni inaktiviraju dva glavna tumor supresora, p53 i RB čime se ometaju mehanizmi popravka DNA i apoptoza, što dovodi do brze stanične proliferacije i progresije raka (11). Postoji preko 100 tipova HPV virusa, od kojih najveći rizik za razvoj zloćudne bolesti predstavljaju HPV 16 i 18. Redovitim ginekološkim pregledima koji uključuju PAPA-test moguća je prevencija razvoja zloćudnih promjena jer se na vrijeme mogu uočiti promjene u tkivu i provesti adekvatno liječenje (12). PAPA-test koristi se za probir i rano otkrivanje premalignih i malignih promjena grlića maternice. Pregledom stanica tkiva može se utvrditi prisutnost upalnih i abnormalnih promjena u strukturi i izgledu stanica (tzv. promjene stanica CIN I, II ili III) (13). Moguće rješenje problema raka grlića maternice je i cijepljenje žena protiv HPV-a. Danas postoji nekoliko vrsta cjepiva kojima su uglavnom obuhvaćeni tipovi 6, 11, 16 i 18. Djelotvornost cjepiva najveća je kada se primijeni u žena prije stupanja u spolne odnose (12).

Predinvazivni tumori i rani invazivni rak nemaju simptome te se otkrivaju isključivo ginekološkim pregledom i PAPA-testom. Invazivni rak grlića maternice karakterizira nepravilno vaginalno krvarenje kao prvi simptom, te potom, u uznapredovalim stadijima, dolazi do pojave jačeg iscjetka neugodnog mirisa. Bol u maloj zdjelici, hidronefroza i posljedična uremija, otekline nogu i anemija neke su od posljedica širenja bolesti. Bolest se može proširiti u rektum i dovesti do opstrukcije, proljeva ili krvi u stolici. Kod metastatske bolesti, presadnice se najčešće nalaze u paraaortalnim limfnim čvorovima, jetri, kostima i plućima. Osim prethodno spomenutog PAPA-testa, kolposkopija može pomoći u postavljanju dijagnoze ranog stadija invazivnog raka (14). Kolposkopija je dijagnostički test poželjan kada rezultati testova ukazuju na vjerojatnost pronalaska CIN III veću od 4% (15).

U žena s rakom grlića maternice obvezno je uraditi MR zdjelice te u slučaju na sumnju invazije mokraćnog mjehura ili rektuma napraviti cistoskopiju ili rektoskopiju. Prepoznavanje moguće tumorom izazvane opstrukcije protoka mokraće radi se intravenskom urografijom. Navedene testove i dijagnostiku potrebno je nadopuniti nalazima kompletne krvne slike, diferencijalne krvne slike, biokemijskim pretragama krvi te klirensom kreatinina (14).

Tablica 1. FIGO klasifikacija raka grlića maternice (16).

Stadij 0	tumor in situ
Stadij I	rak grlića maternice ograničen na grlić maternice
Stadij I a	mikroskopski vidljiva lezija ograničena na grlić maternice
Stadij I a1	stromalna invazija 3 mm i manje (prodor u dubinu) i promjer lezije 7 mm i manje (horizontalno širenje)
Stadij I a2	stromalna invazija veća od 3 mm, a manja od 5 mm i promjer lezije veći od 7 mm
Stadij I b	klinički vidljiva lezija ograničena na grlić maternice
Stadij I b1	klinički vidljiva lezija velika 4 cm i manje u najvećoj dimenziji
Stadij I b2	klinički vidljiva lezija veća od 4 cm u najvećoj dimenziji
Stadij II	rak grlića maternice širi se izvan grlića maternice, ali ne do zdjeličnih kostiju ni donje trećine rodnice
Stadij II a	bez kliničkog zahvaćanja parametrija
Stadij II a1	klinički vidljiva lezija velika 4 cm i manje u najvećoj dimenziji
Stadij II a2	klinički vidljiva lezija veća od 4 cm u najvećoj dimenziji
Stadij II b	klinički zahvaćeni parametriji
Stadij III	rak grlića maternice širi se do zdjeličnih kostiju i/ili zahvaća donju trećinu rodnice i/ili pak uzrokuje hidronefrozou ili zatajenje rada bubrega
Stadij III a	rak grlića maternice zahvaća donju trećinu rodnice, ali bez širenja do zdjelične stjenke
Stadij III b	rak grlića maternice širi se do zdjelične stjenke i/ili uzrokuje hidronefrozou ili afunkciju bubrega
Stadij IV	rak grlića maternice širi se na susjedne organe i/ili postoje udaljene presadnice
Stadij IV a	širenje na sluznicu mokraćnoga mjehura ili rektuma
Stadij IV b	postojanje udaljenih presadnica

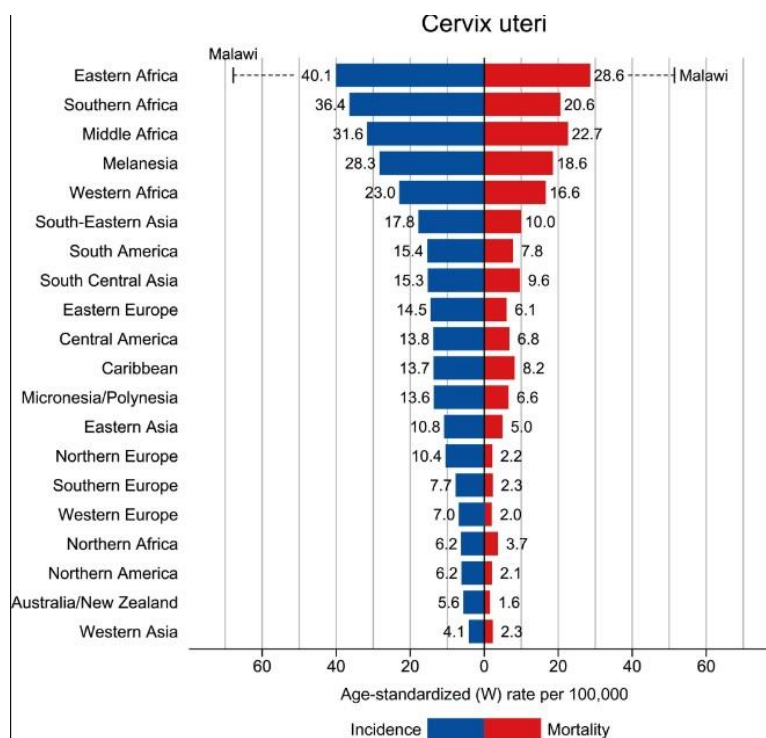
1.6. Terapija raka grlića maternice

Liječenje raka grlića maternice savjetuje se za pojedinačni slučaj i ovisi o stadiju bolesti i općem zdravlju osobe. Danas postoji nekoliko mogućnosti liječenja koje uključuju kirurško liječenje, radioterapiju, kemoterapiju te, najnovije, biološku terapiju ili kombinaciju navedenih. U žena koje su u ranoj fazi bolesti cilj je izliječiti rak, međutim, ukoliko izlječenje nije moguće, cilj je kontrolirati rak te se nastoji osigurati maksimalno kvalitetan život bez simptoma bolesti uz ograničavanje rasta i širenja karcinoma. Planiranje liječenja temelji se na sveobuhvatnom i preciznom razumijevanju prognostičkih i prediktivnih čimbenika za onkološki ishod, kvalitetu života i morbiditet. Maksimalna veličina tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i prisutnost udaljenih metastaza neki su od prognostičkih čimbenika koje je potrebno uzeti u obzir. Liječenje raka grlića maternice znatno je napredovalo, ali, unatoč tome, vrlo uznapredovali slučajevi bolesti nisu izlječivi (17).

