

Citotoksično djelovanje tienopiridinskog derivata na humane stanice karcinoma grlića maternice

Jelović, Maja

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:171:739124>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Maja Jelović

**CITOTOKSIČNO 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.

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 kemija i biokemija
Tema rada: je odobrena na 74. sjednici Vijeća studija Farmacije
Mentor: izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić
Pomoć pri izradi: Sandra Marijan, mag. for. chem. mol. biol.

Citotoksično djelovanje tienopiridinskog derivata na stanice humanog karcinoma grlića maternice
Maja Jelović, broj indeksa 193

Cilj istraživanja:

Cilj istraživanja bio je ispitati potencijalnu citotoksičnost novo-sintetiziranih tienopiridinskih derivata na humanim stanicama karcinoma grlića maternice HeLa i SiHa. Pretpostavka je da će se metabolička aktivnost stanica smanjiti nakon izlaganja derivatima u odnosu na kontrolnu skupinu.

Materijali i metode:

Citotoksičnost se ispitala MTT metodom koja određuje postotak metaboličkih aktivnih stanica nakon tretiranja tienopiridinskim derivatima (inhibitori 5, 6, 8 i 9). Derivati su pripremljeni u 7 različitih koncentracija: 0,05, 0,2, 0,5, 1, 2,5, 5 i 10 $\mu\text{mol/L}$. Vrijeme izlaganja stanica inhibitorima je bilo 4, 24, 48 i 72 h. Djelotvornost derivata mjerena je spektrofotometrijski na 570 nm.

Rezultati:

Inhibitori 5, 6, 8 i 9 su pokazali značajno citotoksično djelovanje na obje stanične linije HeLa i SiHa. Citotoksičnost je ovisna o koncentraciji i vremenu izlaganja stanica. Najučinkovitiji inhibitor za HeLa staničnu liniju je inhibitor 5. Inhibitor 8 je pokazao najveći utjecaj na metaboličku aktivnost SiHa stanične linije.

Zaključci:

Ispitivanje citotoksičnosti novo-sintetiziranih piridinskih derivata pokazalo je značajnu aktivnost svih derivata na obje stanične linije. Rezultati su slični za HeLa i SiHa stanice. Aktivnost je ovisna o koncentraciji i vremenu izlaganja stanica derivatima. Hipoteza ovog istraživanja je potvrđena, a cilj ostvaren. Potrebna su daljnja in vitro ispitivanja i potvrda rezultata kao i in vivo istraživanja na životinjama.

Ključne riječi: karcinom grlića maternice, citotoksičnost, MTT metoda

Rad sadrži: 43 stranica, 20 slika, 2 tablice, 29 referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. Diana Gujinović, predsjednik
2. doc. dr. sc. Jasminka Omerović, član
3. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

Datum obrane: 29.9.2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2 .

**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: Medical Chemistry and Biochemistry
Thesis subject: was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no.74
Mentor: Assoc. prof.Vedrana Čikeš Čulić, PhD
Technical assistance: Sandra Marijan, mag. for. chem. mol. biol.

Cytotoxic effect of thienopyridine derivatives on human cervical cancer cells
Maja Jelović, index number 193

Objectives:

The aim of the research was to examine the potential cytotoxicity of newly synthesized thienopyridine derivatives on HeLa and SiHa human cervical cancer cells. The assumption is that the metabolic activity of the cells will decrease after exposure to the derivative compared to the control group.

Materials and methods:

Cytotoxicity was tested by the MTT method, which determines the percentage of metabolically active cells after treatment with thienopyridine derivatives (inhibitors 5, 6, 8 and 9). The derivatives were prepared in 7 different concentrations: 0,05, 0,2, 0,5, 1, 2,5, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$. The time of exposure of cells to inhibitors was 4, 24, 48 and 72 h. The effectiveness of the derivatives was measured spectrophotometrically at 570 nm.

Results:

Inhibitors 5, 6, 8 and 9 showed significant cytotoxic activity on both HeLa and SiHa cell lines. Cytotoxicity depends on the concentration and time of exposure of the cells. The most effective inhibitor for the HeLa cell line is inhibitor 5. Inhibitor 8 showed the greatest impact on the metabolic activity of the SiHa cell line.

Conclusions:

Cytotoxicity testing of newly synthesized pyridine derivatives showed significant activity of all derivatives on both cell lines. The results are similar for HeLa and SiHa cells. The activity depends on the concentration and time of exposure of the cells to the derivatives. The hypothesis of this research was confirmed, and the objectivities achieved. Further in vitro tests and confirmation of the results as well as in vivo animal studies are required

Keywords: cervical cancer, cytotoxicity, MTT assay

Thesis contains: 43 pages, 20 figures, 2 tables, 29 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Assist. Prof. Diana Gujinović, PhD , chair person
2. Assist. Prof. Jasminka Omerović, PhD , member
3. Assoc. prof.Vedrana Čikeš Čulić, PhD , member - supervisor

Defence date: September 29, 2022

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić na velikoj pomoći, podršci te strpljenju pri izradi ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji, koja me tijekom cijelog školovanja bodrila, ohrabrivala i bila uz mene u svakom trenutku.

Također, hvala tebi Nikola što si mi bio oslonac kako u životu tako i u školovanju.

Svim mojim prijateljima i kolegama koji su postali prijatelji, hvala vam na svakoj šali, svakom saslušanom problemu, uz vas je bilo lakše.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. RAK	2
1.1.1 GENETSKA OSNOVA RAZVOJA RAKA.....	3
1.1.2 EPIDEMIOLOGIJA RAKA U HRVATSKOJ I EU.....	3
1.2 KARCINOM GRLIĆA MATERNICE	6
1.2.1 ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA	6
1.2.2 PATOHISTOLOGIJA I KLASIFIKACIJA	7
1.2.3 KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA	7
1.2.4 LIJEČENJE	8
1.3. FOSFOLIPAZA C.....	8
1.3.1. FOSFOLIPAZA C.....	8
1.3.2. CITOTOKSIČNOST INHIBITORA PLC	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	10
2.1. HIPOTEZA	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. STANIČNE LINIJE	13
3.1.1. SiHa.....	13
3.1.2. HeLa	14
3.2. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI (MTT METODA).....	14
4. REZULTATI.....	19
4.1. HeLa STANICE	20
4.2. SiHa STANICE	24
5. RASPRAVA.....	28
6. ZAKLJUČAK	31
7. LITERATURA.....	33
8. SAŽETAK.....	37
9. SUMMARY	39
10. ŽIVOTOPIS	<u>Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.</u> 42

POPIS KRATICA

ATCC – od engl. *the American Type Culture Collection*

CIN - cervikalna intraepitelna neoplazija

DAG - diacilglicerol

DMEM - od engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - dimetil sulfoksid

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

FBS - od engl. *fetal bovine serum*

HPV- humani papiloma virus

IP3 - inozitol 1, 4, 5-trifosfat

PBS - od engl. *phosphate buffer saline*

PCK - protein kinaza C

PIP2 - fosfatidilinozitol 4, 5-bifosfat

PLC - fosfolipaza C

1. UVOD

1.1. RAK

Rak, neoplazma ili novotvorina (grč. *neos* – nov, *plasia* – rast) općeniti je pojam za mnoge bolesti u kojih se abnormalne stanice dijele bez kontrole te su u stanju napasti zdravo tkivo (1). Definicija neoplazme po engleskom patologu Sir Rupertu Willisu bila bi da je to abnormalna masa tkiva, čiji rast prekoračuje i nije koordiniran s onim u normalnim tkivima, nastavlja se na isti prekomjeren način i nakon prestanka podražaja koji izazivaju rast (2).

Razlika rasta normalnih i tumorskih stanica je u: autonomiji (neovisnost o faktorima rasta, regulatornim mehanizmima), prekomjernosti (ovaj višak može biti vidljiv i u samoj veličini izrasline), neorganiziranosti (strukture tumorskih tkiva se razlikuju od normalnih te ne pristaju u opću organizaciju organizma) (2).

Tumori mogu biti dobroćudni (benigni) te zloćudni (maligni). Zloćudnost ili malignost tumora se odnosi na njegovo svojstvo da se širi na okolne organe odnosno uništavanje okolnog tkiva. Na taj način se stvaraju metastaze putem limfnog ili krvožilnog sustava. Pri tom se zadržava vrsta tumora primarnog organa neovisno o odredišnom organu. Prilikom rasta, stanice tumora mogu pritiskati okolno tkivo ometajući njegovu funkciju te mu oduzimati hranjive tvari tvoreći vlastitu opskrbu krvlju. Stanice tumora nastaju iz zdravih stanica te zadržavaju njihov mikroskopski i genetski izgled. Navedeno svojstvo omogućuje onkologu planiranje liječenja temeljem praćenja rasta stanica kao i napredovanje raka (1).

Prema istraživanju provedenom u Kini, navedeni su neki od rizika koji pospješuju razvoj raka. Pušenje je jedan od osnovnih rizika koji pospješuju razvoj preko 15 tumora. Fizička neaktivnost povezana je s rakom dojke, debelog crijeva, kao i pluća i jetre. Prehrana bogata vlaknima i cjelovitim žitaricama štiti od raka debelog crijeva, dok crveno meso može uzrokovati povećan rizik za istim. Konzumacija alkohola povećava rizik za nastanak 6 vrsta tumora. Neki od kliničkih faktora rizika su višak tjelesne masnoće, dijabetes i zarazne bolesti. Okolišni čimbenici su zagađenje zraka te profesionalna izloženost (3).

1.1.1 GENETSKA OSNOVA RAZVOJA RAKA

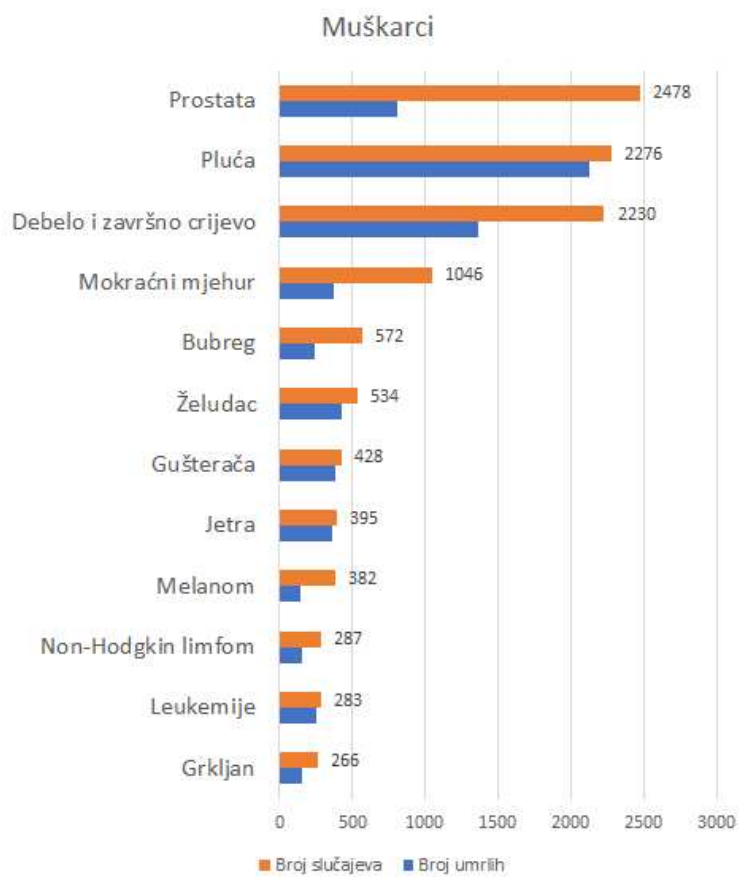
Razvoj raka počinje malignom transformacijom normalne stanice koja uključuje ireverzibilnu promjenu svoje DNK. Genetske promjene koje izazivaju rak uključuju normalne gene uključene u replikaciju stanice i smrt. Četiri vrste gena su tipično pogođene: 1. geni koji kodiraju faktore rasta, receptore faktora rasta, signalne proteine uključene u staničnu diobu, 2. geni koji reguliraju staničnu apoptozu, 3. geni koji pripadaju obitelji tumor supresorskih gena, 4. geni koji kodiraju enzime za popravak DNK (2).

