

# Analiza metabolita stanica humanog karcinoma grlića maternice nakon tretmana tienopiridinskim derivatom

---

**Mađor, Lorena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:171:177153>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Lorena Mađor**

**ANALIZA METABOLITA STANICA HUMANOG KARCINOMA GRLIĆA  
MATERNICE NAKON TRETMANA TIENOPIRIDINSKIM DERIVATOM**

**Diplomski rad**

**Akademska godina:**

**2022./2023.**

**Mentor: Prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, listopad 2023.**

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** odobrena je na 79. sjednici Vijeća studija Farmacije, 35. sjednici Vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 24. sjednici Vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić  
**Pomoć pri izradi:** izv. prof. dr. sc. Mila Radan

## ANALIZA METABOLITA STANICA HUMANOG KARCINOMA GRLIĆA MATERNICE NAKON TRETMANA TIENOPIRIDINSKIM DERIVATOM

Lorena Mađor, broj indeksa 201814

**Naslov rada:** Analiza metabolita stanica humanog karcinoma grlića maternice nakon tretmana tienopiridinskim derivatom

**Cilj:** Cilj istraživanja bio je odrediti metabolički odgovor stanica humanog karcinoma grlića maternice nakon tretmana tieno[2,3-*b*]piridinskim derivatom (*E*)-3-amino-5-(3-(3-bromfenil)akriloil)-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-6-metiltieno[2,3-*b*]piridin-2-karboksamidom (inhibitor 8).

**Materijali i metode:** Prethodno je korištenjem MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) testa određena IC50 vrijednost inhibitora 8 (2,14 μM) te su tom koncentracijom tretirane stanice humanog karcinoma grlića maternice HeLa. Kontrolne stanice su inkubirane u samom mediju. Nakon 48 h napravljena je derivatizacija staničnog metaboloma te su uzorci analizirani pomoću plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS). Ribitol je korišten kao standard. Za analizu podataka korištena je platforma MetaboAnalyst te statistička obrada T-testom, uz prag *p*-vrijednosti od 0,05. Rezultati su prikazani tablično i grafički pomoću PCA usporedbe (analiza glavnih komponenti, od engl. *principal component analysis*).

**Rezultati:** Provedeni su analiza glavnih komponentata (PCA), analiza kvantitativnog obogaćivanja i T-test te su rezultati prikazani grafički. PCA analizom pokazano je da tretiranje stanica inhibitorom 8 uzrokuje metaboličke promjene. Kvantitativna analiza obogaćivanja pokazuje da se najveća promjena dogodila u metabolizmima šećera i glicerolipida. T-testom utvrđen je statistički značajna razlika u koncentraciji metabolita fruktoze i glicerola između tretiranih i netretiranih stanica.

**Zaključci:** *In vitro* izlaganje stanične linije humanog karcinoma grlića maternice HeLa tieno[2,3-*b*]piridinskom derivatu dovodi do metaboličkih promjena. Tretiranje karcinomskih stanica tieno[2,3-*b*]piridinskim derivatom moglo bi predstavljati novi terapijski pristup liječenja, stoga su potrebna daljnja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja kako bi se potvrdilo djelovanje.

**Ključne riječi:** karcinom grlića maternice, tienopiridinski derivat, metaboliti

**Rad sadrži:** 51 stranica, 19 slika, 3 tablice, 40 referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić – predsjednik povjerenstva
2. doc. dr. sc. Josipa Bukić - član
3. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić – član - mentor

**Datum obrane:** 23. listopada 2023.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u knjižnicama Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i 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. 79 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 35 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 24

**Mentor:** Professor Vedrana Čikeš Čulić, PhD

**Technical assistance:** Assoc. professor Mila Radan, PhD

### ANALYSIS OF METABOLITES OF HUMAN CERVICAL CARCINOMA CELLS AFTER TREATMENT WITH A THIENOPYRIDINE DERIVATIVE

Lorena Mađor, index N<sup>o</sup> 201814

**Diploma thesis title:** Analysis of metabolites of human cervical carcinoma cells after treatment with a thienopyridine derivative

**Objectives:** The aim of the research was to determine the metabolic response of human cervical cancer cells after treatment with 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).

**Materials and methods:** Previously, the IC<sub>50</sub> value of inhibitor 8 (2,14 μM) was determined using the MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolid-2)-2,5-diphenyltetrazoline bromide) test, and HeLa human cervical carcinoma cells were treated with this concentration. Control cells were incubated in the medium itself. After 48h the cellular metabolome was derivatized and the samples were analyzed using gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS). Ribitol was used as a standard. The MetaboAnalyst platform was used for data analysis and statistical processing with the T-test, with a p-value threshold of 0,05. The results are presented tabularly and graphically using PCA comparison (principal component analysis).

**Results:** Principal component analysis (PCA), quantitative enrichment analysis and T-test were performed and the results were presented graphically. PCA analysis showed that treatment of cells with inhibitor 8 causes metabolic changes. Quantitative enrichment analysis shows that the greatest change occurred in sugar and glycerolipid metabolisms. The t-test showed a statistically significant difference in the concentration of fructose and glycerol metabolites between treated and untreated cells.

**Conclusions:** *In vitro* exposure of the human cervical carcinoma cell line HeLa to a thieno[2,3-b]pyridine derivative leads to metabolic changes. Treatment of cancer cells with a thieno[2,3-b]pyridine derivative could represent a new therapeutic approach, therefore further *in vitro* and *in vivo* studies are needed to confirm the effect.