Metastatski rak grlića maternice neizlječiv je te se liječi kemoterapijom baziranoj na cisplatinu uz dodatak paklitaksela, topotekana, gemcitabina ili ifosfamida. Kombinirana imunoterapija osigurava produljenje ukupnog preživljavanja s 13 na 17 mjeseci pa se danas pacijenticama, uz polikemoterapiju, dodaje i bevacizumab (18).

1.7. Epidemiologija raka grlića maternice u svijetu

Karcinom grlića maternice se prema svojoj pojavnosti, gledajući globalno, nalazi na 4. mjestu kod žena diljem svijeta te čini 6,5% svih slučajeva raka po učestalosti i 7,7% po smrtnosti (19). Procijenjeno je 604 000 novih slučajeva u 2020., od čega 342 000 smrtnih slučajeva diljem svijeta u 2020.. Rak grlića maternice najčešće je dijagnosticiran rak u 23 zemlje i vodeći je uzrok smrti od raka u 36 zemalja od kojih se velika većina nalazi u supsaharskoj Africi, Melaneziji, Južnoj Americi i jugoistočnoj Aziji (Slika 7.). Malavi, država u istočnoj Africi ima najveću svjetsku incidenciju i stopu mortaliteta (20). Otprilike 90% smrtnih ishoda je u zemljama s niskim stupnjem razvoja. U razvijenijim zemljama, postoje programi koji omogućuju djevojčicama cijepljenje protiv HPV-a, a ženama odlazak na redovite preglede te odgovarajuće liječenje. Visoka stopa smrtnosti od raka grlića maternice na globalnoj razini mogla bi se smanjiti učinkovitim intervencijama u različitim fazama života (21).



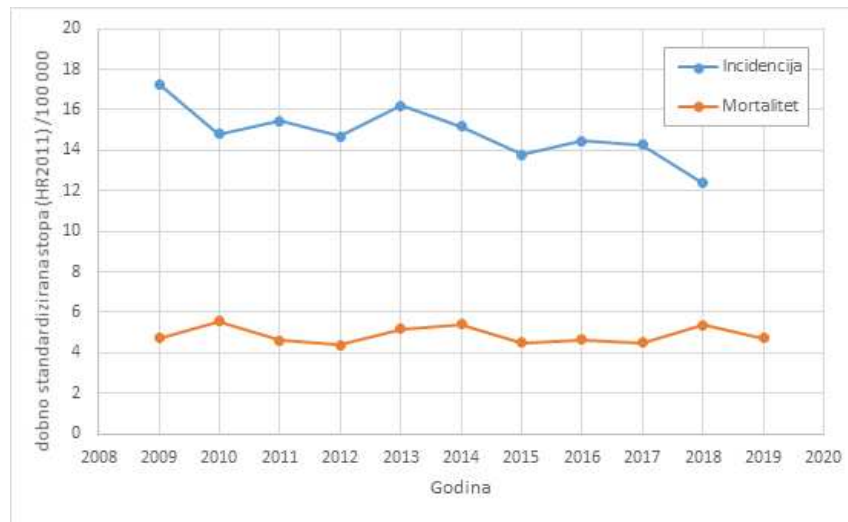
Slika 7. Dobno standardizirane stope incidencije i mortaliteta raka grlića maternice u 2020.

Preuzeto s: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>

Datum preuzimanja: 5.9.2022.

1.8. Epidemiologija raka grlića maternice u Hrvatskoj

Posljednjih se nekoliko desetljeća broj oboljelih od raka grlića maternice u Hrvatskoj smanjuje, dok je mortalitet stabilan (Slika 8.). Prema posljednjim dostupnim podacima Hrvatskog registra za rak, u 2018. godini zabilježena su 274 nova slučaja, što čini 2% ukupnog broja slučajeva raka kod žena. Prilikom dijagnoze prosječna dob bila je 55,6 godina. Iste godine od raka grlića maternice umrlo je 125 žena. Prema podacima zadnje međunarodne studije o preživljenju od raka (CONCORD-3) Hrvatska se nalazi na 20. mjestu od 28 europskih zemalja, s petogodišnjim preživljenjem od 63,2% za žene kojima je dijagnosticiran rak grlića maternice između 2010. i 2014. godine (19).



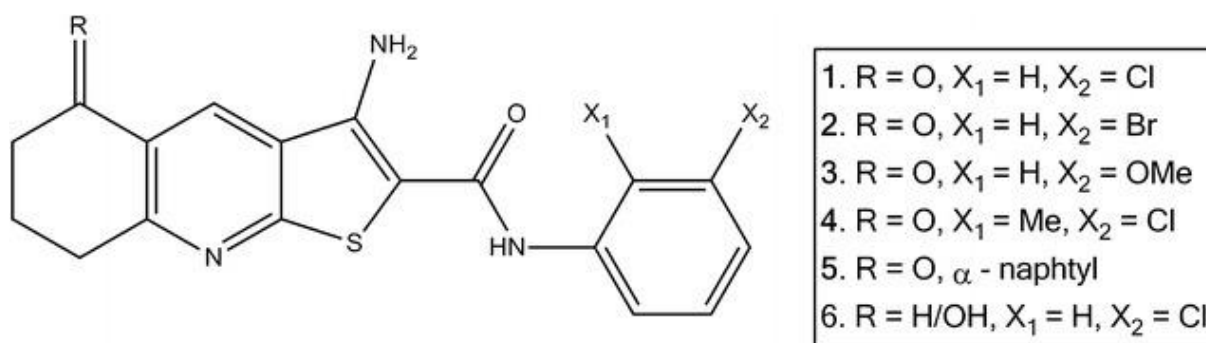
Slika 8. Incidencija i mortalitet oboljelih od raka grlića maternice u Hrvatskoj u periodu od 2008. do 2019. godine

Preuzeto s: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/epidemiologija-raka-vrata-maternice/>

Datum preuzimanja: 4.9.2022.

1.9. Tienopiridinski derivati

Tieno[2,3-*b*]piridini su antiproliferativni agensi protiv niza tumorskih staničnih linija (Slika 9.). *In vitro* ispitivanja pokazala su aktivnost potentnih analoga protiv nekoliko staničnih linija raka dojke. Istraživanje je pokazalo da je djelovanje tieno[2,3-*b*]piridinskog derivata na stanice karcinoma dojke iz stanične linije MDA-MB-231 induciralo inhibiciju rasta G2/M faze staničnog ciklusa i zaustavljanje ciklusa u G2 fazi čime je smanjena proliferacija stanica. Derivati tieno[2,3-*b*]piridina stupaju u interakciju s izoformama fosfolipaze C, koji zauzvrat utječu na staničnu dinamiku tubulina- β izazivajući zaustavljanje staničnog ciklusa u G2 fazi. Također, kombinacija derivata s paklitakselom, inhibitorom tubulina, pokazala je visok stupanj sinergije, dok su kombinacije s doksorubicinom (inhibitor topoisomeraze II) i kamptotecinom (inhibitor topoisomeraze I) pokazale samo aditivne učinke (22).