Onkogeni su geni koji potiču razvoj tumorske stanice iz protoonkogenata. Postoje 4 osnovna mehanizma pretvorbe: 1. točkasta mutacija - zamjena jedne baze na lancu DNK rezultira pogrešnim kodiranjem proteina (točkasta mutacija proteina ras prisutna je u čak 30% poznatih karcinoma kao što su karcinom pluća, debelog crijeva i gušterače), 2. amplifikacija gena - povećanje broja kopija gena protoonkogenata, 3. kromosomske preraspodjele - translokacije i delecije dijelova kromosoma mogu dovesti do jukstapozicije gena koji obično nisu u neposrednoj blizini, 4. insercijska mutageneza - oblik onkogeneze gdje dolazi do insercije virusnog gena u DNK sisavca (2).

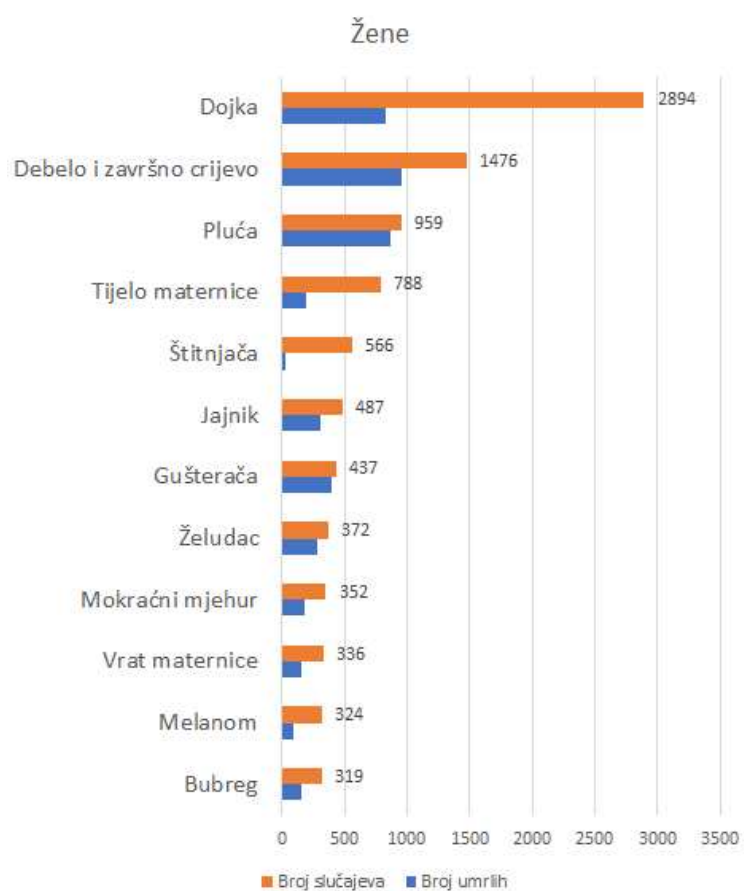
1.1.2 EPIDEMIOLOGIJA RAKA U HRVATSKOJ I EU

Najčešće dijagnosticirana zloćudna bolest u EU je rak dojke (13,3%). Sljedeći je rak debelog i završnog crijeva (12,7%), rak prostate (12,5%) i rak pluća (11,9%). Najčešći uzroci smrti su rak pluća (20,4% svih slučajeva smrti od raka), a slijede rak debelog i završnog crijeva (12,4%), dojke (7,3%) i rak gušterače (7,1%). S obzirom na spol, od raka češće obolijevaju muškarci (54%) nego žene (46%). Također veća je smrtnost kod muškaraca (56%). Kao što je i poznato, češće obolijevaju starije osobe. Procjene za 2020. godinu otkrivaju da se 62% procijenjenih novih dijagnoza i 76% procijenjenih smrti javlja u ljudi starijih od 65 godina (4).

U usporedbi s drugim zemljama (uporabom dobno-standardizirane stope incidencije i mortaliteta), Hrvatska je po ukupnoj incidenciji raka na razini prosjeka EU-27 (15. ukupno; 14. u muškaraca i 19. u žena), dok smo po smrtnosti od raka na 5. mjestu ukupno (iza Slovačke, Poljske, Cipra i Mađarske); na 2. mjestu kod muškaraca i 7. kod žena. Najčešći novodijagnosticirani rak u Hrvatskoj 2020. godine je rak debelog i završnog crijeva (3 706 novih slučajeva), zatim rak pluća (3 235) i rak dojke (2 894). Vodeći zloćudni uzroci smrti su rak pluća (2 984 smrti), rak debelog i završnog crijeva (2 320) i rak dojke (832) (4,5).



Slika 1. Najčešća sijela raka u Hrvatskoj, muškarci, 2020 (20).



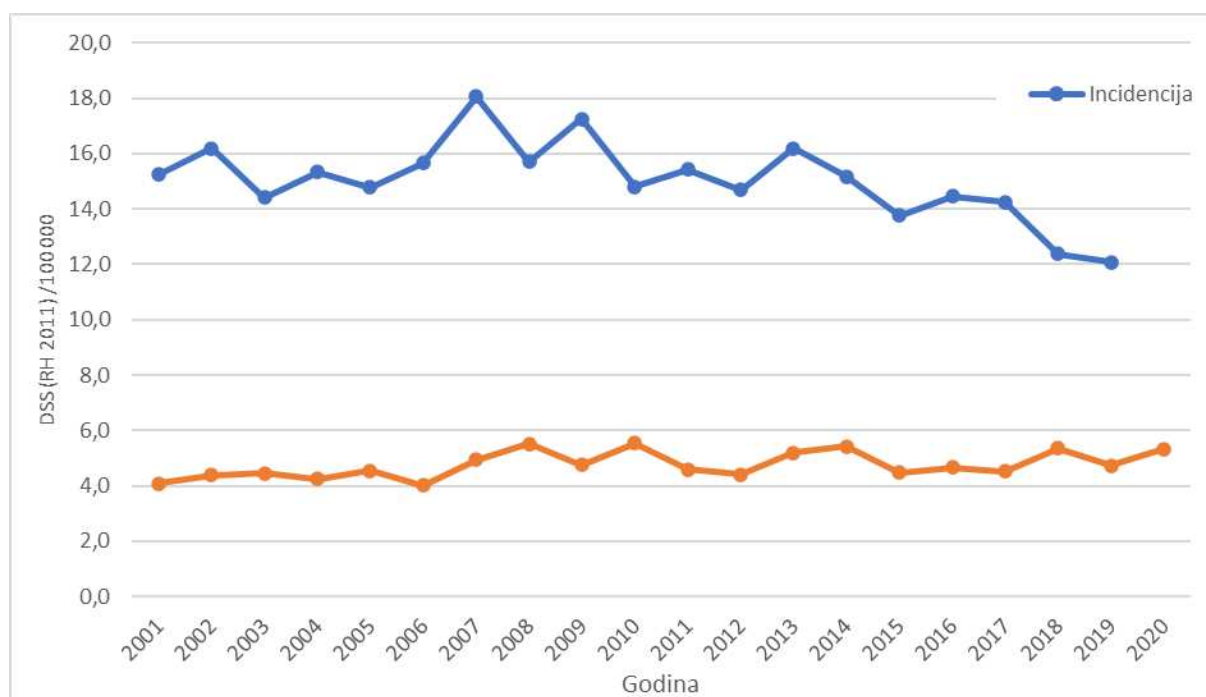
Slika 2. Najčešća sijela raka u Hrvatskoj, žene, 2020 (21).

1.2 KARCINOM GRLIĆA MATERNICE

1.2.1 ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA

Karcinom grlića maternice karcinom je pločastih stanica uzrokovan infekcijom humanim papiloma virusom (HPV). Rani simptomi su obično nespecifični dok se u naprednom stadiju javlja postkoitalno krvarenje. Dijagnoza se postavlja biopsijom te Papanicolaou testom poznatim kao Papa test (6). HPV je najčešća virusna infekcija reproduktivnog trakta. Većina spolno aktivnih žena i muškaraca bit će zaražena u nekom trenutku svog života, a neki se mogu opetovano zaraziti. Više od 90% zaražene populacije na kraju se riješi infekcije (7).

Prema dostupnim podacima u 2020. godini ukupno je bilo oboljelih 604 000 žena, a 342 000 smrtnih slučajeva (7). U Hrvatskoj je u 2019. godini bilo dijagnosticirano 268 oboljelih te 126 umrlih. Za razliku od drugih karcinoma, javlja se nešto ranije, odnosno jedna trećina oboljelih je mlađa od 50 godina, a srednja dob žena prilikom dijagnoze 57 godina. Kao i u ostalim razvijenim zemljama, bilježi se pad incidencije, ali stopa smrtnosti ostaje stabilna.



Slika 3. Trend incidencije i mortaliteta karcinoma grlića maternice u Hrvatskoj, 2001.-2020 (22).

1.2.2 PATOHISTOLOGIJA I KLASIFIKACIJA

Premaligne promjene ili displazija skvamoznih stanica u epitelu grlića maternice zajednički su poznate kao cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN). CIN može napredovati do karcinoma in situ i invazivnog karcinoma ako se ne liječi u ranoj fazi ili ako HPV može deaktivirati stanične funkcije domaćina (8). Osoba kojoj je dijagnosticirana blaga displazija ili CIN 1 (CIN niskog stupnja) može se oporaviti od infekcije uz pomoć imunološkog sustava domaćina (9). Epitelne stanice dobro su organizirane u normalnom tkivu grlića. Međutim, kod CIN-a i karcinoma, stanice zaražene HPV-om postaju displastične. CIN 1, također poznat kao CIN niskog stupnja, označava blagu displaziju gdje donja trećina epitela pokazuje displaziju. Kada je zahvaćeno dvije trećine epitela, to se označava kao CIN 2 ili umjerena displazija. Teška displazija (CIN 3) se ocjenjuje kada je zahvaćeno više od dvije trećine pune debljine epitela. Lezije CIN 2 i CIN 3 zajedno se klasificiraju kao CIN visokog stupnja (10).

1.2.3 KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA

Karcinom grlića maternice uglavnom nema simptoma ili su nespecifični sve do uznapređovalog stadija. Neki od simptoma koji se mogu pojaviti su: promjene u vaginalnom krvarenju ili iscjetku uključujući krvarenje nakon spolnog odnosa, bol u donjem dijelu zdjelice ili trbuha, bol prilikom spolnih odnosa (11).

Dijagnostika se sastoji od pregleda zdjelice. Tijekom ovog postupka, medicinski alat koji se zove spekulum umeće se u vaginalni otvor kako bi se stijenke proširile, omogućujući liječniku ili medicinskoj sestri da pogledaju unutar vagine i grlića maternice radi bilo kakvih abnormalnosti ili znakova karcinoma. Postupak često uključuje Papa test, koji uključuje nježno brisanje površine vagine ili grlića maternice radi prikupljanja stanica. Te se stanice zatim analiziraju u laboratoriju. Osim otkrivanja karcinoma, ovaj test također može otkriti prisutnost HPV-a, koji je povezan s karcinomom grlića maternice (11).

1.2.4 LIJEČENJE

Bolesnicama s karcinomom grlića maternice dostupne su različite vrste liječenja. Neki tretmani su standardni (liječenje koje se trenutno koristi), a neki se testiraju u kliničkim ispitivanjima. Trenutno postoji 5 načina pristupa liječenja karcinoma grlića maternice. Ukoliko se radi o in situ karcinomu, karcinom se tretira konizacijom, histerektomijom i zračenjem. Konizacija je postupak kod kojeg se uklanja konusni dio tkiva. Histerektomija je operacija uklanjanja maternice, uključujući i cerviks. Ukoliko se radi o IA stadiju mogu se vršiti navedeni postupci s dodanom modificiranom histerektomijom kojom se uklanjaju i limfni čvorovi. Pacijenti sa stadijima IA2 do IB, koji žele sačuvati plodnost mogu biti kandidati za radikalnu trahelektomiju. U ovom postupku uklanjaju se cerviks i lateralna parametralna tkiva, a tijelo maternice i jajnici se zadržavaju. Kriteriji za odabir ove vrste liječenja su: želja za budućom trudnoćom, dob manja od 40 godina, stadij bolesti od IA2 do IB1 te lezija do 2 cm, preoperativna magnetska rezonancija koja prikazuje rub od najdistalnijeg ruba tumora do donjeg segmenta maternice, skvamozni, adenoskvamozni ili adenokarcinomski tipovi stanica.