**Key words:** cervical cancer, thienopyridine derivative, metabolites

**Thesis contains:** 51 pages, 19 figure, 3 tables, 40 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Assoc. prof. Nikolina Režić Mužinić, PhD - chair person
2. Asst. prof., Josipa Bukić, PhD - member
3. Professor Vedrana Čikeš Čulić, PhD – member - supervisor

**Defence date:** October 23rd, 2023

**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 svojoj mentorici prof. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić na ukazanom povjerenju, kao i na strpljenju i savjetima tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.*

*Također zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Mili Radan, koja je izdvojila svoje vrijeme i sudjelovala u izradi ovog rada.*

*Najveće hvala mojoj obitelji na beskrajnoj ljubavi, podršci i razumijevanju.*

*I na kraju, jedno veliko hvala mojim kolegama i prijateljima koji su mi uljepšali ovih pet godina života.*

# SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Tumor.....	2
1.2. Onkogeni .....	4
1.3. Tumor supresorski geni.....	7
1.4. Rak grlića maternice .....	10
1.5. Terapija raka grlića maternice .....	13
.....	14
1.6. Epidemiologija raka grlića maternice u svijetu i Hrvatskoj .....	15
1.7. Tienopiridinski derivati.....	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	19
2.1. Cilj istraživanja.....	20
2.2. Hipoteza .....	21
3. MATERIJALI I METODE.....	22
3.1. Stanična linija i novosintetizirani inhibitor .....	23
3.1.1. HeLa .....	23
3.2.2. Novosintetizirani inhibitor.....	24
3.2. Postupak .....	26
3.3. GC-MS .....	27
3.4. Statistička analiza .....	28
4. REZULTATI.....	31
4.1. Identifikacija spojeva .....	32
4.2. Analiza glavnih komponenti - PCA.....	33
4.3. Analiza kvantitativnog obogaćivanja.....	34
4.4. T-test .....	35
5. RASPRAVA .....	36
6. ZAKLJUČAK .....	39
7. LITERATURA.....	41
8. SAŽETAK .....	46
9. SUMMARY .....	48
10. ŽIVOTOPIS .....	50

## POPIS KRATICA:

ABL – protoonkogen koji kodira protein tirozin-kinazu, a kojeg u kroničnoj mijeloičnoj leukemiji aktivira kromosomska translokacija

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

C-MYC – protoonkogen koji kodira transkripcijski čimbenik i koji se često aktivira kromosomskim translokacijama ili umnažanjem gena u ljudskim tumorima

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

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

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

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

HPV – humani papiloma virus

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

N-MYC – protoonkogen koji određuje transkripcijski čimbenik i koji se često aktivira umnažanjem u neuroblastomima

P53 – gen za protein p53

p53 – tumor supresorski protein

Raf – (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*); serin/treonin-kinaza

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

RB – (engl. *retinoblastoma protein*); transkripcijski regulacijski protein kojega kodira gen supresor tumora

RNA – (engl. *ribonucleic acid*); ribonukleinska kiselina

VEGF – (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*); vaskularni endotelni čimbenik rasta



## **1. UVOD**

## 1.1. Tumor

Tumori (lat. *tumor* - oteklina) ili neoplazme (grč. *neos* - nov, *plasia* - rast, tj. novi rast) patološke su tvorbe koje nastaju kao posljedica prekomjernih proliferacija abnormalnih stanica. Po kliničkoj klasifikaciji dijele se na dobroćudne i zloćudne novotvorine. Dobroćudni ili benigni tumori imaju povoljan klinički ishod, rastu polagano i ne šire se po tijelu jer je rast ograničen na organ u kojemu je tumor nastao. Zloćudni ili maligni tumori rastu mnogo brže i šire se u okolna tkiva. Imaju sposobnost metastaziranja (grč. *metastasis* - promjena mjesta) što znači da se mogu proširiti u druge dijelove tijela putem krvi ili limfe. Dok dobroćudni tumori uglavnom ne uzrokuju sistavne simptome, zloćudni često dovode do opće slabosti, gubitka tjelesne mase, a na posljetku mogu dovesti i do smrti (1).

Rak označava naziv za skup bolesti koje su različite po kliničkoj slici, etiologiji i liječenju. Zajednička karakteristika svih vrsta raka je da nastaju od zdravih stanica u procesu koji se naziva zloćudna pretvorba (2). Klasificiraju se prema vrsti stanica iz kojih su nastali i većina ih se može svrstati u jednu od tri skupine: karcinome, sarkome i leukemije ili limfome. Karcinomi su zloćudne bolesti epitelnih stanica i na njih otpada 90% slučajeva raka. Sarkomi su solidni tumori vezivnog tkiva kao što su mišići, kosti i hrskavica. a leukemije i limfomi nastaju iz krvotvornih stanica i stanica imunološkog sustava (3).

Nastanak tumora iz jedne stanice koja počinje abnormalno proliferirati naziva se klonalnost tumora i temeljno je svojstvo raka. To je proces koji uključuje više koraka od kojih se prvi naziva inicijacija tumora, a rezultat je genetičkih promjena koje dovode do proliferacije jedne stanice. Nakon toga dolazi do stadija progresije tijekom kojeg se događaju dodatne mutacije tumorskih stanica i selekcija brže rastućih stanica (3). Unatoč individualnim karakteristikama tumora u različitim organima, postoje određena obilježja koja su zajednička zloćudnim novotvorinama kao što su izbjegavanje apoptoze, stalni poticaj na staničnu proliferaciju, izbjegavanje usporavanja proliferacije, neoangiogeneza, kolonizacija udaljenih organa, izbjegavanje imunološkog odgovora i promjene u staničnom metabolizmu (4). Nekontrolirana proliferacija stanica raka *in vivo* pokazuje i slično ponašanje u staničnim kulturama, gdje je pokazano da normalne stanice proliferiraju dok ne postignu određenu gustoću jer odgovaraju na signale koji dovode do inhibicije proliferacije. Suprotno tome, tumorske stanice nisu osjetljive na inhibiciju ovisnu o gustoći i nastavljaju rasti u kulturi čime oponašaju abnormalnu proliferaciju *in vivo* (5). Bitnu ulogu u procesu širenja i metastaziranja

ima proces angiogeneze, odnosno stvaranje novih krvnih žila koje nastaju kao odgovor na čimbenike rasta koje luče same tumorske stanice. Nakon angiogeničke stimulacije nastaju nove kapilare koje urastaju u tumor i olakšavaju ulazak u krvožilni sustav i stvaranje distalnih metastaza. Još jedan čimbenik koji značajno pridonosi nastanku i širenju tumora jest sposobnost stanica za izbjegnu apoptozu ili programiranu staničnu smrt, zbog čega stanice raka žive dulje od normalnih stanica. Izostanak apoptoze također omogućava stanicama raka otpornost na citostatike koji djeluju na način da oštećuju DNA (engl. *deoxyribonucleic acid* - deoksiribonukleinska kiselina) (5).