Slika 9. Strukture tieno[2,3-*b*]piridinskih derivata

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

Datum preuzimanja: 5.9.2022.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je dokazati apoptotsko djelovanje tieno[2,3-*b*]piridinskog derivata (*E*)-3-amino-5-(3-(3-bromfenil)akriloil)-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-6-metiltieno[2,3-*b*]piridin-2-karboksamida (inhibitor 8) na stanice humanog karcinoma grlića maternice.

Učinak inhibitora 8 na apoptozu ispitivat će se na stanicama karcinoma grlića maternice SiHa i HeLa.

2.2. Hipoteza

Novosintetizirani tieno[2,3-*b*]piridinski spoj (inhibitor 8) pokazat će kemoterapijsku moć zapaženu povećanom stopom apoptoze djelovanjem na ispitivane stanice staničnih linija SiHa i HeLa.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Stanične linije

U tablicama su prikazani osnovni podaci o staničnim linijama HeLa i SiHa na kojima su provedena *in vitro* ispitivanja procesa apoptoze djelovanjem tieno[2,3-*b*]piridinskog derivata, inhibitora 8.

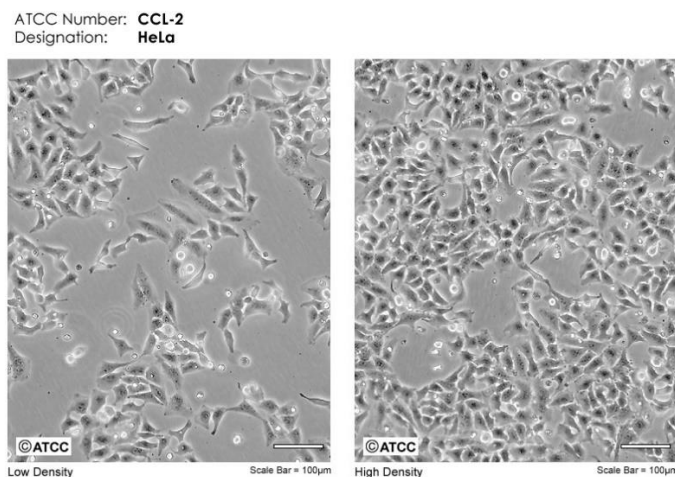
3.1.1. HeLa

Tablica 2. Karakteristike stanične linije HeLa

Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/ccl-2>

Datum preuzimanja: 5.9.2022.

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tip stanica	epitelne stanice
Morfologija	Epitelna
Tkivo	maternica, cerviks
Bolest	Adenokarcinom
Dob	31 godina
Spol	Ženski
Etnicitet	crna rasa
Primjena	3D kultura stanica, bioproizvodnja
Format proizvoda	Smrznuto
Uvjeti čuvanja	parna faza tekućeg dušika



Slika 10. Stanice karcinomske linije HeLa

Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/ccl-2>

Datum preuzimanja: 5.9.2022.

3.2.2. SiHa

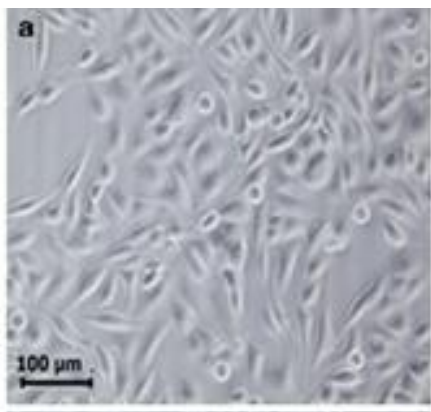
Tablica 3. Karakteristike stanične linije SiHa

Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/htb-35>

Datum preuzimanja: 5.9.2022.

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tip stanica	epitelne stanice
Morfologija	Epitelna
Tkivo	maternica, cerviks
Bolest	karcinom pločastih stanica
Dob	55 godina
Spol	Ženski
Etnicitet	Azijski
Primjena	3D kultura stanica, istraživanje raka, istraživanje zaraznih bolesti, istraživanje spolno prenosivih bolesti

Format proizvoda	Smrznuto
Uvjeti čuvanja	parna faza tekućeg dušika



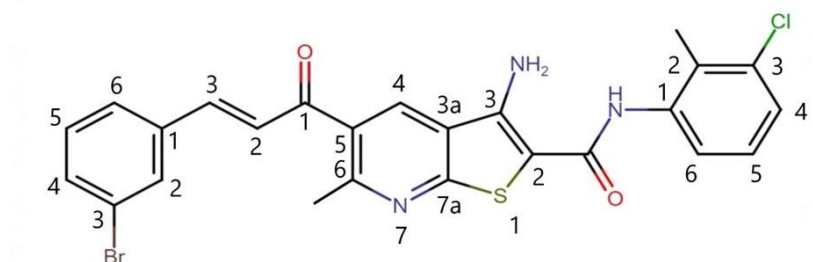
Slika 11. Stanice karcinomske linije SiHa

Preuzeto s: https://www.researchgate.net/figure/Morphology-of-SiHa-cells-a-before-treatment-and-b-d-after-incubated-with_fig5_225977369

Datum preuzimanja: 5.9.2022.

3.2. Test apoptoze

Struktura novosintetiziranog inhibitora 8 dobivena je računalnim modeliranjem (Slika 12.). Određivanje koncentracije inhibitora 8, kojim su tretirane ispitivane stanice za ispitivanje apoptotskog djelovanja, odredilo se korištenjem MTT metode.



Slika 12. Struktura tieno[2,3-*b*]piridinskog derivata (*E*)-3-amino-5-(3-(3-bromfenil)akriloil)-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-6-metiltieno[2,3-*b*]piridin-2-karboksamida

MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) test je kolorimetrijski test kojim se mjeri metabolička aktivnost u živim stanicama. Temeljno načelo testa temelji se na redukciji, u vodi topljive, žuto obojene tetrazolijeve soli u ljubičaste kristale formazana koji nisu topljivi u vodi. Odumrle stanice gube sposobnost pretvorbe MTT-a u formazan, stoga isključivo metabolički aktivne stanice vrše pretvorbu. Količina produkta formazana u izravnoj je korelaciji s postotkom živih stanica, a kvantificira se mjerenjem apsorbancije pomoću spektrofotometra (23).

Mjerenjem apsorbancije stanica koje su tretirane, u odnosu na one koje nisu tretirane tieno[2,3-*b*]piridinskim derivatima, dobijamo uvid u citotoksičnost korištenih spojeva. U ovom istraživanju, za test apoptoze HeLa i SiHa stanica, upotrijebljena koncentracija inhibitora 8 je 2,138 μM za HeLa, a 2,769 μM za SiHa stanice. Potrebna koncentracija dobivena je razrjeđivanjem inhibitora 8 izotoničnim fosfatnim puferom, PBS-om.