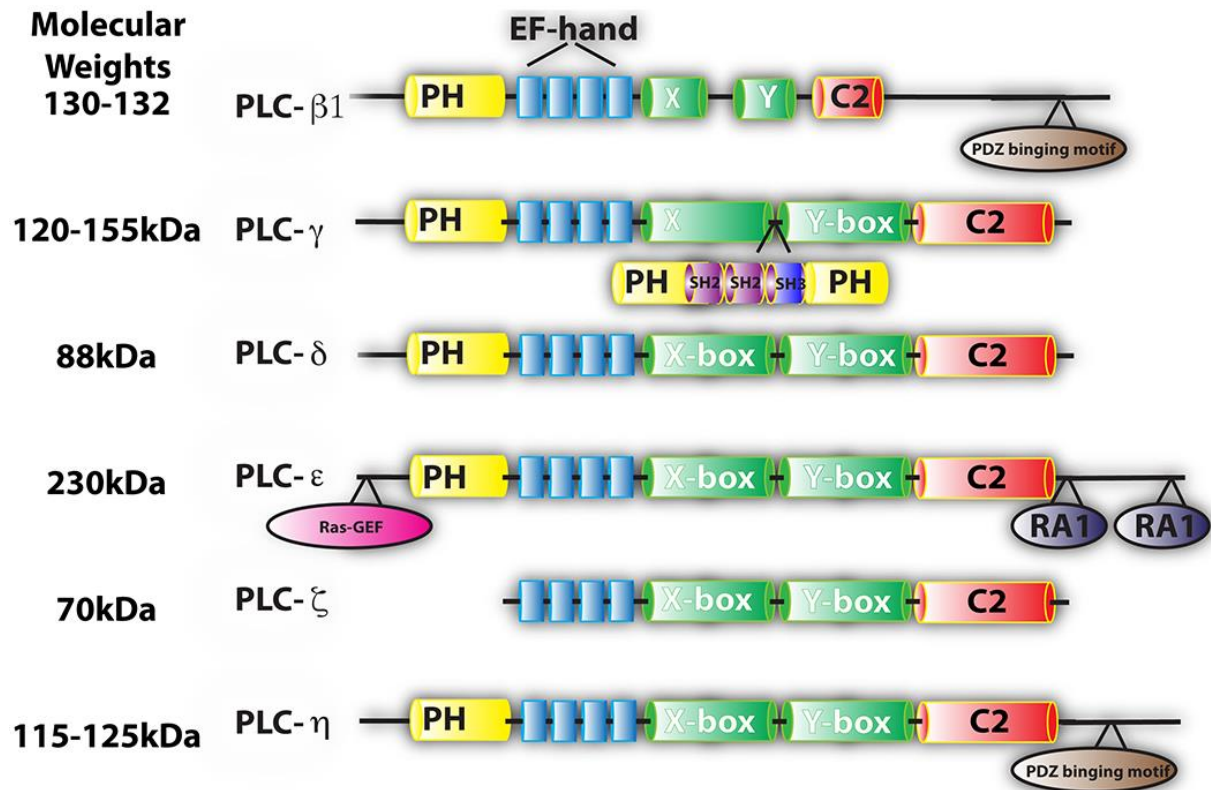
Intrakavitarna terapija zračenjem je opcija liječenja kada je palijativno liječenje prikladno zbog drugih medicinskih stanja i za žene koje nisu kandidati za operaciju. Ako je dubina invazije manja od 3 mm i nije zabilježena invazija kapilarnog limfnog prostora, a učestalost zahvaćenosti limfnih čvorova je dovoljno niska, terapija vanjskim snopom zračenja nije potrebna (12).

1.3. FOSFOLIPAZA C

1.3.1. FOSFOLIPAZA C

Fosfolipaza C (PLC) je bitan enzim u unutarstaničnim kaskadama prijenosa signala. PLC hidrolizira fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (PIP₂), generirajući sekundarne pretvarače signala uključujući inozitol 1,4,5-trifosfat (IP₃) i diacilglicerol (DAG). IP₃ povećava unutarstaničnu razinu kalcija vezanjem na IP₃ receptore u endoplazmatskom retikulumu, a DAG aktivira signalne kaskade povezane s protein kinazom C (PKC). U cijelom tijelu PLC je povezan s ključnim staničnim procesima kao što su proliferacija, diferencijacija, migracija i preživljavanje. Postoji ukupno 13 izoenzima PLC-a sisavaca, uključujući β (1-4), γ (1, 2), δ (1, 3, 4), ε, ζ i η (1, 2), koji su klasificirani prema njihovoj različitoj strukturi domene i

biokemijskim svojstvima. Svaki PLC izoenzim različito se izražava među tkivima i regulira složene stanične funkcije na način ovisan o tkivu (13).



Slika 4. Strukture 6 različitih članova obitelji fosfolipaze C (PLC) (14).

1.3.2. CITOTOKSIČNOST INHIBITORA PLC

Spojevi iz obitelji tienopiridina, sintetizirani kao mogući inhibitori PLC pomoću virtualnog probira visoke propusnosti (vHTS), pokazali su citotoksično djelovanje na stanicama raka prostate i linijama stanica trostruko negativnog karcinoma dojke (15,16). Neki od spojeva iz ove obitelji koristit će se i u ovom diplomskom radu kako bi se pokazala njihova citotoksičnost na stanicama karcinoma grlića maternice.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja odrediti je moguće citotoksično djelovanje novosintetiziranih derivata tienopiridina na stanične linije humanog karcinoma grlića maternice mjereno MTT metodom. Hipoteza o potencijalnom citotoksičnom djelovanju ispitivana je na staničnim linijama karcinoma grlića maternice (SiHa i HeLa).

2.1. HIPOTEZA

Novosintetizirani tienopiridinski derivati imaju citotoksično djelovanje na stanične linije karcinoma grlića maternice SiHa i HeLa.

3. MATERIJALI I METODE

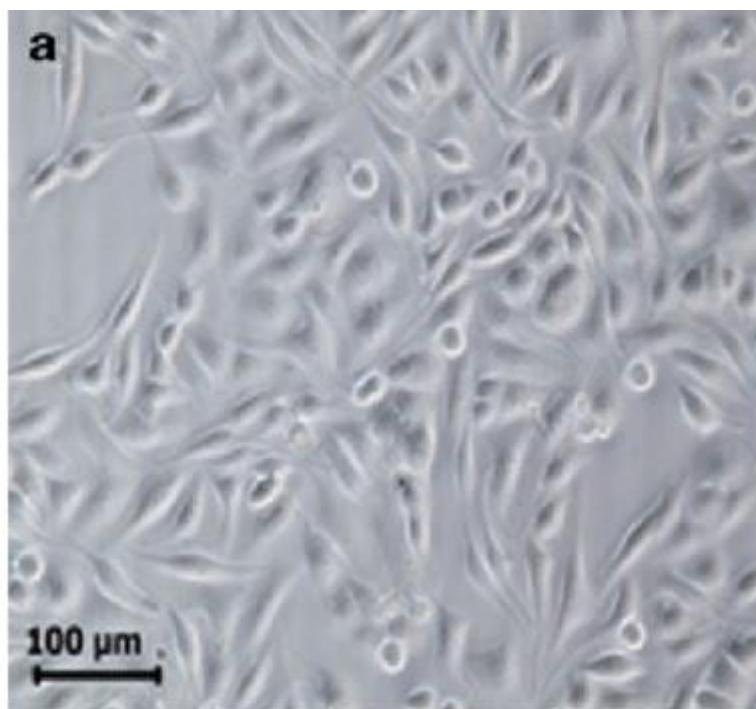
3.1. STANIČNE LINIJE

Mjerenje citotoksične aktivnosti tienopiridinskih derivata provodilo se *in vitro* na humanim staničnim linijama karcinoma grlića maternice (SiHa i HeLa). Karakteristike navedenih linija navedene su u tablicama 1 i 2.

3.1.1. SiHa

Tablica 1. Karakteristike stanične linije karcinoma grlića maternice SiHa (23).

Organizam:	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo:	Maternica, cerviks
Morfologija:	Epitelna
Bolest:	Karcinom pločastih stanica
Uvjeti čuvanja:	Parna faza tekućeg dušika
Tip rasta:	Adherentan
Dob:	55 godina
Spol:	Ženski
Etnicitet:	Azijatkinja

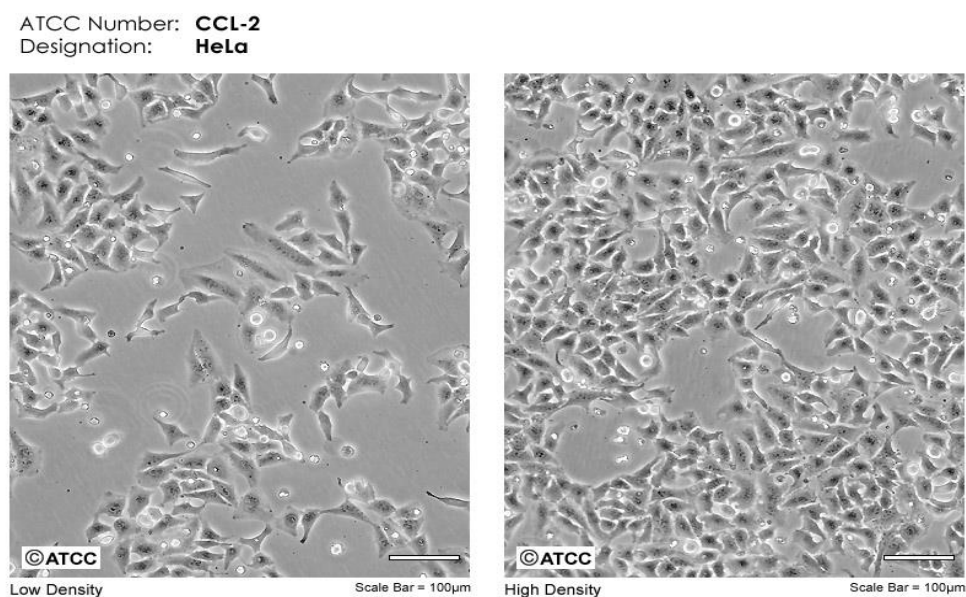


Slika 5. Morfologija SiHa stanica (24).

3.1.2. HeLa

Tablica 2. Karakteristike stanične linije karcinoma grlića maternice HeLa (25).

Organizam:	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo:	Maternica, cerviks
Morfologija:	Epitelna
Bolest:	Adenokarcinom
Uvjeti čuvanja:	Parna faza tekućeg dušika
Tip rasta:	Adherentan
Dob:	31
Spol:	Ženski
Etnicitet:	Crnkinja



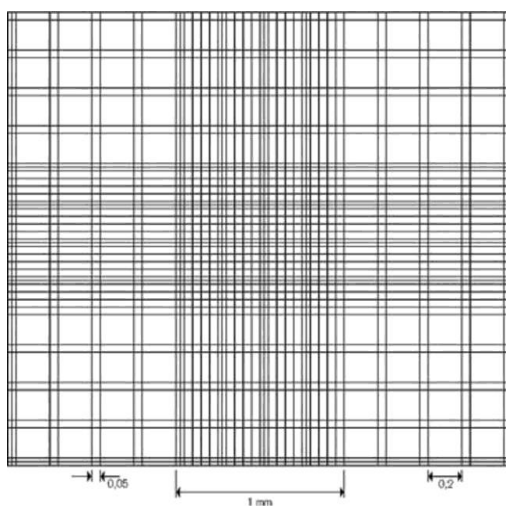
Slika 6. Morfologija HeLa stanica (26).