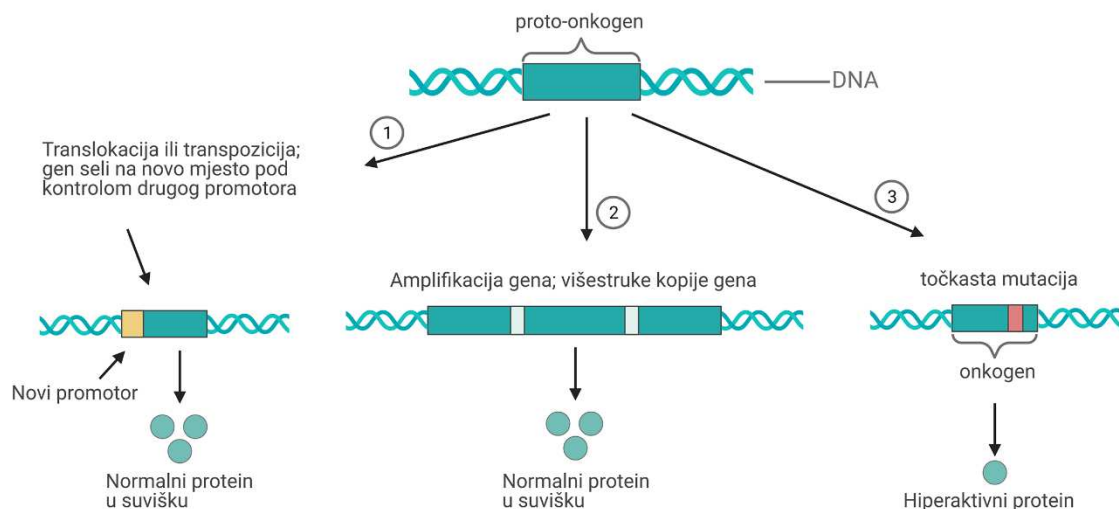
Tvari koje uzrokuju tumore zovu se karcinogeni. Razni kemijski karcinogeni i Sunčevo ultraljubičasto zračenje djeluju na način da oštećuju DNA i uzrokuju mutacije. Neki od najpoznatijih kemikalija koje djeluju na taj način su jetreni karcinogen zvan aflatoksin, kao i sastojci duhanskog dima kao što su dimetilnitrozamin i benzo( $\alpha$ )piren. Postoje i drugi karcinogeni koji ne uzrokuju mutacije nego različitim mehanizmom djelovanja pridonose nastanku raka. Takav primjer su hormoni, posebice estrogeni, koji stimuliraju proliferaciju stanica i nazivamo ih promotorima tumora. Prekomjerno izlaganje estrogenima kod žena povećava mogućnost da će dobiti rak trupa maternice jer estrogen stimulira proliferaciju stanica endometrija (6). Osim toga, nastanak raka povezan je i s epigenetičkim promjenama kao što su modifikacije histona i metilacija DNA. U nastanku i progresiji raka bitnu ulogu imaju miRNA molekule kao i aktivnost telomeraza. Telomere su krajevi kromosoma koji se skraćuju pri svakoj diobi dok ne dođu u stanje kad se više ne mogu dijeliti, a stanice raka su sposobne izbjeći taj mehanizam putem enzima telomeraze koja produljuje telomere i daje mogućnost neograničene diobe (7).

## 1.2. Onkogeni

Geni koji uzrokuju zloćudne novotvorine nazivaju se onkogeni. Oni predstavljaju mutacije normalnih staničnih gena protoonkogeni koji imaju ulogu u regulaciji stanične proliferacije i diferencijacije. Proteini koji nastaju od protoonkogeni mogu imati različite funkcije i kao takvi mogu se svrstati u skupine:

- a) čimbenici rasta
- b) receptori za čimbenike rasta
- c) signalne molekule
- d) molekule koje se vežu za DNA
- e) regulatori mitotičkog ciklusa (8).

Postoji više procesa koji mogu uzrokovati nastanak onkogeni iz protoonkogeni, a to su točkaste mutacije, prekomjerno izražavanje, translokacije i insercije virusnih gena (Slika 1).

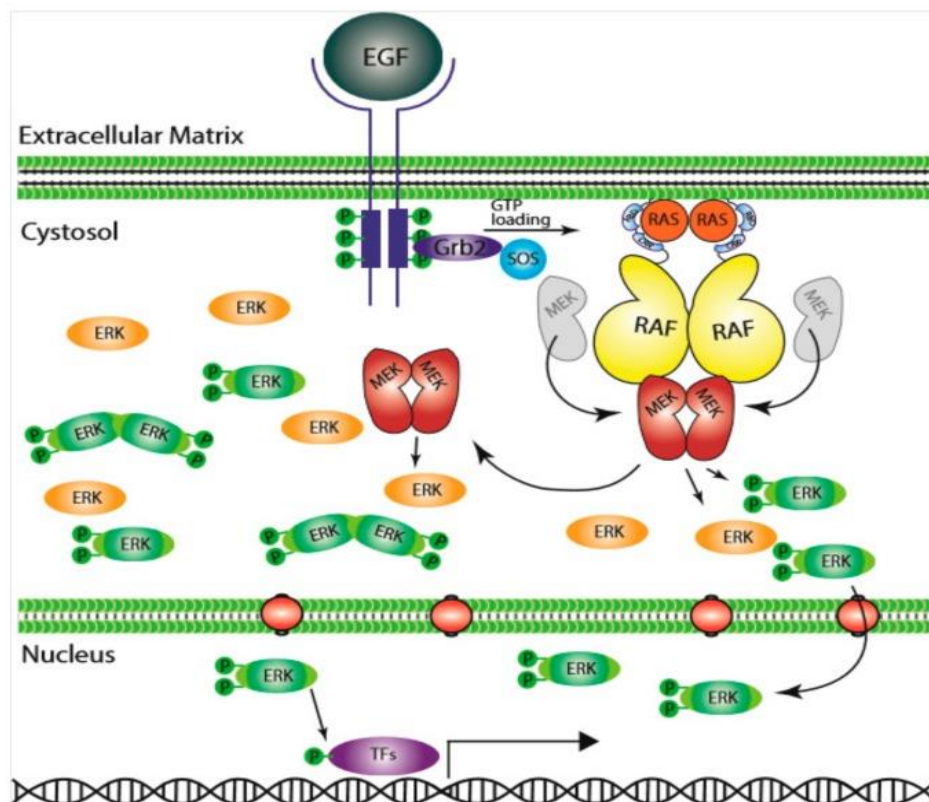


**Slika 1.** Protoonkogeni postaju onkogeni: translokacijom ili transpozicijom (1); amplifikacijom (2); točkastom mutacijom (3)

Preuzeto s: <https://www.genetika.biol.pmf.hr/docs/sadrzaj/16-poglavlje/translacijska-i-posttranslacijska-kontrola/>

Datum preuzimanja: 17.9.2023.