Stanice HeLa i SiHa čuvale su se u tekućem dušiku te su, nakon odmrzavanja, uzgajane u DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mediju na temperaturi od 37°C uz 5% CO₂. Medij sadržava fetalni goveđi serum (FBS), glukozu, aminokiseline i hranjive tvari. U mediju je također prisutno i fenolno crvenilo pa kada medij promijeni boju u narančasto-žutu treba ga

promijeniti jer to ukazuje da su ga stanice prerasle. Nakon adherencije stanica na površinu, uklanja se DMEM iz petrijeve zdjelice u kojoj su se stanice nalazile te dodaje tripsin. Cijepajući peptidne veze, tripsin omogućuje odvajanje stanica od podloge i njihovo presađivanje. Kako bi presadili jednak broj stanica u jažice, potrebno je izbrojati stanice pod mikroskopom. Stanice se miješaju s bojom Trypan Blue, koja boja mrtve stanice, u omjeru 1:1. Žive stanice ostaju prozirne pa ih je moguće izbrojati i presaditi na ploče sa 6 jažica u triplikatima. Nakon presađivanja, stanicama se dodaje DMEM koji je ostavljen da djeluje 24 sata. Idući dan isisan je medij iz jažica te su stanice, koje su adherirane za dno, tretirane s inhibitorom 8 u koncentraciji 2,138 μM (HeLa stanice), a 2,769 μM (SiHa stanice). U tri jažice koje predstavljaju kontrolu dodan je samo DMEM. Stanice su potom vraćene u inkubator na 48 sati. Nakon perioda od 48 sati, medij se usiše, stanice se odvajaju od podloge pomoću tripsina i ispiru se fosfatnim puferom (PBS). Zatim se centrifugiraju i resuspendiraju u 100 μl pufera za vezivanje. Stanicama se dodaje mix od 5 μl aneksin V-FITC (fluorescein izotiocijanat) i 10 μl PI (propidij jodid) (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit, BioLegend, San Diego, SAD). Potom se stanice inkubiraju u mraku na sobnoj temperaturi, 15 minuta te se analiziraju protočnim citometrom (BD Accuri C6, BD Biosciences). Postotak stanica koje su se nalazile u apoptozi izražava se kao broj pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica, čija je vrijednost postavljena kao 100%.

U ranim stadijima apoptoze dolazi do translokacije fosfolipida fosfatidilserina s unutarnje na vanjsku stranu membrane, čime postaje izložen na vanjskoj površini stanice. Aneksin V je fosfolipid-vezujući protein, s visokim afinitetom za fosfatidilserin, a za vezanje je potreban kalcij (24). Propidij jodid (PI) naširoko se koristi u kombinaciji s aneksinom V za proučavanje apoptotskih stanica. PI se koristi češće od ostalih nuklearnih boja zbog svoje ekonomičnosti i stabilnosti te je dobar pokazatelj održivosti stanica. Sposobnost PI da uđe u stanicu ovisi o propusnosti membrane koja je intaktna u živim stanicama. U kasnim apoptotičnim stanicama smanjuje se integritet membrana, dopuštajući PI da prođe kroz membrane te pokaže fluorescenciju (25). Bojanje stanica aneksinom V konjugiranim s FITC-om i PI omogućava razlikovanje živih stanica koje će imati kombinaciju aneksin V-/PI-, stanica u ranoj apoptozi koje će biti aneksin V+/PI-, dok će stanice u kasnoj fazi apoptoze biti aneksin V+/PI+.

3.3. Protočna citometrija

Protočna citometrija kvantitativna je metoda kojom se mogu odrediti veličina i granuliranost ispitivanih stanica. Omogućuje brzu višeparametarsku analizu pojedinačnih stanica u otopini. Protočni citometri koriste lasere kao izvore svjetlosti za proizvodnju raspršenih i fluorescentnih svjetlosnih signala koje očitavaju detektori. Ti svjetlosni signali pretvaraju se u elektroničke signale koje računalo analizira i zapisuje u podatkovnu datoteku standardiziranog formata. Stanične populacije mogu se analizirati i/ili pročistiti na temelju njihovih karakteristika raspršenja svjetlosti i/ili fluorescentnih karakteristika. U protočnoj citometriji koriste se različiti fluorescentni reagensi poput fluorescentno konjugiranih antitijela, boja za održivost, boja za vezanje nukleinskih kiselina i drugi. Protočna citometrija moćan je alat koji nalazi svoju primjenu u molekularnoj biologiji, imunologiji, biologiji raka i brojnim drugim granama medicine (26).



Slika 13. Protočni citometar BD Accuri C6

Preuzeto s: https://www.researchgate.net/figure/BD-Accuri-C6-flow-cytometer_fig4_330465410

Datum preuzimanja: 5.9.2022.

4. REZULTATI

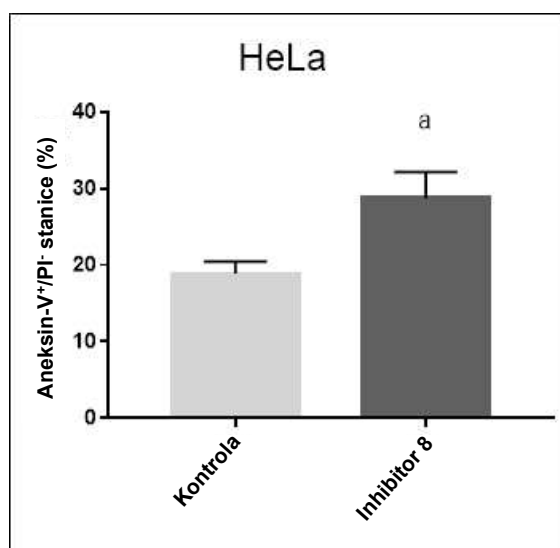
4.1. HeLa

MTT testom određena je koncentracija spoja kojom su se tretirale HeLa stanice za ispitivanje apoptotskog djelovanja te je inhibitor 8 pokazao značajniji citotoksični učinak nakon 48 sati inkubacije pri čemu je njegova koncentracija 2,138 $\mu\text{g/ml}$.

Tablica 4. Koncentracije inhibitora 8 dobivene MTT testom

	4h	24h	48h	72h
IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	ND	6,296	2,138	2,115

Postotak karcinomskih stanica koje se nalaze u ranoj fazi apoptoze, a tretirane su inhibitorom 8 (28,70%) pokazao je statistički značajan porast u odnosu na stanice koje nisu tretirane (18,88%); $P = 0,011$.