3.2. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI (MTT METODA)

Stanice na kojima se vrši testiranje kupljene su od tvrtke ATCC. Da bi se ispitivanje moglo provesti, treba odraditi pripremu stanica na način na koji tvrtka preporučuje. Rast stanica se odvija u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂ na 37°C, u Dulbeccovom modificiranom Eagleovom mediju (DMEM Euroclone, Milano, Italija) koji sadrži 4,5 g/L glukoze, 10% fetalnog goveđeg

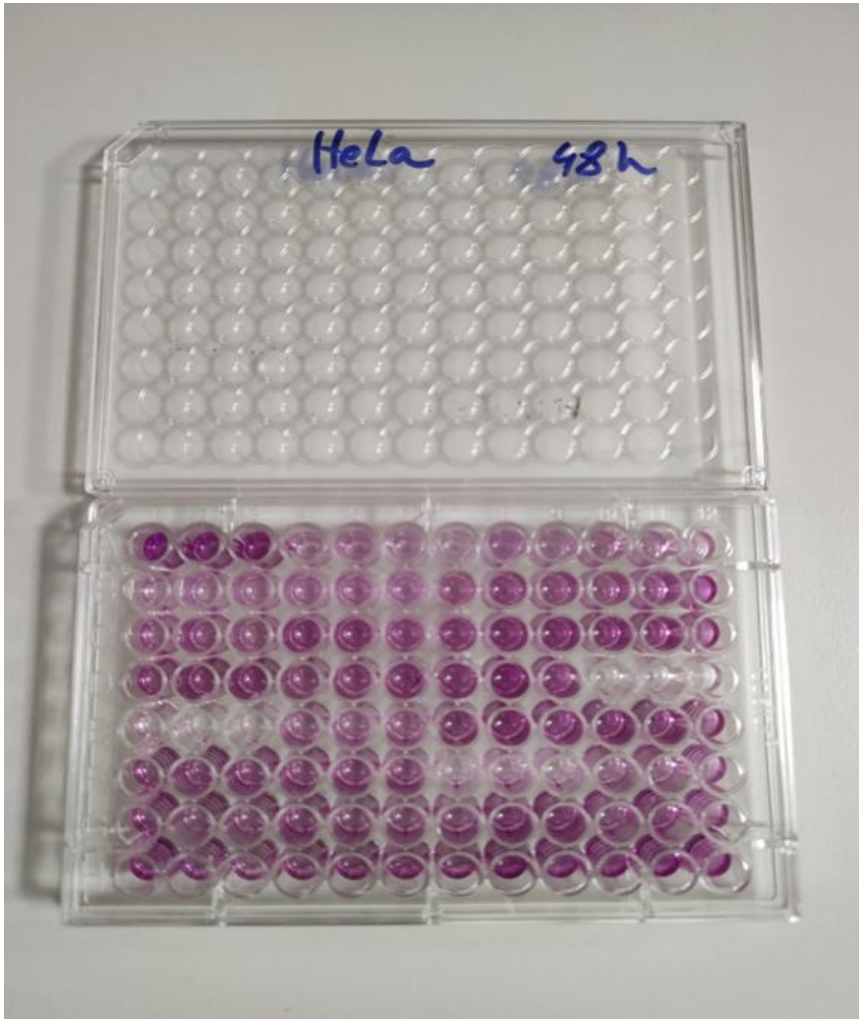
seruma (FBS) i 1% antibiotika (Penicilin Streptomycin, EuroClone, Milano, Italija). Stanice preko noći adheriraju na površinu podloge. Odvajanje od podloge postiže se ispiranjem puferiranom otopinom fosfatnih soli (PBS, engl. *phosphate buffer saline*) te dodatkom tripsina, proteolitičkog enzima koji ih odvaja od podloge i omogućuje presadnju na novu podlogu.

Nakon toga se stanice broje Bürk-Türk ovom komoricom. 10 μ l stanica se pomiješa s 90 μ l Trypan Blue boje. Bojanje ovom bojom omogućuje razlikovanje mrtvih stanica koje će se obojati tamno plavo i živih stanica koje se neće obojati zbog očuvanosti njihove stanične membrane. U komoricu se prenese pripremljena suspenzija te se stanice broje pod mikroskopom. Formula za konačan zbroj je $N \times 10 \times 10^4$ stanica/ml (N = broj živih stanica u kvadratiću, 10 = faktor razrjeđenja, 10^4 = volumen komorice). Važnost brojanja stanica je u tome da se jednaki broj stanica prenese u svih 96 jažica u tri replikata te ostavi preko noći kako bi se vezale za podlogu.



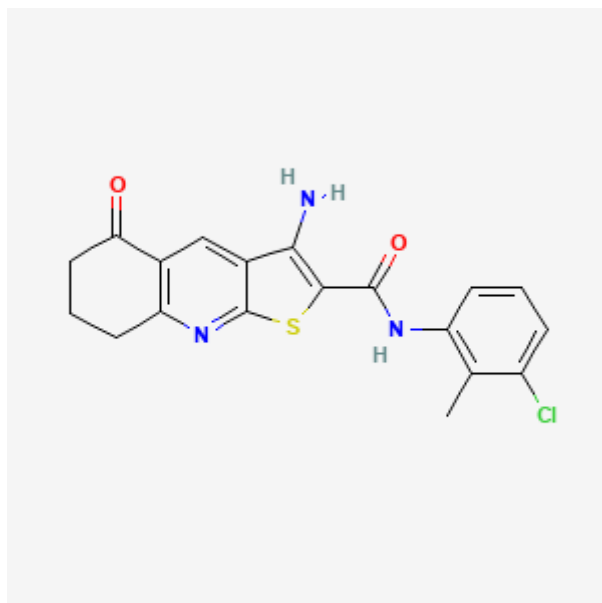
Slika 7. Bürk-Türkova komorica (27).

Stanice su tretirane spojevima tieno[2,3-b]piridina (inhibitori 5, 6, 8 i 9) u koncentraciji od 0,05, 0,2, 0,5, 1, 2,5, 5 i 10 μ mol/L u mediju (u triplikatu) te su ostavljene u inkubatoru na 4, 24, 48 i 72 h. Zatim je provedeno ispitivanje citotoksičnosti pomoću MTT-a [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid] na način da su nakon tretmana spojevima stanice inkubirane s 0,5 g MTT/L na 37°C 2 sata. Nakon toga je medij uklonjen i dodan dimetilsulfoksid (DMSO) te inkubiran još 10 minuta na 37°C uz treskanje. Stupanj stvaranja formazana, pokazatelja živih i metabolički aktivnih stanica, mjeren je fotometrijski na 570 nm pomoću spektrofotometra (HiPo MPP-96, Biosan, Riga, Latvija). Podaci su izračunati u odnosu na netretiranu kontrolu (100% medij) iz tri neovisna mjerenja.

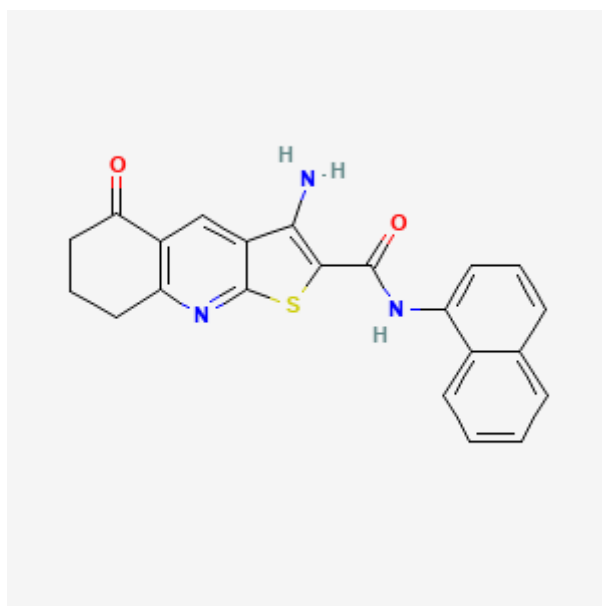


Slika 8. Obojenje HeLa stanica dodavanjem DMSO-a nakon 48 h izlaganja

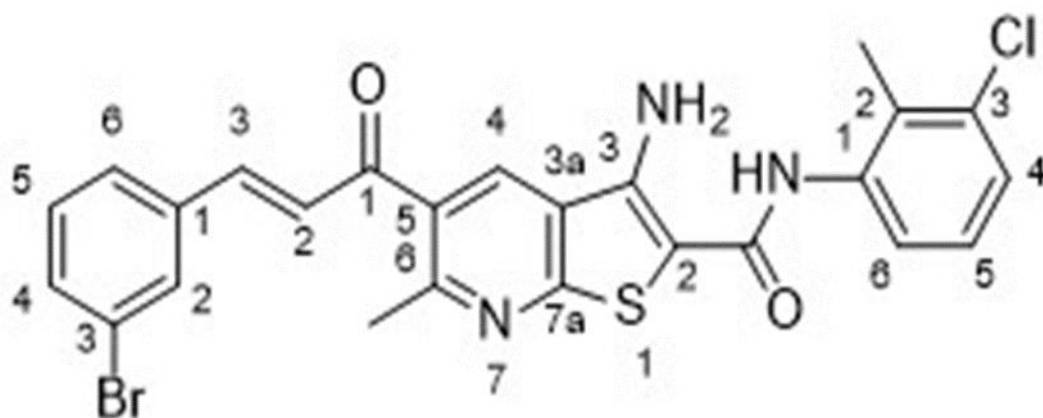
Upotrebljeni su sljedeći derivati tienopiridina nazvani inhibitor 5, 6, 8 i 9.



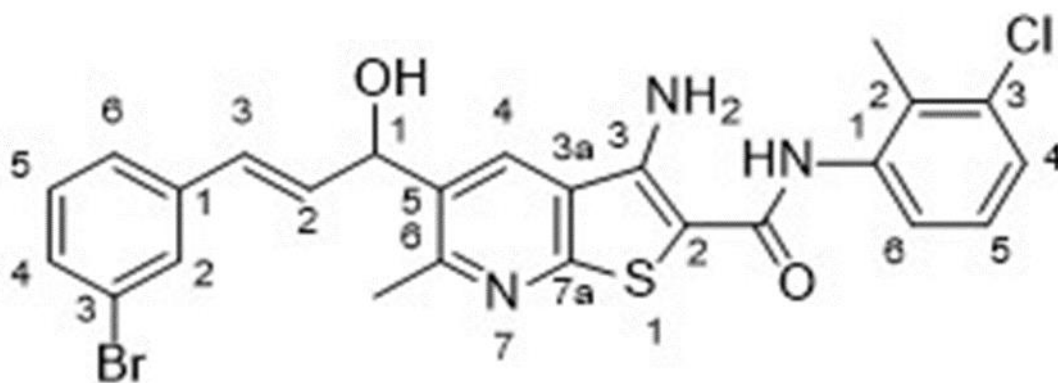
Slika 9. Inhibitor 5 (3-amino-N-(3-chloro-2-methylphenyl)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-b]quinoline-2-carboxamide) (28).



Slika 10. Inhibitor 6 (3-amino-N-(naphthalen-1-yl)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-b]quinoline-2-carboxamide) (29).



Slika 11. Inhibitor 8 ((E)-3-amino-5-(3-(3-bromophenyl)acryloyl)-N-(3-chloro-2-methylphenyl)-6-methylthieno[2,3-b]pyridine-2-carboxamide)

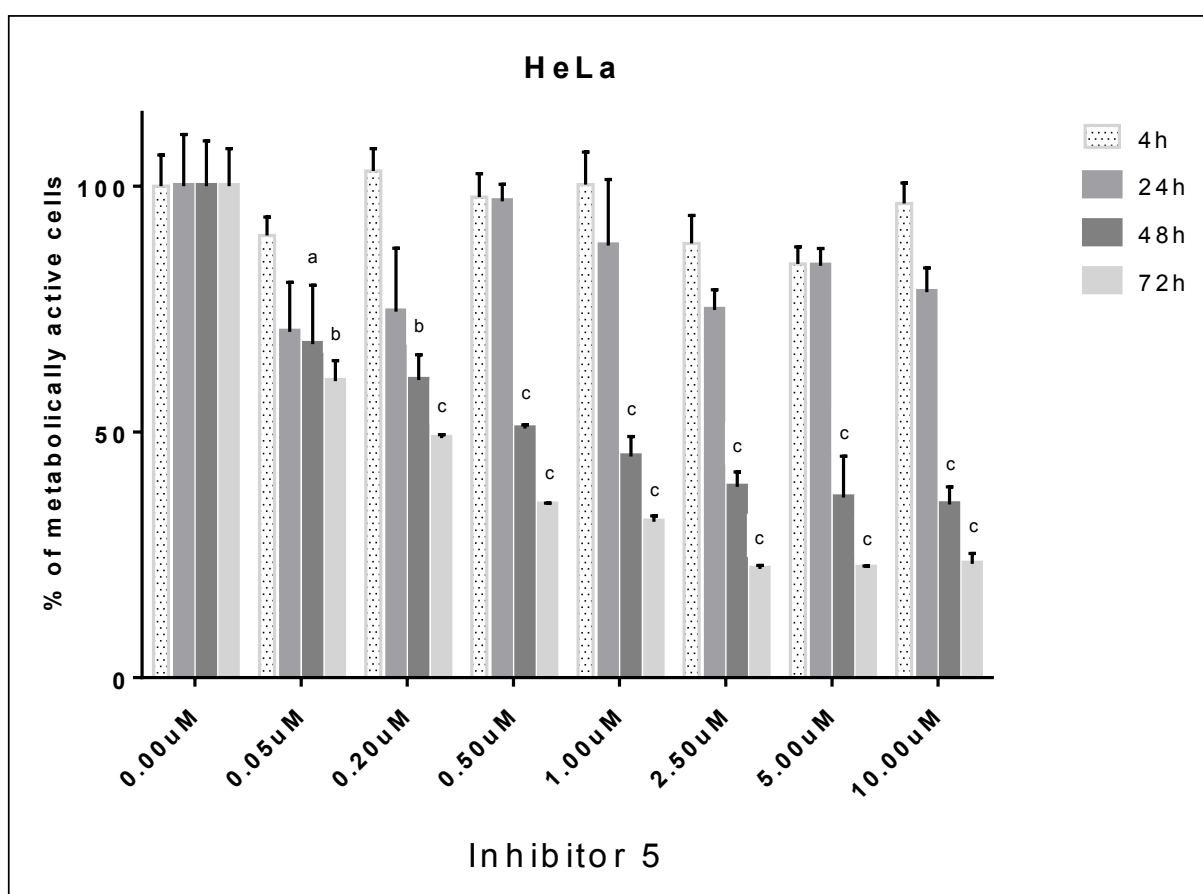


Slika 12. Inhibitor 9 ((E)-3-amino-5-(3-(3-bromophenyl)-1-hydroxyallyl)-N-(3-chloro-2-methylphenyl)-6-methylthieno[2,3-b]pyridine-2-carboxamide)

4.REZULTATI

Pomoću MTT testa određena je aktivnost HeLa i SiHa stanica nakon što su dodani inhibitori 5, 6, 8 i 9 u usporedbi s kontrolnim stanicama gdje je dodan samo medij. U sljedećim tablicama su prikazane aktivnosti nakon 4, 24, 48 i 72 h pri koncentracijama od 0,05, 0,2, 0,5, 1, 2,5, 5 i 10 $\mu\text{mol/L}$.