Kod točkastih mutacija jedna baza zamjenjuje se drugom i posljedično nastaje oštećenje DNA koje rezultira sintezom proteina kojima je jedna aminokiselina zamijenjena drugom. Jedan primjer su promjene gena iz *RAS* porodice (*KRAS*, *HRAS*, *NRAS*), koji su mutirani u karcinomima pluća, gušterače i debelog crijeva. Te mutacije dovode do sinteze abnormalnog *RAS* proteina i poremećaja u prenošenju signala što u konačnici uzrokuje nekontroliranu proliferaciju stanica (8). Prijenosni put Ras-Raf-MEK-ERK ima važnu ulogu u nastanku raka (Slika 2). Čimbenici rasta vežu se na EGFR receptor i druge receptore koji onda aktiviraju Ras, a on aktivira serin/treonin-kinazu Raf, koja posljedično aktivira MEK-kinazu. U konačnici MEK-kinaza aktivira ERK-kinazu poznatu i pod nazivom MAP-kinaza koja onda aktivira transkripcijske čimbenike. U različitim tipovima raka mutacije se mogu javiti u različitim komponentama ovog signalnog puta i sukladno tome razvijeni su biološki lijekovi koji ciljano djeluju na njih. Ras je uključen u nekoliko signalnih puteva, uključujući put koji dovodi do aktivacije mTOR proteina koji je ciljna meta bioloških lijekova everolimusa i temsirolimusa (9). Razumijevanje interakcija između Ras i drugih signalnih puteva ima značajnu ulogu u razvoju terapije za različite tipove raka.



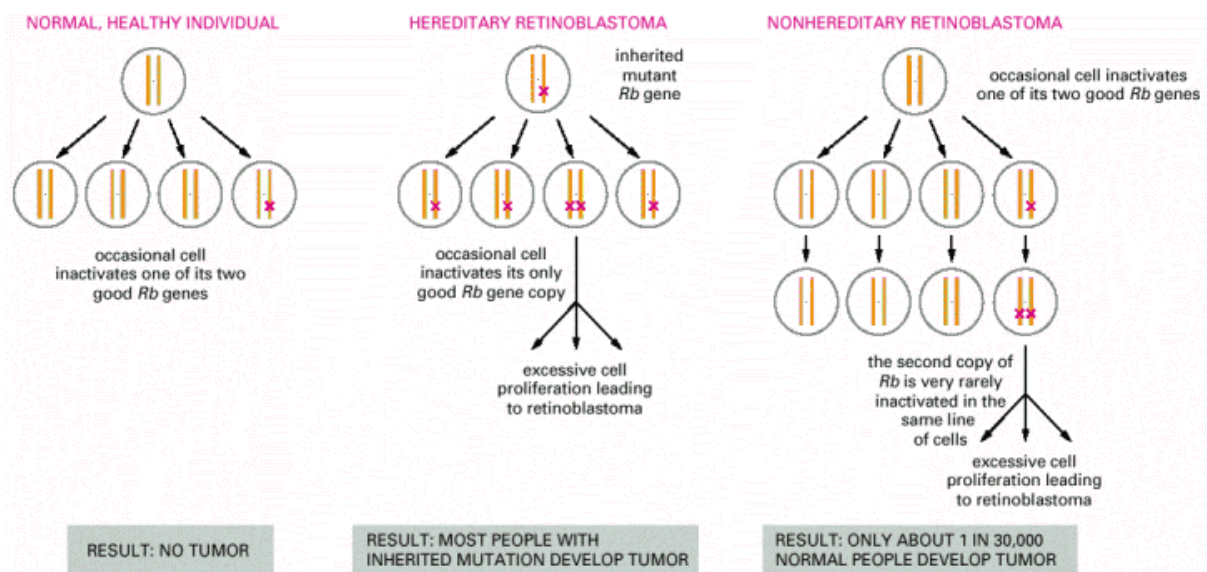
**Slika 2.** Ras-Raf-MEK-ERK put prijenosa signala; Degirmenci U, Wang M, Hu J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells*. 2020;9:198.

Prekomjerno izražavanje može biti posljedica amplifikacije normalnih protoonkogenata. Kao rezultat toga postoji veći broj kopija tog gena, što dovodi do povećane produkcije proteina. Jedan od najpoznatijih primjera je *N-MYC* koji je često amplificiran u neuroblastomima. Kako se broj kopija gena povećava, rizik od brzog širenja tumora i lošeg ishoda za pacijenta obično raste (8).

Kromosomske translokacije često igraju ključnu ulogu u stvaranju onkogenata. Prijelomi kromosoma mogu dovesti do premještanja protoonkogenata na nove kromosomske lokuse što dovodi do prekomjerne stimulacije tih gena. U Burkittovim limfomima gen *C-MYC* premješta se s kromosoma 8 na kromosom 14, gdje se nalazi gen koji kodira teški lanac imunoglobulina. Još jedan primjer je *Philadelphia* kromosom u kroničnoj mijeloičnoj leukemiji koji nastaje translokacijom *ABL* gena s 9. na 22. kromosom (8).