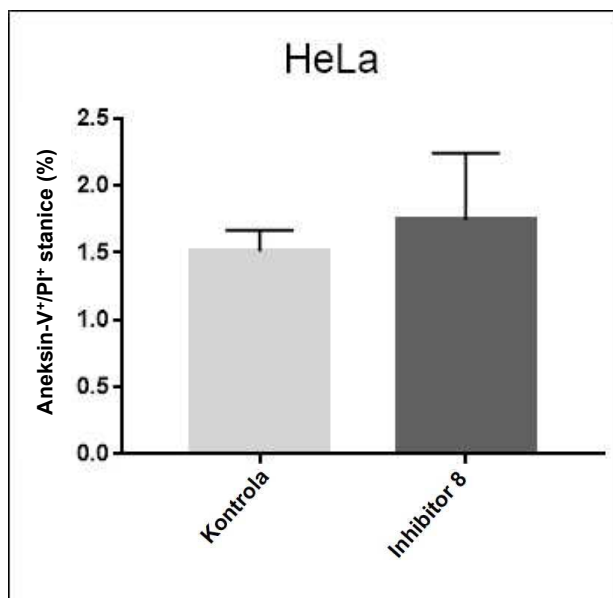


Slika 14. Djelovanje inhibitora 8 na ranu apoptozu stanične linije HeLa u odnosu na kontrolu a, P - vrijednost $<0,05$

Tablica 5. Utjecaj inhibitora 8 na ranu apoptozu stanične linije HeLa u odnosu na kontrolu

Rana apoptoza			
Značajno?	P vrijednost	Srednja vrijednost (prosjeck) kontrole	Srednja vrijednost (prosjeck) inhibitor 8
Da.	0,011	18,88	28,70

Postotak karcinomskih stanica koje se nalaze u kasnoj fazi apoptoze, a tretirane su inhibitorom 8 (1,74%) nije pokazao statistički značajan porast u odnosu na stanice koje nisu tretirane (1,51%); $P = 0,483$.

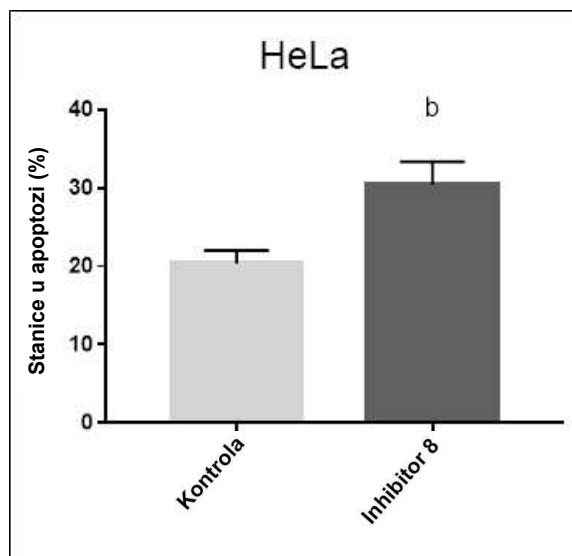


Slika 15. Djelovanje inhibitora 8 na kasnu apoptozu stanične linije HeLa u odnosu na kontrolu

Tablica 6. Utjecaj inhibitora 8 na kasnu apoptozu stanične linije HeLa u odnosu na kontrolu

Kasna apoptoza			
Značajno?	P vrijednost	Srednja vrijednost (prosjek) kontrole	Srednja vrijednost (prosjek) inhibitor 8
Ne.	0,483	1,51	1,74

Ukupan postotak karcinomskih stanica koje se nalaze u ranoj i kasnoj fazi apoptoze, a tretirane su inhibitorom 8 (30,45%) pokazao je statistički značajan porast u odnosu na stanice koje nisu tretirane (20,39%); $P = 0,006$.



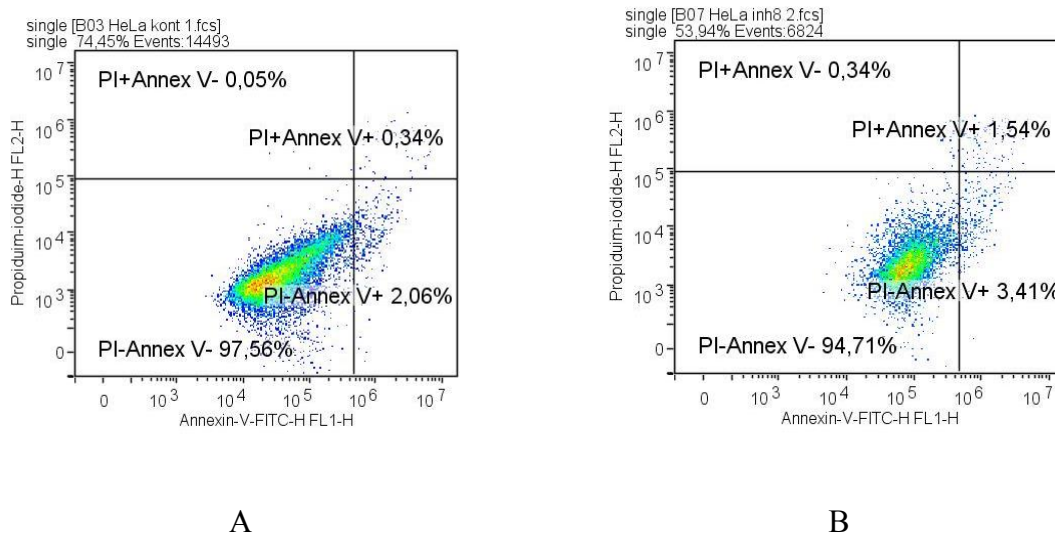
Slika 16. Djelovanje inhibitora 8 na ranu i kasnu apoptozu stanične linije HeLa u odnosu na kontrolu

b, P – vrijednost $<0,01$

Tablica 7. Utjecaj inhibitora 8 na ranu i kasnu apoptozu stanične linije HeLa u odnosu na kontrolu

Rana i kasna apoptoza			
Značajno?	P vrijednost	Srednja vrijednost (prosjeak) kontrole	Srednja vrijednost (prosjeak) inhibitor 8
Da.	0,006	20,39	30,45

Točkasti dijagrami, dobiveni protočnim citometrom, prikazuju stanične linije HeLa stanica koje nisu tretirane inhibitorom 8 i one koje jesu (Slika 17.). Iz prikaza možemo dobiti uvid u stanice koje nisu u apoptozi, koje se nalaze u ranoj te one koje se nalaze u kasnoj fazi apoptoze.



Slika 17. A - točkasti dijagram stanične linije HeLa koja nije tretirana inhibitorom 8

B - točkasti dijagram stanične linije HeLa tretirane inhibitorom 8

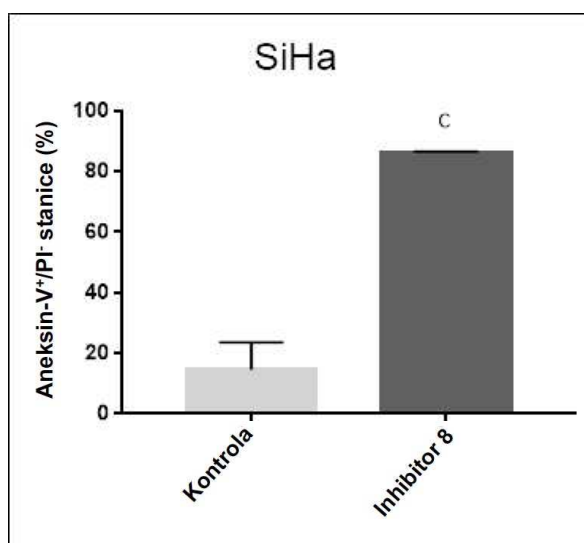
4.2. SiHa

MTT testom određena je koncentracija spoja kojom su tretirane SiHa stanice za ispitivanje apoptotskog djelovanja te je inhibitor 8 pokazao značajniji citotoksični učinak nakon 48 sati inkubacije pri čemu je njegova koncentracija 2,769 $\mu\text{g/ml}$.