4.1. HeLa STANICE

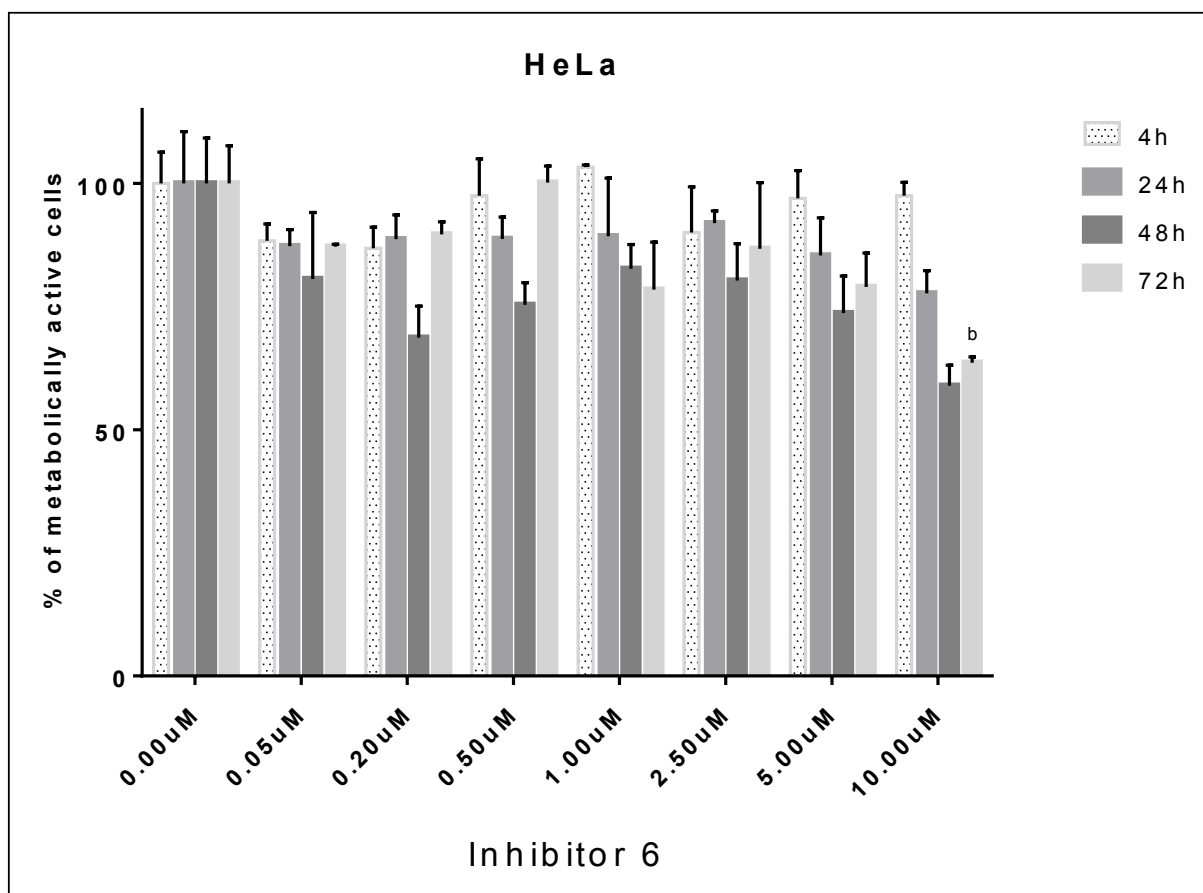


	4h	24h	48h	72h
IC50 (uM)	ND	ND	0,8241	0,2449

Slika 13. Citotoksična aktivnost inhibitora 5 na HeLa staničnoj liniji (IC50=konzentracija derivata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika: a-P <0,05, b- P <0,01, c- P <0,001).

Tretiranje HeLa stanica inhibitorom 5 pokazalo je značajne rezultate nakon 48 i 72 h inkubacije. Pri 4 h rezultat je vidljiv samo pri koncentraciji od 5 $\mu\text{mol/L}$ gdje je aktivnost stanica smanjena na oko 80%. Stanicama tretiranima inhibitorom 5 u koncentraciji od 0,05 $\mu\text{mol/L}$

smanjena je aktivnost na 70 do 60%, proporcionalno povećanju trajanja izlaganja. Pri tretmanu inhibitorom 5 u koncentraciji od 0,2 $\mu\text{mol/L}$, aktivnost se smanjuje na čak ispod 50%, kada se stanice izlažu 72 h. Izlaganje stanica 4 h inhibitoru 5 u koncentraciji od 0,5 $\mu\text{mol/L}$ ne uzrokuje značajan pad aktivnosti, ali nakon 48 h ta brojka pada na 50% te do čak 40% nakon inkubacije od 72 h. Sličan trend pada aktivnosti ponavlja se pri koncentracijama 1, 2,5, 5 i 10 $\mu\text{mol/L}$. Najniža aktivnost je uočena pri koncentracijama 2,5 i 5 $\mu\text{mol/L}$ nakon 72 h izlaganja kada iznosi oko 25%. IC50 pri 4 i 24 h nije moguće odrediti dok je pri 48 h 0,8241, a pri 72 h 0,2449 $\mu\text{mol/L}$ (slika 11).



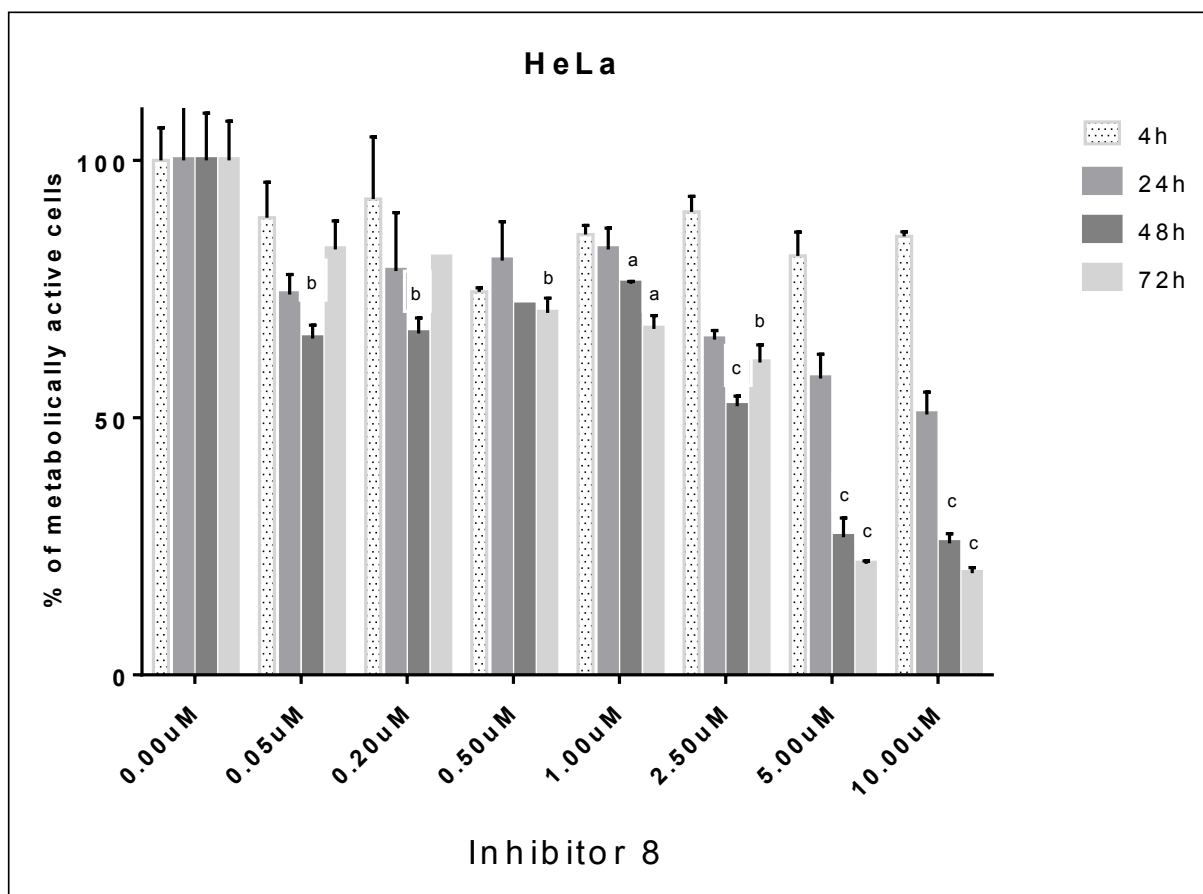
	4h	24h	48h	72h
IC50 (uM)	ND	ND	ND	ND

Slika 14. Citotoksična aktivnost inhibitora 6 na HeLa staničnoj liniji

(IC50=konzentracija derivata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika: a- $P < 0,05$, b- $P < 0,01$, c- $P < 0,001$).

Značajno smanjenje aktivnosti uočeno je pri koncentraciji 0,2, 0,5 i 10 $\mu\text{mol/L}$ kada su stanice izložene 48 h. Smanjenje je na oko 75 do 80%. Primjetan je trend pada aktivnosti koji

doseže vrhunac nakon 48 h izlaganja dok se nakon 72 h aktivnost ne smanjuje nego ponovo raste. IC50 nije moguće odrediti ni za jedno vrijeme inkubacije (slika 14).