### 1.3. Tumor supresorski geni

Dok onkogeni potiču nekontrolirani rast stanica kada su mutirani ili aktivirani, tumor supresorski geni sprječavaju razvoj raka i gubitak njihove funkcije doprinosi nastanku tumora. Istraživanja retinoblastoma, rijetkog dječjeg tumora oka, dovela su do otkrića prvog tumor supresorskog gena *RB*. Retinoblastomi se mogu pojaviti u hereditarnom i sporadičnom obliku i na temelju toga američki znanstvenik Knudson predstavio je tzv. hipotezu dvaju udaraca. U hereditarnom tumoru dijete naslijedi mutaciju u jednom od tumor supresorskih gena, međutim tumor se obično ne razvija na osnovi jedne mutacije. Da bi se tumor formirao potreban je drugi udarac ili mutacija koja inaktivira i drugi tumor supresorski gen. Rak se obično javlja u oba oka, a može se i pojaviti u drugim organima. S druge strane, sporadični retinoblastom često zahvaća samo jedno oko i moraju se dogoditi dvije spontane mutacije da bi se rak razvio (10). Dakle, kod oba oblika retinoblastoma moraju se inaktivirati oba alela gena *RB* (11).



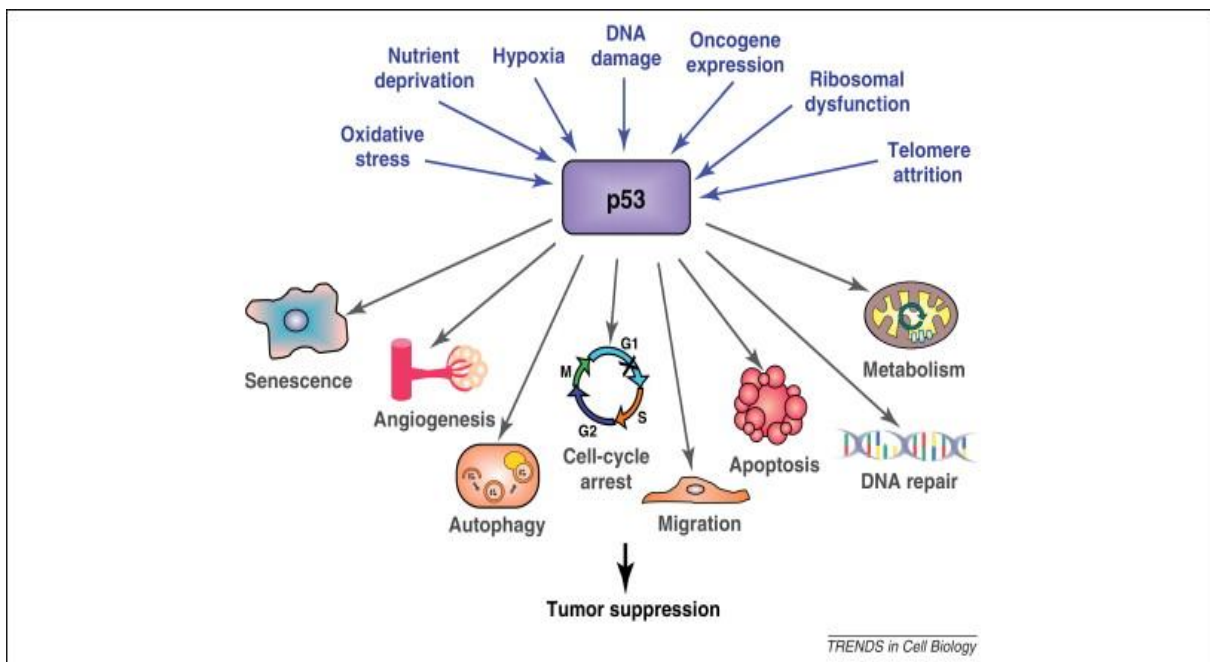
Slika 3. Retinoblastom: način nasljeđivanja

Preuzeto s:

[http://dpwadweb.depauw.edu/cfornari\\_web/DISGEN/retinoblastoma\\_website/public\\_html/Mo de%20of%20Inheritance.htm](http://dpwadweb.depauw.edu/cfornari_web/DISGEN/retinoblastoma_website/public_html/Mo de%20of%20Inheritance.htm)

Datum preuzimanja: 20.9.2023.

Još jedan bitan tumor supresorski gen je *P53*, koji se naziva i čuvarom genoma. Produkt mu je transkripcijski čimbenik p53 koji igra ključnu ulogu u nadzoru nad integritetom stanice i aktivira se kao odgovor na oštećenje stanične DNA ili poremećajima vezanim za stanični stres. On kontrolira prelazak stanice iz G1 u S fazu staničnog ciklusa i ako prepozna oštećenu DNA djeluje na način da zaustavlja mitozu i daje vremena da se DNA popravi prije nego što se replicira. Ako je šteta nepopravljiva pokreće se proces programirane stanične smrti (Slika 4). Mutacije gena *P53* mogu dovesti do gubitka kontrole nad staničnim rastom i diobom jer u tom slučaju i stanice koje imaju defektnu DNA ulaze u S fazu i dijele se (10). Mutacije ovoga gena također su povezane s regulacijom tumorske angiogeneze i odgovorom stanica na kemoterapiju (11).



**Slika 4.** Uloge tumor supresorskog gena p53

Preuzeto s: <https://www.cell.com/trends/cell-biology/fulltext/S0962-8924%2811%2900222-4>

Datum preuzimanja: 20.9.2023.



Genomska stabilnost je ključna za očuvanje integriteta genoma u normalnim stanicama. Mehanizmi koji pomažu u održavanju te stabilnosti su popravci oštećenja DNA, kontrola staničnog ciklusa i mehanizmi nadzora nad replikacijom DNA. Kada se ovi mehanizmi poremete ili postanu nefunkcionalni u stanicama, dolazi do genomske nestabilnosti i nastanka mutacija koji su podloga za nastanak i progresiju tumora. Geni koji su bitni za očuvanje genomske stabilnosti igraju ključnu ulogu u sprječavanju nastanka raka te se još prepoznaju i pod nazivom geni skrbnici (engl. *caretakers*). Jedan od primjera su geni *BRCA1* i *BRCA2*, koji su povezani s nasljednim oblicima raka dojke i jajnika. Oni popravljaju DNA mehanizmom homologne rekombinacije, a mutacijom tih gena stanice raka prisiljene su pronaći druge načine popravka oštećenja. Lijekovi koje zovemo PARP-inhibitori ciljano inhibiraju te mehanizme popravka (11).