Tablica 8. Koncentracije inhibitora 8 dobivene MTT testom

	4h	24h	48h	72h
IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	ND	ND	2,769	4,122

Postotak karcinomskih stanica koje se nalaze u ranoj fazi apoptoze, a tretirane su inhibitorom 8 (86,17%) pokazao je statistički iznimno značajan porast u odnosu na stanice koje nisu tretirane (14,62%); $P = 0,0001$.

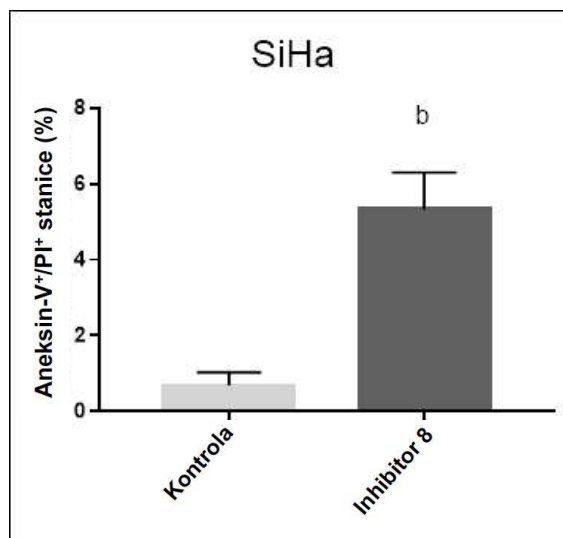


Slika 18. Djelovanje inhibitora 8 na ranu apoptozu stanične linije SiHa u odnosu na kontrolu c, P – vrijednost $<0,001$

Tablica 9. Utjecaj inhibitora 8 na ranu apoptozu stanične linije SiHa u odnosu na kontrolu

Rana apoptoza			
Značajno?	P vrijednost	Srednja vrijednost (prosjeak) kontrole	Srednja vrijednost (prosjeak) inhibitor 8
Da.	0,0001	14,62	86,17

Postotak karcinomskih stanica koje se nalaze u kasnoj fazi apoptoze, a tretirane su inhibitorom 8 (5,33%) također je pokazao statistički iznimno značajan porast u odnosu na stanice koje nisu tretirane (0,68%); $P = 0,001$.

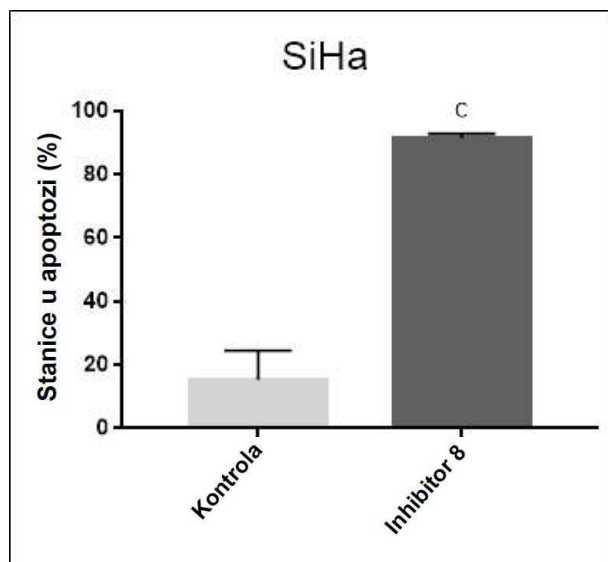


Slika 19. Djelovanje inhibitora 8 na kasnu apoptozu stanične linije SiHa u odnosu na kontrolu
b, P – vrijednost $<0,01$

Tablica 10. Utjecaj inhibitora 8 na kasnu apoptozu stanične linije SiHa u odnosu na kontrolu

Kasna apoptoza			
Značajno?	P vrijednost	Srednja vrijednost (prosjek) kontrole	Srednja vrijednost (prosjek) inhibitor 8
Da.	0,001	0,68	5,33

Ukupan postotak karcinomskih stanica koje se nalaze u ranoj i kasnoj fazi apoptoze, a tretirane su inhibitorom 8 (91,51%) također je pokazao statistički iznimno značajan porast u odnosu na stanice koje nisu tretirane (15,33%); $P = 0,0001$.

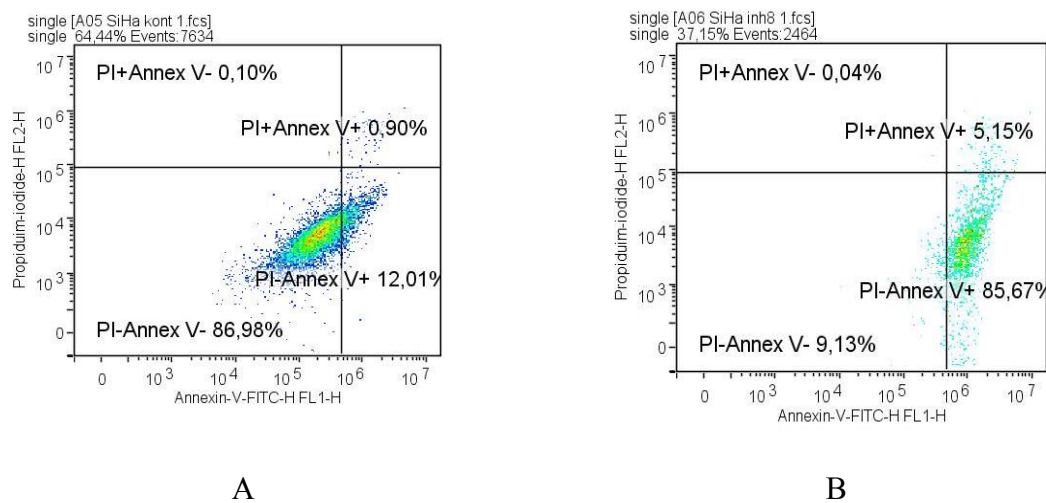


Slika 20. Djelovanje inhibitora 8 na ranu i kasnu apoptozu stanične linije SiHa u odnosu na kontrolu
c, P – vrijednost <0,001

Tablica 11. Utjecaj inhibitora 8 na ranu i kasnu apoptozu stanične linije SiHa u odnosu na kontrolu

Rana i kasna apoptoza			
Značajno?	P vrijednost	Srednja vrijednost (prosjeak) kontrole	Srednja vrijednost (prosjeak) inhibitor 8
Da.	0,0001	15,33	91,51

Točkasti dijagrami, dobiveni protočnim citometrom, prikazuju stanične linije SiHa stanica koje nisu tretirane inhibitorom 8 i one koje jesu (Slika 21.). Iz prikaza možemo dobiti uvid u stanice koje nisu u apoptozi, koje se nalaze u ranoj te one koje se nalaze u kasnoj fazi apoptoze. Primijećujemo značajnu razliku u dijagramima tretiranih i netretiranih stanica te je jasno vidljiv puno veći udio stanica koje se nalaze u apoptozi, a tretirane su inhibitorom 8, u odnosu na netretirane stanice čiji je udio u apoptotskoj fazi manji.