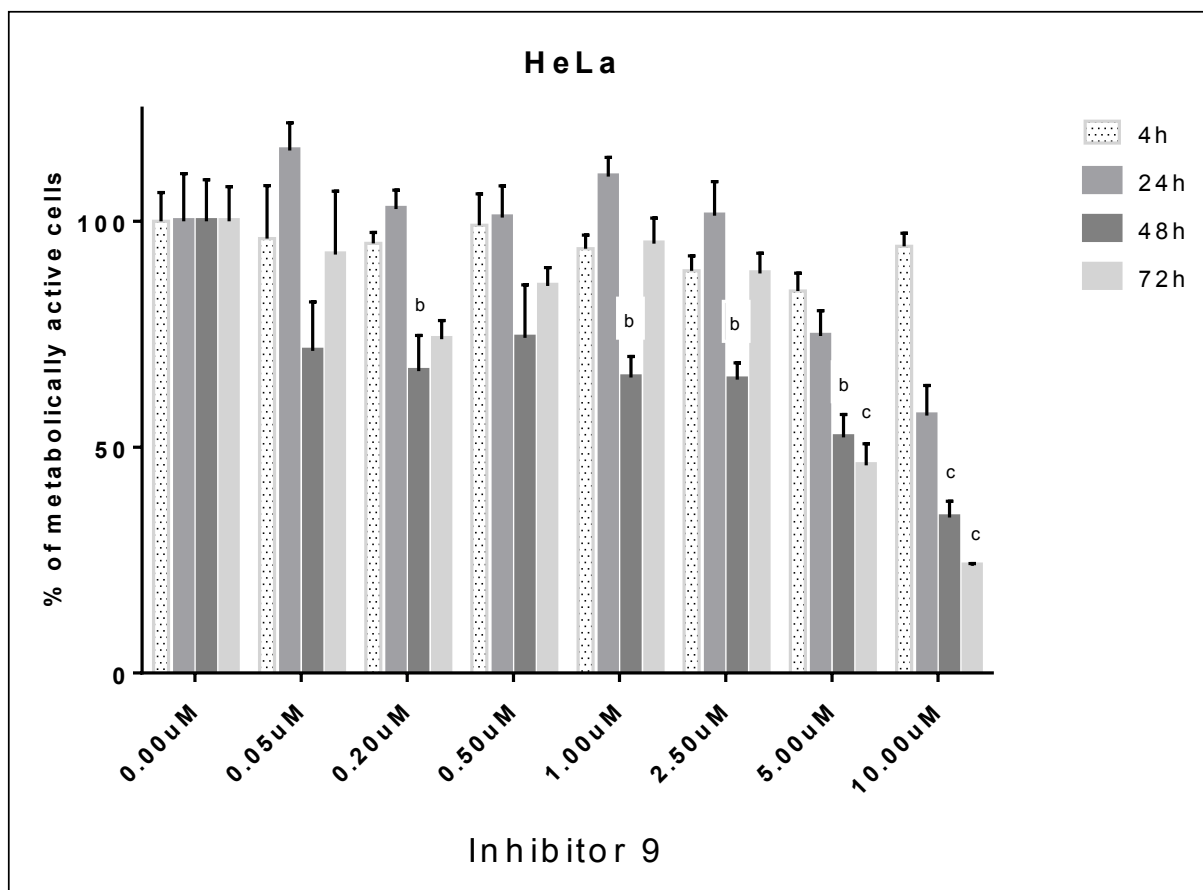


	4h	24h	48h	72h
IC50 (uM)	ND	6,296	2,138	2,115

Slika 15. Citotoksično djelovanje inhibitora 8 na HeLa staničnoj liniji

(IC50=konzentracija derivata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika: a- $P < 0,05$, b- $P < 0,01$, c- $P < 0,001$).

Značajno smanjenje aktivnosti uočeno je već pri 0,05, 0,2, 0,5 te 1 $\mu\text{mol/L}$ te je ono oko 70% nakon 48 h izlaganja. Pri koncentraciji 2,5 $\mu\text{mol/L}$, aktivnost značajno pada već nakon 24 h te je najniža nakon 48 h inkubacije kada iznosi 50-ak %. Pri koncentracijama 5 i 10 $\mu\text{mol/L}$ vidljiv je sličan pad. Aktivnost stanica nakon 24 h pada na pola početne, a nakon 48 h ona iznosi oko 25%. Konačno, nakon 72h aktivnost stanica pada još značajnije na oko 20%. IC50 pri 4 h nije moguće odrediti, nakon 24 h on je 6,296, zatim nakon 48 h je 2,1368 te 72 h 2,115 $\mu\text{mol/L}$ (slika 15).



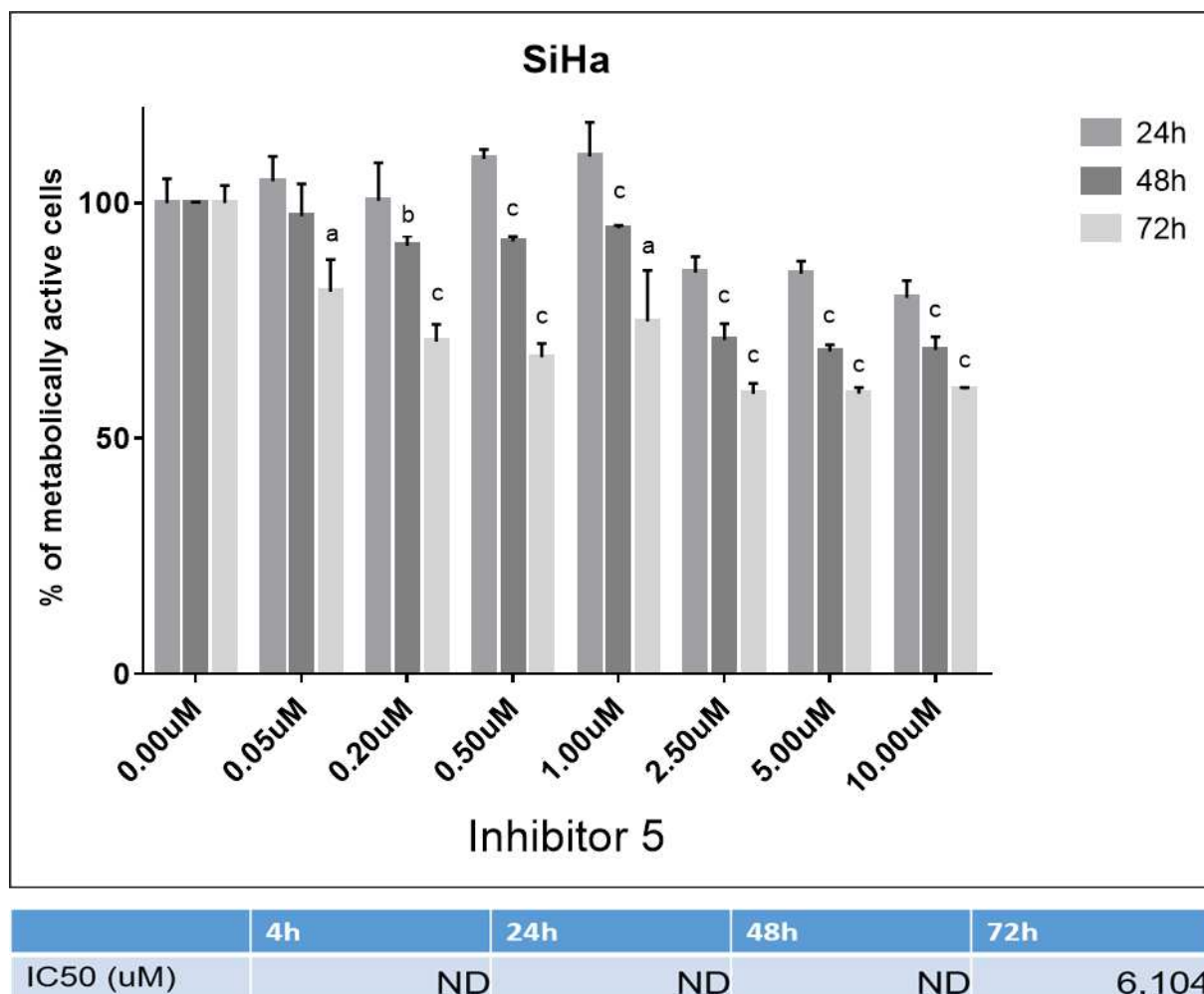
	4h	24h	48h	72h	
IC50 (uM)		ND	ND	3,621	5,105

Slika 16. Citotoksično aktivnost inhibitora 9 na HeLa staničnoj liniji

(IC50=konzentracija derivata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika: a- $P < 0,05$, b- $P < 0,01$, c- $P < 0,001$).

Uočena je značajna citotoksičnost inhibitora 9 već pri najmanjoj koncentraciji. Nakon 48 h izlaganja inhibitoru, smanjenje aktivnosti stanica je na 75%. Pri koncentraciji 0,2 i 0,5 $\mu\text{mol/L}$ to se također ponavlja s tim da nakon 72 h izlaganja postoji smanjenje aktivnosti, ali ono je nešto manje nego nakon 48 h. Pri koncentraciji 1 i 2,5 $\mu\text{mol/L}$ smanjenje aktivnosti je značajno samo nakon 48 h te je ona na oko 75%. Kad je riječ o koncentraciji 5 $\mu\text{mol/L}$, značajno smanjenje je uočeno već nakon 4 h te je ono na oko 80%. Produljenjem vremena inkubacije smanjuje se i aktivnost te je ona nakon 72 h na samo 50%. Najveće smanjenje aktivnosti stanica je pri 10 $\mu\text{mol/L}$. Nakon 24 h ono je nešto veće od 50%, nakon 48 h je oko 40% te nakon 72 h oko 25%. IC50 za 4 i 24 h nije moguće odrediti, za 48 h iznosi 3,621, a za 72 h 5,105 $\mu\text{mol/L}$ (slika 16).

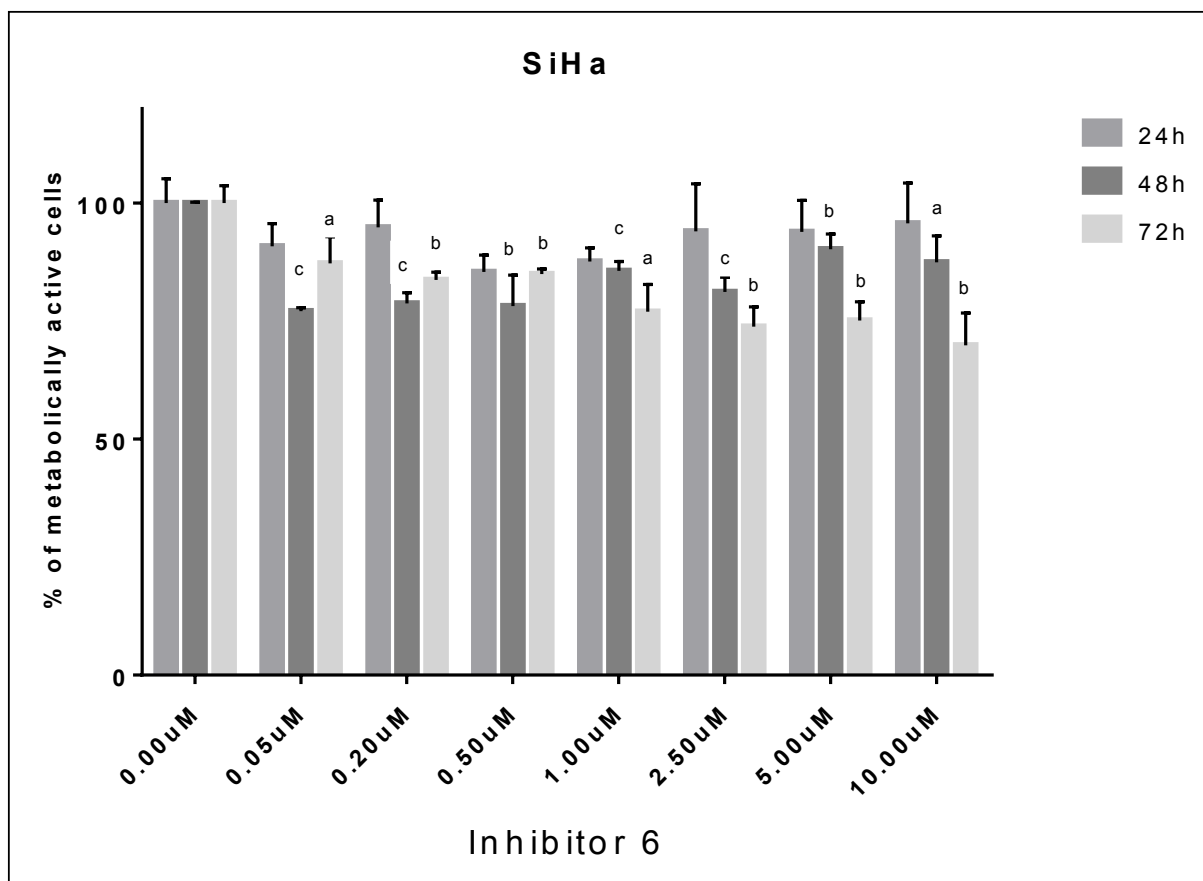
4.2. SiHa STANICE



Slika 17. Citotoksična aktivnost inhibitora 5 na SiHa staničnoj liniji

(IC50=konzentracija derivata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika: a- $P < 0,05$, b- $P < 0,01$, c- $P < 0,001$).

Značajno smanjenje aktivnosti stanica pri koncentracijama 0,05, 0,2, 0,5 i 1 $\mu\text{mol/L}$ se pojavljuje nakon 72 h izlaganja inhibitoru 5 na oko 70%. Pri koncentracija 2,5, 5 i 10 $\mu\text{mol/L}$ smanjenje aktivnosti s vremenom inkubacije se ponavlja. Nakon 24 h izlaganja ovom inhibitoru ona je na 80%, nakon 48 h je na 70%, a nakon 72 h je najniža i iznosi oko 60%. IC50 za 4, 24 i 48 h nije moguće odrediti. Nakon 72 h izlaganja je 6,104 $\mu\text{mol/L}$ (slika 17).