## 1.4. Rak grlića maternice

Rak grlića maternice ozbiljna je maligna bolest koja se razvija u cerviksu, donjem dijelu maternice koji se otvara u rođnicu. Za razvoj ovog raka obično je potreban duži period, između 10 do 15 godina (12). U većini slučajeva pojavljuje se kod mladih žena u njihovim 20-im i 30-im godinama (13). Infekcija humanim papiloma virusom (HPV) igra ključnu ulogu u razvoju ovog raka, iako sama HPV infekcija ne uzrokuje bolest jer može biti prolazna. Uz perzistentnu infekciju HPV-om razvoj raka može trajati desetljećima (14). Eksperimentalne studije pokazale su da podtipovi 16 i 18 humanog papiloma virusa uzrokuju i do 70% prekanceroznih lezija grlića maternice. HPV ima sposobnost integriranja svojeg genetskog materijala u genom stanice koju zarazi te posljedično tome dolazi do inaktivacije tumor supresorskih gena i aktivacije onkogeni. E6 i E7 su mali onkoproteini koji utječu na regulaciju staničnog ciklusa domaćina ometajući p53 i RB što dovodi do poremećaja u mehanizmima popravka DNA, a time i do progresije raka (15).

Uvođenje PAPA-testa predstavlja značajan napredak u smanjenju smrtnosti od raka grlića maternice jer omogućava otkrivanje bolesti u ranom stadiju (13). Tijekom ginekoloških pregleda uzima se bris i šalje na citološku analizu gdje se utvrđuje prisutnost upalnih promjena i abnormalnosti u strukturi stanica (12). Mana je što ovaj test u nekim slučajevima pokazuje lažno negativne ili lažno pozitivne rezultate (16). Rak grlića maternice uglavnom se može spriječiti, a rano otkrivanje povezano je sa značajno poboljšanim stopama preživljavanja. U razvijenim zemljama s uspostavljenim programima probira to je postala rijetka bolest. Međutim, bolest je opasnija za žene u nerazvijenim zemljama s ograničenim resursima, gdje se češće otkriva tumor u uznapredovalom stadiju koji je teže liječiti (17).

Cijepljenje protiv humanog papiloma virusa igra ključnu ulogu u prevenciji raka grlića maternice. Trenutno postoje tri vrste cjepiva: dvovalentno, četverovalentno i najnovije cjepivo koje pruža zaštitu od čak 9 tipova HPV-a pod nazivom Gardasil 9 (18). Između ostalog, cjepiva uglavnom nude zaštitu od podtipova 16, 18, 6 i 11. Bitno je naglasiti da ova profilaktička cjepiva ne pružaju zaštitu pojedincima s već postojećim HPV infekcijama ili bolestima povezanim s HPV-om (19). Istraživanja su pokazala da je najučinkovitije primijeniti cjepivo prije nego što osoba stupi u spolne odnose (20).

Predinvazivni tumor i rani invazivni rak nemaju vidljive simptome, stoga se jedino mogu otkriti nakon ginekološkog pregleda i PAPA-testa. Kako se tumor razvija počinju se pojavljivati simptomi kao što su neobjašnjivo vaginalno krvarenje i pojava iscjetka neugodnog mirisa, a uznapredovala faza bolesti donosi bol u području zdjelice, anemiju, oticanje nogu, hidronefrozu koja se javlja kada postoji blokada mokraćnog sustava i posljedičnu uremiju. U slučaju širenja tumora u rektum može doći do krvi u stolici, opstrukcije i proljeva, dok širenje u mokraćni mjehur dovodi do pojave hematurije. Kod metastatske bolesti presadnice se često nalaze u plućima, jetri, kostima i paraaortalnim limfnim čvorovima (21).

Osim ginekološkog pregleda uz PAPA-test koji je osnova za dijagnosticiranje predinvazivnog stadija bolesti, postoje i druge metode koje mogu pomoći kod detekcije tumora u ranim fazama. Takav primjer je kolposkopija, dijagnostički postupak kojim se određuje stupanj displazije cerviksa, vulve i rodnice (22). Kod pacijentica s rakom grlića maternice obvezno je napraviti MR zdjelice za procjenu stupnja lokalnog širenja bolesti. Ako postoji sumnja na metastaziranje tumora u mokraćni mjehur ili rektum potrebno je napraviti cistoskopiju i rektoskopiju. Za definiciju zahvaćenosti zdjelice, jetre i drugih trbušnih organa moguće je napraviti PET-CT ili MSCT abdomena i zdjelice. Rast i invazija tumora mogu dovesti do opstrukcije protoka mokraće što se potvrđuje intravenskom urografijom i svrstava bolest u FIGO stadij IIIb (Tablica 1). Za potpunu dijagnostiku potrebni su i nalazi kompletne krvne slike, diferencijalne krvne slike, biokemijske pretrage te klirens kreatinina (21).

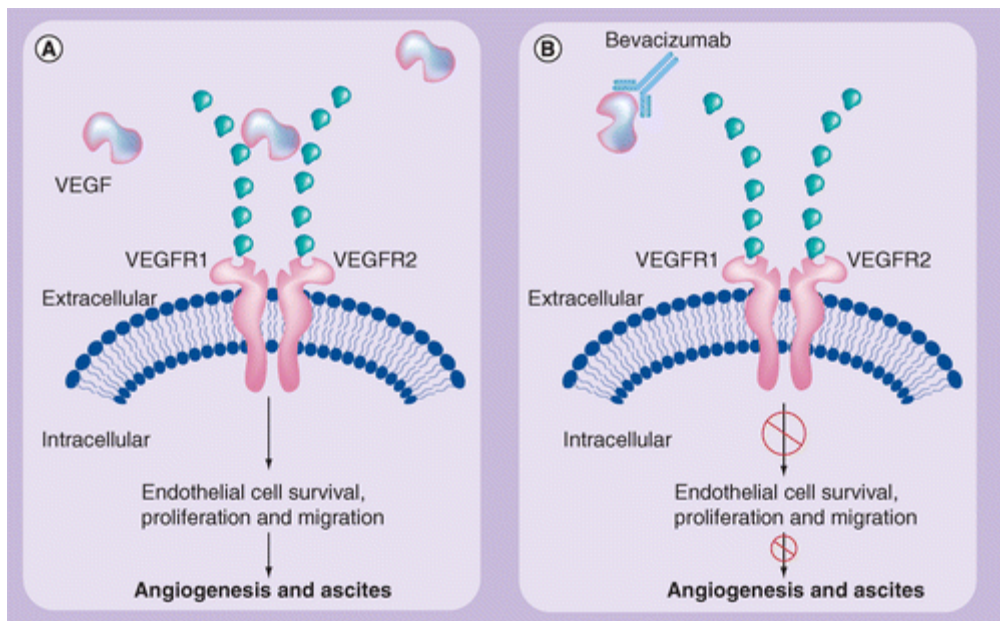
**Tablica 1.** FIGO klasifikacija raka grlića maternice (23).