Slika 21. A - točkasti dijagram stanične linije SiHa koja nije tretirana inhibitorom 8
 B - točkasti dijagram stanične linije SiHa tretirane inhibitorom 8

5. RASPRAVA

Rak je vodeći uzrok smrti i predstavlja značajnu prepreku produljenju očekivanog životnog vijeka u svim zemljama svijeta. Diljem svijeta procjenjuje se da je u 2020. godini zabilježeno 19,3 milijuna novih slučajeva raka i gotovo 10 milijuna smrtnih slučajeva uzrokovanih rakom. Rak dojke kod žena nadmašio je rak pluća kao najčešće dijagnosticiran rak s procijenjenih 2,3 milijuna (11,7%) novih slučajeva, dok je rak pluća ostao vodeći uzrok smrti od raka s procijenjenih 1,8 (18%) milijuna smrti. Općenito, teret incidencije i smrtnosti od raka je u rapidnom porastu diljem svijeta. Iako je puni opseg utjecaja pandemije COVID-19 u različitim regijama svijeta trenutačno nepoznat, kašnjenja u dijagnozi i liječenju raka povezana su sa smanjenom dostupnošću zdravstvenog sustava, uključujući obustavu probira. Očekuje se da će navedeno dovesti do kratkoročnog pada incidencije raka, nakon čega će uslijediti porast dijagnoza u uznapredovalom stadiju i smrtnosti od raka u nekim zemljama (20).

Prevenција zloćudne bolesti obuhvaća mjere koje sprječavaju nastanak raka te otklanjanje uzročnih čimbenika zloćudne bolesti, primjerice prestanak pušenja i smanjenje povećane konzumacije alkohola (27). Primjena PAPA-testa kao metode probira smanjuje morbiditet i mortalitet od raka grlića maternice te se preporučuje svim spolno aktivnim ženama jednom godišnje (28).

Porodica antikancerogenih tieno[2,3-*b*]piridina dokazano je učinkovita protiv mnogih različitih staničnih linija raka. Poznato je da tieno[2,3-*b*]piridini moduliraju aktivnost brojnih molekularnih meta, uključujući receptore vezane za G proteine, receptore P2Y12, fosfolipazu C- δ 1 i druge (29).

Predmet ovog istraživanja je učinak tieno[2,3-*b*]piridinskog derivata (*E*)-3-amino-5-(3-(3-bromfenil)akriloil)-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-6-metiltieno[2,3-*b*]piridin-2-karboksamida (inhibitor 8) na apoptozu ispitivanih staničnih linija HeLa i SiHa. MTT testom utvrđena je IC50 koncentracija tieno[2,3-*b*]piridinskog derivata kojom su kasnije tretirane stanice. IC50 koncentracija inhibitora 8 iznosila je 2,138 μ M za HeLa te 2,769 μ M za SiHa stanice. Inhibitor 8 pokazao je statistički značajne rezultate u ranoj fazi apoptoze HeLa stanica ($P=0,011$), dok za HeLa stanice koje su se nalazile u kasnoj fazi apoptoze nije pokazao značajniji učinak ($P=0,483$). Također, inhibitor 8 pokazao je blagi, ali značajan porast gledajući ukupno ranu i kasnu apoptozu ($P=0,006$). Općenito, u odnosu na kontrolne stanice, inhibitor 8 pokazao je bolju apoptotsku aktivnost na staničnoj liniji SiHa u usporedbi sa staničnom linijom HeLa. Utjecaj inhibitora 8 na ranu ($P=0,0001$), kasnu ($P=0,001$) te ukupno ranu i kasnu apoptozu

($P=0,0001$) SiHa stanica od velikog je statističkog značaja. Povećanjem postotka apoptotskih stanica staničnih linija HeLa i SiHa djelovanjem tieno[2,3-*b*]piridinskog derivata dokazan je njegov učinak. Ovim rezultatom potvrđena je glavna hipoteza i ostvaren cilj istraživanja te je pokazan veliki potencijal inhibitora 8, koji bi mogao predstavljati novi terapijski pristup u liječenju karcinoma grlića maternice.

6. ZAKLJUČAK

- a) *In vitro* izlaganja stanica karcinoma grlića maternice staničnih linija HeLa i SiHa tieno[2,3-*b*]piridinskom derivatu (inhibitor 8) dovode do smanjenja preživljavanja ispitivanih stanica.
- b) Postotak HeLa stanica tretiranih inhibitorom 8 u ranoj fazi apoptoze veći je u odnosu na kontrolne (netretirane) stanice.
- c) Na HeLa stanice koje su se nalazile u kasnoj apoptotskoj fazi inhibitor 8 nije pokazao značajniji statistički učinak.
- d) Postotak HeLa stanica tretiranih inhibitorom 8 u ranoj i kasnoj apoptozi ukupno, statistički je značajan te je porastao u usporedbi s kontrolnim stanicama.
- e) Apoptotsko djelovanje inhibitora 8 veće je na staničnoj liniji SiHa nego HeLa.
- f) Na SiHa stanicama koje su tretirane inhibitorom 8, a nalazile su se u ranoj apoptozi pokazan je statistički najznačajniji učinak.
- g) Postotak SiHa stanica u kasnoj apoptozi, kao i u ranoj i kasnoj apoptozi ukupno, značajno je porastao u odnosu na kontrolne stanice te je statistički iznimno značajan.

7. LITERATURA

1. Cooper GM, Hausman RE. Rak. U: Lauc G, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 725-26.
2. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Biologija raka: Genska osnova raka. U: Raič A, urednik. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 2-3.
3. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Biologija raka: Onkogeni. U: Raič A, urednik. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 4-8.
4. Pavelić K. Genetical Factors and Infectious Agents in the Aetiology of Cancer. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju; 2000. str. 23-9.
5. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Biologija raka: Tumorsupresorski geni. U: Raič A, urednik. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str. 8–11.
6. Cooper GM, Hausman RE. Rak. U: Lauc G, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 758.
7. Wood DJ, Endicott JA. Structural insights into the functional diversity of the CDK-cyclin family. Open Biol. 2018. doi:10.1098/rsob.180112.
8. Rose M, Burgess JT, O'Byrne K, Richard DJ, Bolderson E. PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance. Front Cell Dev Biol. 2020;8:564601.
9. Cooper GM, Hausman RE. Stanična smrt i stanična obnova. U: Gordan Lauc, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 693-99.
10. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?. Genes Cells. 1998;3:697-707.
11. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. Medicina (Kaunas). 2019;55:384.
12. Pliva zdravlje [Internet]. HPV infekcija – simptomi, liječenje i cijepljenje. [datum pristupa: 4.9.2022.]; Dostupno na: <https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/10129/HPV-infekcija-simptomi-lijecenje-i-cijepljenje.html>.
13. Nacionalni program ranog otkrivanja raka vrata maternice [Internet]. PAPA test. [datum pristupa: 4.9.2022.]; Dostupno na: <https://necurak.hzjz.hr/za-zene/papa-test/>.

14. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Tumori ženskog spolnog sustava: Rak vrata maternice. U: Raič A, urednik. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 177-78.
15. Burness JV, Schroeder JM, Warren JB. Cervical Colposcopy: Indications and Risk Assessment. *Am Fam Physician*. 2020;102:39-48.
16. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Tumori ženskog spolnog sustava: Rak vrata maternice. U: Raič A, urednik. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 179.
17. Glavan Ćosić A. Etiopatogeneza, patologija i liječenje karcinoma vrata maternice. Diplomski rad, Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet; 2021.
18. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Tumori ženskog spolnog sustava: Rak vrata maternice. U: Raič A, urednik. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 179-180.
19. Hrvatski zavod za javno zdravstvo [Internet]. Epidemiologija raka vrata maternice. [datum pristupa: 4.9.2022.]; Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/epidemiologija-raka-vrata-maternice/>.
20. Sung H, Ferlay J, Siegel RL i sur. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71:209-249.
21. World Health Organisation [Internet]. Cervical cancer [datum pristupa: 4.9.2022.]; Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer#:~:text=Overview,-%20and%20middle-income%20countries>.
22. Reynisson J, Jaiswal JK, Barker D i sur. Evidence that phospholipase C is involved in the antitumour action of NSC768313, a new thieno[2,3-b]pyridine derivative. *Cancer Cell Int*. 2016;16:18.
23. Buranaamnuay K. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. *Open Vet J*. 2021;11:251-269.
24. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184:39-51.
25. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*. 2011;50:2597.

26. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018;120:5.1.1-5.1.11.
27. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Prevencija i rana dijagnostika zloćudnih tumora: Primarna prevencija. U: Raič A, urednik. *Klinička onkologija.* Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 23.
28. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Prevencija i rana dijagnostika zloćudnih tumora: Metode probira pojedinih zloćudnih tumora. U: Raič A, urednik. *Klinička onkologija.* Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 27.
29. Marijan S, Mastelić A, Markotić A, Režić-Mužinić N, Vučenović N, Barker D i sur. Thieno[2,3-*b*]Pyridine Derivative Targets Epithelial, Mesenchymal and Hybrid CD15s⁺ Breast Cancer Cells. *Medicines (Basel).* 2021;8:32.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj istraživanja bio je dokazati apoptotsko djelovanje tieno[2,3-*b*]piridinskog derivata (*E*)-3-amino-5-(3-(3-bromfenil)akriloil)-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-6-metiltieno[2,3-*b*]piridin-2-karboksamida (inhibitor 8) na stanice humanog karcinoma grlića maternice staničnih linija HeLa i SiHa.

Materijali i metode: MTT testom provedeno je ispitivanje citotoksičnosti na staničnim linijama HeLa i SiHa te je određena potrebna koncentracija inhibitora 8 kojom je ispitivano njegovo apoptotsko djelovanje. Apoptotski učinak inhibitora 8 na stanične linije HeLa i SiHa praćen je protočnom citometrijom.

Rezultati: Prikazani su grafički kao postotak rane i kasne apoptoze i preživjelih stanica. Inhibitor 8 je inducirao ranu apoptozu kod obje ispitivane stanične linije. Nije pokazao značajan učinak na HeLa stanice u kasnoj apoptozi, dok je na SiHa stanice u ranoj apoptozi pokazan najznačajniji učinak.

Zaključci: *In vitro* izlaganje staničnih linija humanog karcinoma grlića maternice, HeLa i SiHa, tieno[2,3-*b*]piridinskom derivatu dovodi do povećanja postotka stanica u fazi apoptoze. Tretiranje karcinomskih stanica tieno[2,3-*b*]piridinskim derivatom mogao bi predstavljati novi terapijski pristup liječenja. Potrebna su daljnja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja na životinjskim modelima kako bi se potvrdilo djelovanje.

9. SUMMARY

Diploma theses title: Apoptotic effect of thienopyridine derivative on human cervical carcinoma cells

Objectives: The aim of the research was to prove the apoptotic action of the thieno[2,3-b]pyridine derivative (E)-3-amino-5-(3-(3-bromophenyl)acryloyl)-N-(3-chloro-2-methylphenyl)-6-methylthieno[2,3-b]pyridine-2-carboxamide (inhibitor 8) on human cervical carcinoma cells of HeLa and SiHa cell lines.

Materials and methods: The MTT test was used to test cytotoxicity on HeLa and SiHa cell lines, and the required concentration of inhibitor 8 was determined to test its apoptotic effect. The apoptotic effect of inhibitor 8 on HeLa and SiHa cell lines was monitored by flow cytometry.

Results: They are shown graphically as a percentage of early and late apoptosis and surviving cells. It can be concluded that inhibitor 8 is effective on both tested cell lines in early apoptosis and in early and late apoptosis overall. It did not show a significant effect on HeLa cells in late apoptosis, while the most significant effect was shown on SiHa cells in early apoptosis.

Conclusions: *In vitro* exposure of human cervical cancer cell lines, HeLa and SiHa, to a thieno[2,3-b]pyridine derivative leads to an increase in the percentage of cells in the apoptotic phase. Treatment of cancer cells with a thieno[2,3-b]pyridine derivative could represent a new therapeutic approach. Further *in vitro* and *in vivo* studies with animal models are required to confirm the effect.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Dora Jerčić

Datum rođenja: 21.1.1999.

Mjesto rođenja: Split, Republika Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Lazarica 4, 21 000 Split, Republika Hrvatska

e-mail: dora.jercic@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- 2005. – 2013. Osnovna škola Pojišan, Split
- 2008. – 2013. Osnovna glazbena škola “Josip Hatze”, Split, instrument: klavir
- 2013. – 2017. Opća gimnazija “Marko Marulić”, Split
- 2017. – 2022. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, studij Farmacija
- Veljača 2022. – Kolovoz 2022. – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Bačvice

RADNO ISKUSTVO:

- Srpanj 2016. – Kolovoz 2016. Blagajnik, prodavač – Kozmo drogerija, Poljička cesta 5, Split
- Prosinac 2018. Promotor L'oreal Lux proizvoda – Douglas parfumerije
- Veljača 2019. – siječanj 2020. Promotor Nuxe i Bio Beaute kozmetike u ljekarnama
- Ožujak 2021. – svibanj 2022. Ispomoć u proizvodnji – Ljekarne Splitsko-dalmatinske županije, Galenski laboratorij

POSEBNE VJEŠTINE:

Rad na računalu: MS Office, Eskulap 2000

Strani jezici: engleski jezik, talijanski jezik

Vozačka dozvola: B kategorija