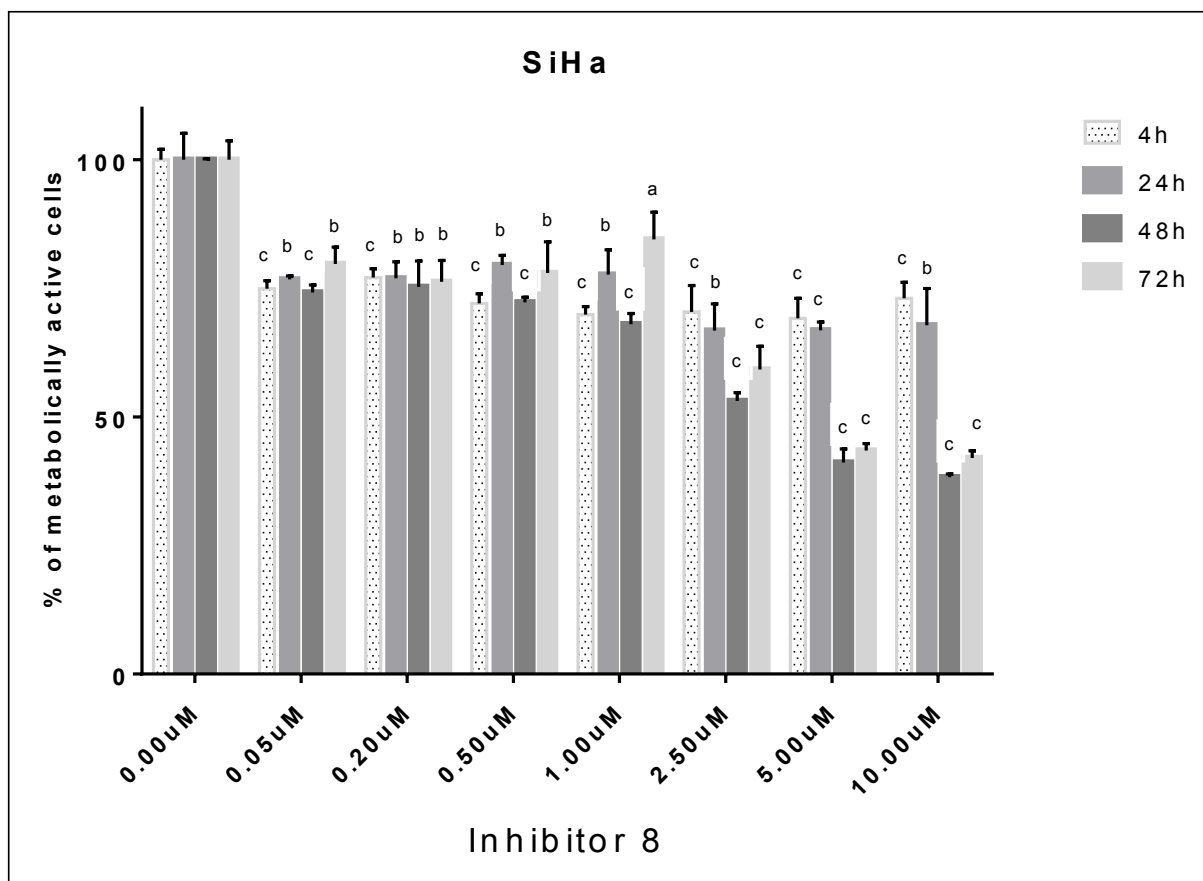


	4h	24h	48h	72h
IC50 (uM)		ND	ND	ND

Slika 18. Citotoksična aktivnost inhibitora 6 na SiHa staničnoj liniji

(IC50=konzentracija derivata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika: a- $P < 0,05$, b- $P < 0,01$, c- $P < 0,001$).

Kod svih koncentracija aktivnost stanica izloženih ovim inhibitorom nije smanjena na ispod 75%. Najveće smanjenje aktivnosti je kod najveće koncentracije 10 $\mu\text{mol/L}$ nakon 72 h izlaganja. Shodno tome, IC50 za sva vremena nije moguće odrediti (slika 18).

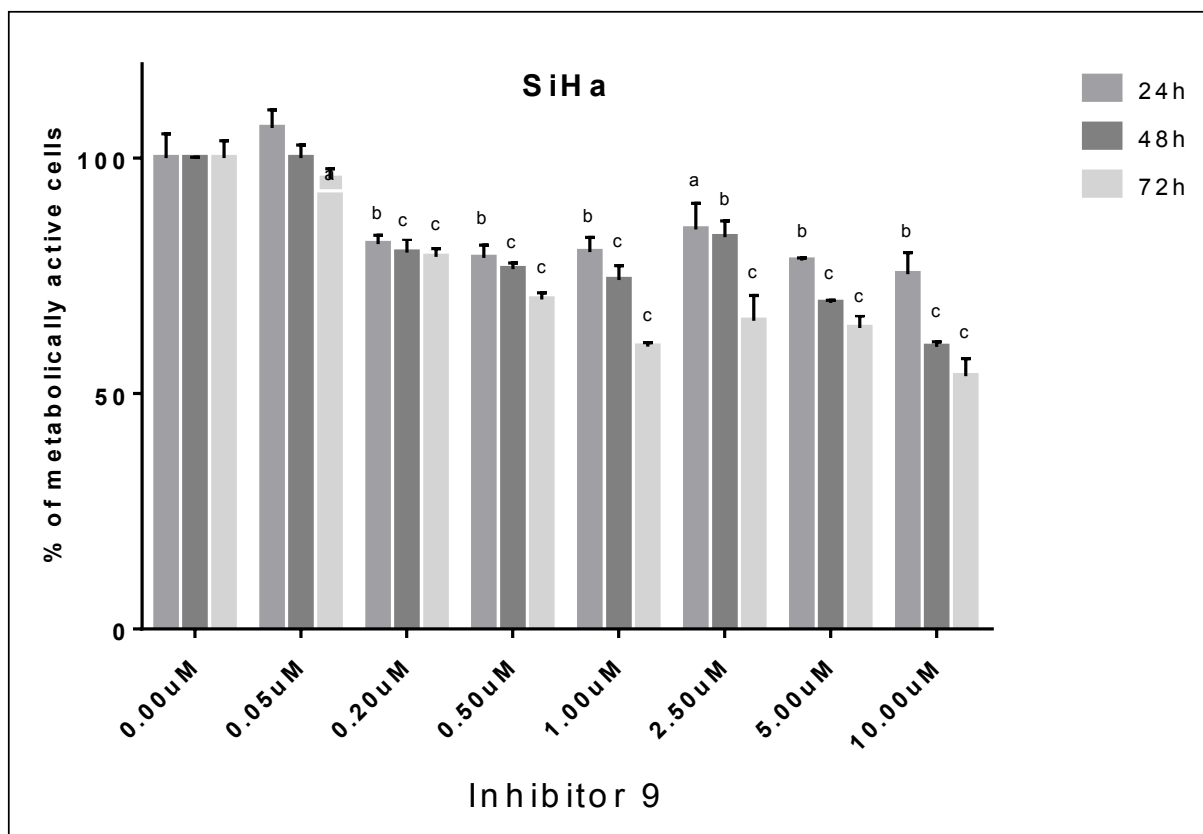


	4h	24h	48h	72h	
IC50 (μM)		ND	ND	2,769	4,122

Slika 19. Citotoksična aktivnost inhibitora 8 na SiHa staničnoj liniji

(IC50=konzracija derivata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika: a- $P < 0,05$, b- $P < 0,01$, c- $P < 0,001$).

Kod koncentracije inhibitora 8 0,05 i 0,2 $\mu\text{mol/L}$ smanjenje aktivnosti stanica nakon svakog od vremena izlaganja je slično te ono iznosi oko 75% početne. Pri koncentraciji 0,5 i 1 $\mu\text{mol/L}$ značajno smanjenje aktivnosti je prisutno nakon 4 i 48 h izlaganja te aktivnost iznosi oko 70%. Nakon 48 h inkubacije pri koncentraciji inhibitora 2,5 $\mu\text{mol/L}$ aktivnost stanica iznosi samo 50-ak% početne dok je nakon ostalih vremena izlaganja također snižena 30 do 40%. Kod koncentracija 5 i 20 $\mu\text{mol/L}$ postoji izraženo smanjenje aktivnosti nakon 48 i 72 h izlaganja ovom inhibitoru. Tada je ono oko 40% početne aktivnosti. Nakon 4 i 24 h izlaganja ono je isto tako sniženo, ali nešto manje, na oko 80%. IC50 za 4 i 24 h nije moguće odrediti, a za 48 h ono iznosi 2,769 te za 72h 4,122 $\mu\text{mol/L}$ (slika 19).



	4h	24h	48h	72h
IC50 (uM)	ND	ND	ND	5,88

Slika 20. Citotoksična aktivnost inhibitora 9 na SiHa staničnoj liniji

(IC50=konzentracija derivata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika: a- $P < 0,05$, b- $P < 0,01$, c- $P < 0,001$).

Smanjenje aktivnosti nakon izlaganja inhibitoru 9 nije zabilježeno kod koncentracije 0,05 $\mu\text{mol/L}$, čak se pojavljuje blagi porast nakon 24 h. Pri koncentraciji 0,2 $\mu\text{mol/L}$ bilježi se pad aktivnosti na 80-ak%o nakon 24, 48 i 72 h izlaganja. Slično smanjenje uočeno je i pri koncentraciji 0,5 $\mu\text{mol/L}$, s naglaskom da je nakon 72 h aktivnost nešto više smanjena. Kod koncentracije 1 $\mu\text{mol/L}$, aktivnost je najznačajnije smanjena nakon 72 h izlaganja ovom inhibitoru na 60%. Pri koncentraciji 5 $\mu\text{mol/L}$ pad aktivnosti je nešto blaži dok je pri koncentraciji 10 $\mu\text{mol/L}$ nakon 48 i 72 h pad najizraženiji te je on na oko 50% početne aktivnosti. IC50 za 4,24 i 48 h nije moguće odrediti, a za 72 h ona iznosi 5,88 $\mu\text{mol/L}$ (slika 20).

5. RASPRAVA

Tumor je naziv za abnormalnu nakupinu tkiva. Ona može biti maligna, zloćudna ili kancerogena, odnosno benigna, dobroćudna ili nekancerogena. Samo maligni tumori napadaju okolna tkiva i metastaziraju (18). Rak, neoplazma ili novotvorina je općeniti pojam za mnoge bolesti kod kojih se abnormalne stanice dijele bez kontrole te su u stanju napasti zdravo tkivo. Rak je uobičajeni narodni naziv za sve zloćudne tumore. Današnje spoznaje ukazuju da ne postoji jedinstvena bolest, nego veliki broja različitih bolesti pa razlikujemo više od 100 različitih vrsta rakova (19).

Karcinom grlića maternice četvrti je najčešći rak kod žena u svijetu i uzrokuje više od 300 000 smrtnih slučajeva u svijetu. Uzročnik karcinoma grlića maternice je perzistentna infekcija visokorizičnim podtipovima humanog papiloma virusa. Karcinom grlića maternice je bolest koja se uvelike može spriječiti, a rano otkrivanje povezano je sa značajno poboljšanim stopama preživljavanja. Doista, u zemljama s visokim dohotkom s uspostavljenim programima cijepljenja i probira to je rijetka bolest (17).

U ovom istraživanju korištena su 4 novo-sintetizirana tienopiridinska derivata: 3-amino-N-(3-chloro-2-methylphenyl)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-b]quinoline-2-carboxamide nazvan inhibitor 5, 3-amino-N-(naphthalen-1-yl)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-b]quinoline-2-carboxamide nazvan inhibitor 6, ((E)-3-amino-5-(3-(3-bromophenyl)acryloyl)-N-(3-chloro-2-methylphenyl)-6-methylthieno[2,3-b]pyridine-2-carboxamide nazvan inhibitor 8 te (E)-3-amino-5-(3-(3-bromophenyl)-1-hydroxyallyl)-N-(3-chloro-2-methylphenyl)-6-methylthieno[2,3-b]pyridine-2-carboxamide nazvan inhibitor 9. Ispitivana je njihovo moguće citotoksično djelovanje na HeLa i SiHa stanične linije MTT metodom. Stanice su izlagane različitim koncentracijama inhibitora (0,05, 0,2, 0,5, 1, 2,5, 5 i 10 $\mu\text{mol/L}$) tijekom 4, 24, 48 i 72 h inkubacije.