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 hidronefroziju 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 hidronefroziju 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

## 1.5. Terapija raka grlića maternice

Kod početnih stadija raka grlića maternice najbitniju ulogu ima kirurško liječenje (24). Konizacija i zdjelična limfadenektomija pokazali su se prikladnima za niskorizične pacijentice s preinvazivnim lezijama koje žele očuvati fertilitet (25). Za liječenje invazivnih tumora primjenjuje se zahvat koji je standard već desetljećima - radikalna histerektomija (26). S ciljem izbjegavanja ovog invazivnog zahvata koji ostavlja vidljive ožiljke nakon operacije i zahtijeva duže vrijeme oporavka, provedeno je tzv. LACC (engl. *Laparoscopic Approach to Cervical Cancer*) ispitivanje koje je za cilj imalo usporediti ovaj zahvat s laparoskopskom ili robotski potpomognutom radikalnom histerektomijom (minimalno invazivna operacija). Ovaj zahvat pokazao je lošije rezultate naspram klasičnoj radikalnoj histerektomiji, iako se o toj temi i dalje raspravlja (27). Lokalno uznapredovali stadij bolesti može se liječiti radioterapijom, a uz zračenje može se dati i kemoterapija te se takav način liječenja naziva konkomitantna radiokemoterapija. Pokazano je da primjena vanjskog zračenja i cisplatine dovodi do boljih rezultata od same radioterapije, ali uočena je i visoka pojavnost recidiva. Može se primijeniti i brahiradioterapija usporedno s ifosfamidom i cisplatinom (23).

Metastatski rak grlića maternice uglavnom je neizlječiva bolest, a liječi se primjenom kemoterapije odnosno cisplatine uz paklitaksel, topotekan, ifosfamid ili gemcitabin. Uz kemoterapiju može se davati i bevacizumab, monoklonsko protutijelo koje se veže za VEGF (Slika 5). Kombinirana kemoimunoterapija dokazano produžuje preživljenje s 13 na 17 mjeseci (28). FDA je 2018.godine odobrio uporabu pembrolizumaba za metastatski rak grlića maternice s izraženim PD-L1. Postoje i drugi biološki lijekovi koji su u različitim fazama kliničkih istraživanja (29).



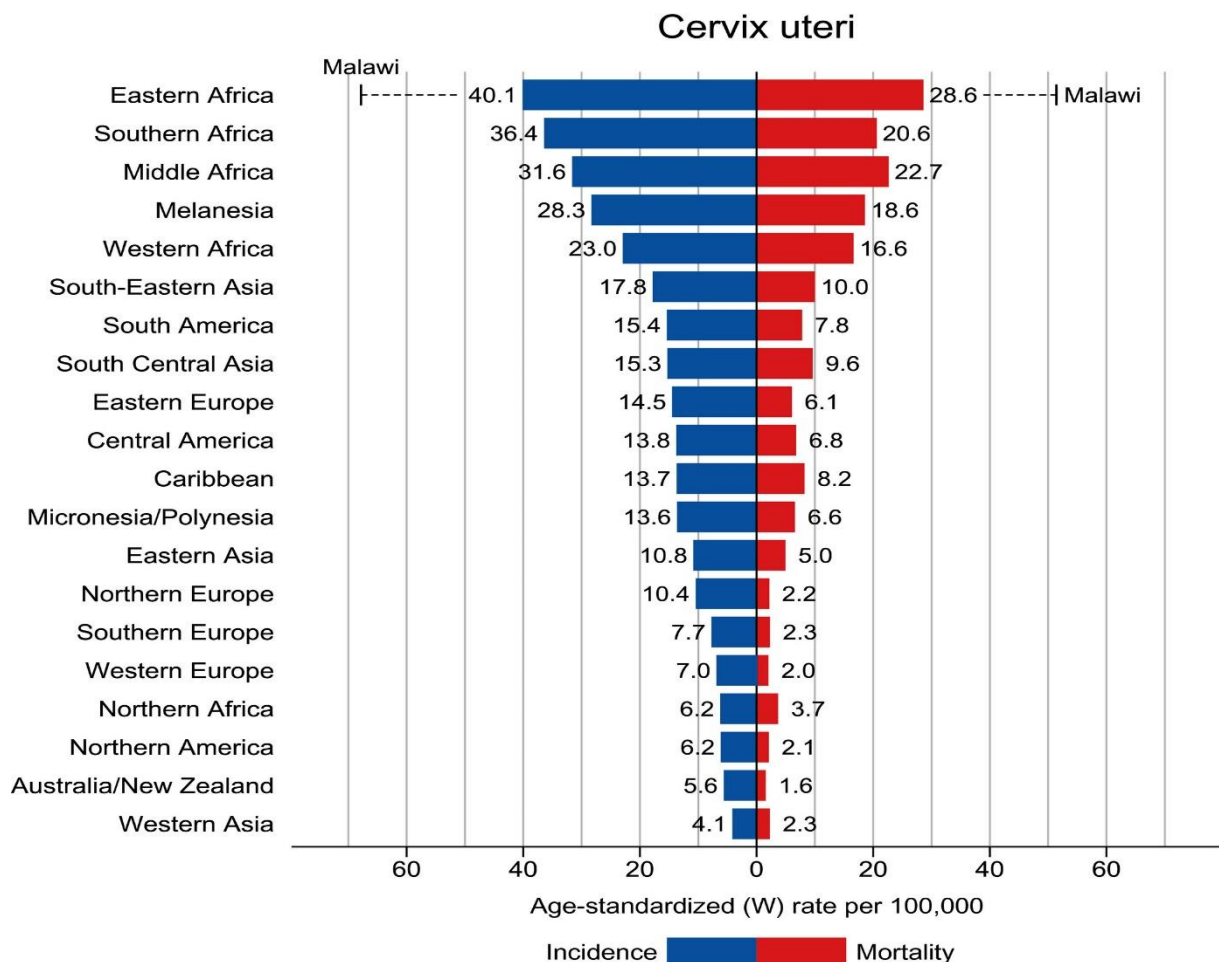
**Slika 5.** Način djelovanja bevacizumaba