Na obje stanične linije uočena je značajna citotoksična aktivnost. Svi inhibitori, s iznimkom inhibitora 6, pokazali su značajan utjecaj na smanjenje aktivnosti. Ovisno o staničnoj liniji razlikovao se najučinkovitiji inhibitor. Za HeLa staničnu liniju najučinkovitiji je bio inhibitor 5. IC₅₀ vrijednost je iznosila 0,2449 $\mu\text{mol/L}$ nakon 72 h izlaganja. Za SiHa stanice najučinkovitiji je inhibitor 8. IC₅₀ iznosi 2,764 $\mu\text{mol/L}$ nakon 48 h inkubacije. Što su ove vrijednosti IC₅₀ niže, lijek bolje djeluje na stanice raka bez štetnog djelovanja na vlastiti organizam i pojave nuspojava.

Prethodne studije pokazale su da derivati tieno[2,3-b]piridina pokazuju citotoksičnost ovisnu o dozi i vremenu (15). Zbog svog učinka na smanjenje postotka matičnih stanica raka i

broja mamosfera, te utjecaja na ekspresiju nekoliko glikosfingolipida, može se zaključiti da novo-sintetizirani tienopiridinski derivat (3-amino-N-(3-kloro-2-metilfenil)-5-okso-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b]kinolin-2-karboksamid) ukazuje na mogućnost da se ostvari kao potencijalni novi lijek za trostruko negativnu terapiju raka dojke (15). Također, još jedan tienopiridinski derivat (3-amino-5-okso-N-naftil-5,6,7,8-tetrahidrotieno[2,3-b]kinolin-2-karboksamid), pokazao je citotoksičnu aktivnost na stanicama raka dojke i prostate (16).

Iz navedenih rezultata potvrđena je hipoteza te cilj ostvaren o citotoksičnom djelovanju novo-sintetiziranih tienopiridinskih derivata. Dokazano je smanjenje metaboličke aktivnosti ovisno o koncentraciji ispitivanih uzoraka kao i o vremenu izlaganja. Navedeni spojevi svakako imaju potencijal za nova istraživanja u svrhu liječenja karcinoma grlića maternice kao i ostalih bolesti. Prisutna su i određena ograničenja studije kao što su mnogobrojna istraživanja koja je potrebno dodatno napraviti kako bi se rezultati potvrdili te iskoristili u praksi.

6. ZAKLJUČAK

- I. *In vitro* izlaganje humanih stanica karcinoma grlića maternice (HeLa i SiHa) novo-sintetiziranim tienopiridinskim derivatima (inhibitor 5, 6, 8 i 9) ima citotoksično djelovanje.
- II. Svi inhibitori imaju aktivnost ovisnu o koncentraciji i vremenu izlaganja. Citotoksičnost raste proporcionalno s koncentracijom inhibitora i vremenom inkubacije.
- III. Djelovanje ispitivanih derivata slično je za obje linije HeLa i SiHa. Kod svih inhibitora uočeno citotoksično djelovanje na obje linije.
- IV. Najučinkovitiji inhibitor za HeLa staničnu liniju je inhibitor 5 kod kojeg je IC₅₀ iznosio 0,2449 μmol/L.
- V. Najučinkovitiji inhibitor za SiHa staničnu liniju je inhibitor 8 kod kojeg je IC₅₀ iznosio 2,764 μmol/L.
- VI. Citotoksično djelovanje tienpiridinskih derivata je potvrđeno za obje stanične linije te su potrebna daljnja ispitivanja i potvrda rezultata *in vitro* te u daljnjem radu *in vivo* ispitivanja na životinjskim modelima.

1. Onkologija.hr. Što je rak [Internet]. (citirano 5.9.2022.) Dostupno na: <https://www.onkologija.hr/sto-je-rak/>
2. USMF. Pathology secrets 3rd edition [Internet]. (citirano 5.9.2022.) Dostupno na: <https://morfopatologie.usmf.md/wpcontent/blogs.dir/78/files/sites/78/2016/09/Pathology-Secrets-3rd-Edition.pdf> 89.-102.str
3. Sun D, Li H, Cao M i sur. Cancer burden in China: trends, risk factors and prevention. *Cancer Biol Med.* 2020;17(4):879-895.
4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija i mortalitet od raka u EU-27 zemljama za 2020. godinu [Internet]. (citirano 5.9.2022.). Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>
5. ECIS - European Cancer Information System. Incidence and mortality estimates 2020 [Internet]. (citirano 5.9.2022.). Dostupno na: [https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?%0-0%1-All%2-All%4-1,2%3-0%6-0,85%5-2020,2020%7-7%CEstByCountry%\\$X0_8-3%\\$X0_19-AE27%\\$X0_20-No%CEstBySexByCountry%\\$X1_8-3%\\$X1_19-AE27%\\$X1_-1-1%CEstByIndiByCountry%\\$X2_8-3%\\$X2_19-AE27%\\$X2_20-No%CEstRelative%\\$X3_8-3%\\$X3_9-AE27%\\$X3_19-AE27%CEstByCountryTable%\\$X4_19-AE27](https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?%0-0%1-All%2-All%4-1,2%3-0%6-0,85%5-2020,2020%7-7%CEstByCountry%$X0_8-3%$X0_19-AE27%$X0_20-No%CEstBySexByCountry%$X1_8-3%$X1_19-AE27%$X1_-1-1%CEstByIndiByCountry%$X2_8-3%$X2_19-AE27%$X2_20-No%CEstRelative%$X3_8-3%$X3_9-AE27%$X3_19-AE27%CEstByCountryTable%$X4_19-AE27)
6. Msd priručnik. Rak vrata maternice [Internet]. (citirano 7.9.2022.). Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/ginekologija/ginekoloski-tumori/rak-vrata-maternice>
7. WHO. Cervical cancer maternice [Internet]. (citirano 7.9.2022.). Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>
8. Small W Jr, Bacon MA, Bajaj A, et al. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer.* 2017;123(13):2404-2412.
9. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina (Kaunas).* 2019;55(7):384. Published 2019 Jul 17.
10. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina (Kaunas).* 2019;55(7):384. Published 2019 Jul 17.
11. Cancer center. Cervical cancer types [Internet]. (citirano 7.9.2022.). Dostupno na: <https://www.cancercenter.com/cancer-types/cervical-cancer/types>

12. National center institute. Cervical center treatment [Internet]. (citirano 7.9.2022.). Dostupno na: https://www.cancer.gov/types/cervical/hp/cervical-treatment-pdq#_569_toc
13. Kim HY, Suh PG, Kim JI. The Role of Phospholipase C in GABAergic Inhibition and Its Relevance to Epilepsy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):3149. Published 2021 Mar 19.
14. Bill CA, Vines CM. Phospholipase C. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1131:215-242.
15. Marijan S, Markotić A, Mastelić A, et al. Author Correction: Glycosphingolipid expression at breast cancer stem cells after novel thieno[2,3-b]pyridine anticancer compound treatment. *Sci Rep.* 2021;11(1):8236. Published 2021 Apr 9.
16. Mastelić A, Čikeš Čulić V, Režić Mužinić N, Vuica-Ross M, Barker D, Leung EY, Reynisson J, Markotić A. Glycophenotype of breast and prostate cancer stem cells treated with thieno[2,3-b]pyridine anticancer compound. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:759-769.
17. Johnson CA, James D, Marzan A, Armaos M. Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. *Semin Oncol Nurs.* 2019;35(2):166-174.
18. Onkologija. Što je rak [Internet]. (citirano 7.9.2022.). Dostupno na: <https://www.onkologija.hr/sto-je-rak/>
19. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. *Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd.* Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 149-152.
20. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. . Incidencija i mortalitet od raka u EU-27 zemljama za 2020. godinu [Internet]. (citirano 27.7.2022.). Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>
21. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. [Internet]. (citirano 27.7.2022.). Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>
22. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Rak vrata maternice epidemiološki podaci [Internet]. (citirano 30.7.2022.). Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/rak-vrata-maternice-epidemioloski-podaci/>
23. ATCC. Products podaci [Internet]. (citirano 7.10.2022.). Dostupno na: <https://www.atcc.org/products/htb-35>

24. ResearchGate. Morphology of SiHa cells[Internet]. (citirano 7.10.2022.). Dostupno na:
https://www.researchgate.net/figure/Morphology-of-SiHa-cells-a-before-treatment-and-b-d-after-incubated-with_fig5_225977369
25. ATCC. Products [Internet]. (citirano 7.9.2022.). Dostupno na:
<https://www.atcc.org/products/ccl-2>
26. ATCC. Products [Internet]. (citirano 7.9.2022.). Dostupno na:
<https://www.atcc.org/products/ccl-2>
27. FisherSci. Products [Internet]. (citirano 7.9.2022.). Dostupno na:
<https://www.fishersci.se/shop/products/buerker-tuerk-counting-chambers-2/p-8003573>
28. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 1387536. Retrieved September 7, 2022 from
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1387536>.
29. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 1420003. Retrieved September 7, 2022 from
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1420003>.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Cilj istraživanja bio je ispitati potencijalnu citotoksičnost novo-sintetiziranih tienopiridinskih derivata na humanim stanicama karcinoma grlića maternice HeLa i SiHa. Pretpostavka je da će se metabolička aktivnost stanica smanjiti nakon izlaganja derivatima u odnosu na kontrolnu skupinu.

Materijali i metode:

Citotoksičnost se ispitala MTT metodom koja određuje postotak metaboličkih aktivnih stanica nakon tretiranja tienopiridinskim derivatima (inhibitori 5, 6, 8 i 9). Derivati su pripremljeni u 7 različitih koncentracija: 0,05, 0,2, 0,5, 1, 2,5 i 10 $\mu\text{mol/L}$. Vrijeme izlaganja stanica inhibitorima je bilo 4, 24, 48 i 72 h. Djelotvornost derivata mjerena je spektrofotometrijski na 570 nm.

Rezultati:

Inhibitori 5, 6, 8 i 9 su pokazali značajno citotoksično djelovanje na obje stanične linije HeLa i SiHa. Citotoksičnost je ovisna o koncentraciji i vremenu izlaganja stanica. Najučinkovitiji inhibitor za HeLa staničnu liniju je inhibitor 5. Inhibitor 8 je pokazao najveći utjecaj na metaboličku aktivnost SiHa stanične linije.

Zaključci:

Ispitivanje citotoksičnosti novo-sintetiziranih piridinskih derivata pokazalo je značajnu aktivnost svih derivata na obje stanične linije. Rezultati su slični za HeLa i SiHa stanice. Aktivnost je ovisna o koncentraciji i vremenu izlaganja stanica derivatima. Hipoteza ovog istraživanja je potvrđena, a cilj ostvaren. Potrebna su daljnja *in vitro* ispitivanja i potvrda rezultata kao i *in vivo* istraživanja na životinjama.

9. SUMMARY

Diploma thesis title:

Cytotoxic effect of thienopyridine derivatives on human cervical cancer cells.

Objectives:

The aim of the research was to examine the potential cytotoxicity of newly synthesized thienopyridine derivatives on HeLa and SiHa human cervical cancer cells. The assumption is that the metabolic activity of the cells will decrease after exposure to the derivative compared to the control group.

Materials and methods:

Cytotoxicity was tested by the MTT method, which determines the percentage of metabolically active cells after treatment with thienopyridine derivatives (inhibitors 5, 6, 8 and 9). The derivatives were prepared in 7 different concentrations: 0.05, 0.2, 0.5, 1, 2.5 and 10 $\mu\text{mol/L}$. The time of exposure of cells to inhibitors was 4, 24, 48 and 72 h. The effectiveness of the derivatives was measured spectrophotometrically at 570 nm.

Results:

Inhibitors 5, 6, 8 and 9 showed significant cytotoxic activity on both HeLa and SiHa cell lines. Cytotoxicity depends on the concentration and time of exposure of the cells. The most effective inhibitor for the HeLa cell line is inhibitor 5. Inhibitor 8 showed the greatest impact on the metabolic activity of the SiHa cell line.

Conclusions:

Cytotoxicity testing of newly synthesized pyridine derivatives showed significant activity of all derivatives on both cell lines. The results are similar for HeLa and SiHa cells. The activity depends on the concentration and time of exposure of the cells to the derivatives. The hypothesis

of this research was confirmed, and the objectivities achieved. Further *in vitro* tests and confirmation of the results as well as *in vivo* animal studies are required