Preuzeto s: <https://www.semanticscholar.org/paper/Development-of-bevacizumab-in-advanced-cervical-and-Eskander-Tewari/5172abdae2a469e551adb2cf523215e1aa911de1>

Datum preuzimanja: 23.9.2023.

## 1.6. Epidemiologija raka grlića maternice u svijetu i Hrvatskoj

Rak grlića maternice četvrti je najčešći rak među ženama u svijetu, s procijenjenih 604 000 novih slučajeva i 342 000 smrtnih slučajeva u 2020. Većina novih slučajeva i smrti u svijetu dogodila se u zemljama s niskim i srednjim prihodima (30). Rak grlića maternice najčešće je dijagnosticiran rak u 23 zemlje svijeta, a vodeći je uzrok smrti od raka u 36 zemalja, naročito u Africi, Melaneziji, Južnoj Americi i jugoistočnoj Aziji (Slika 6). Najveća regionalna incidencija i mortalitet je u području subsaharske Afrike, s povišenim stopama u istočnoj, južnoj i srednjoj Africi. Država Malavi ima najveću svjetsku incidenciju i stopu mortaliteta. Smatra se da se rak grlića maternice može gotovo potpuno spriječiti zbog vrlo učinkovitih mjera primarne (HPV cjepivo) i sekundarne (probir) prevencije, ali te mjere nisu ravnopravno provedene u svim zemljama (31).

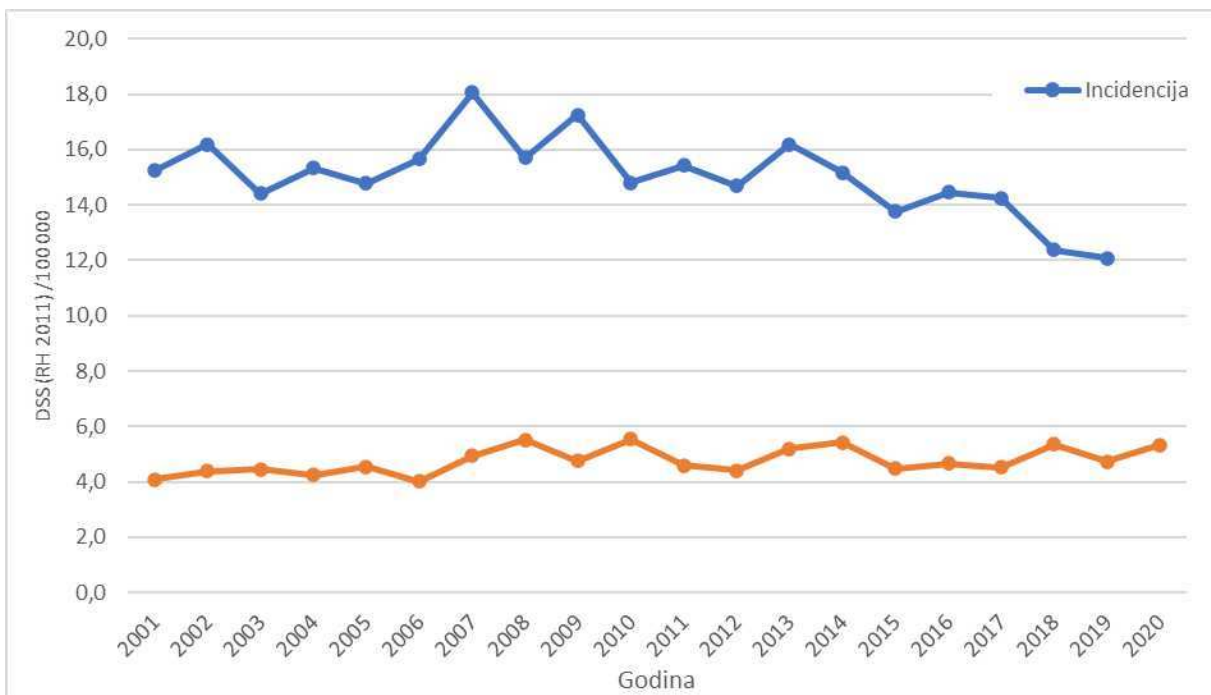


**Slika 6.** Dobno standardizirane stope incidencije i mortaliteta raka grlića maternice u 2020.

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

Datum preuzimanja: 24.9.2023.

Prema posljednjim podacima Registra za rak 2019. godine u Hrvatskoj je dijagnosticirano 268 slučajeva raka grlića maternice, a trećina novooboljelih žena bila je mlađa od 50 godina. Prema podacima o mortalitetu u 2020. godini od ovog raka u Hrvatskoj umrlo je 126 žena od kojih je 37% bilo mlađe od 60 godina. Zadnjih nekoliko godina bilježi se pad incidencije raka grlića maternice kao i u ostalim razvijenijim zemljama, no stopa mortaliteta ostaje stabilna (Slika 7). Prema informacijama sa zadnje međunarodne studije o preživljenju od raka (CONCORD-3) Hrvatska se nalazi na 20. mjestu od 28 europskih zemalja (32).



**Slika 7.** Trend incidencije i mortaliteta raka vrata maternice u Hrvatskoj, 2001.-2020.

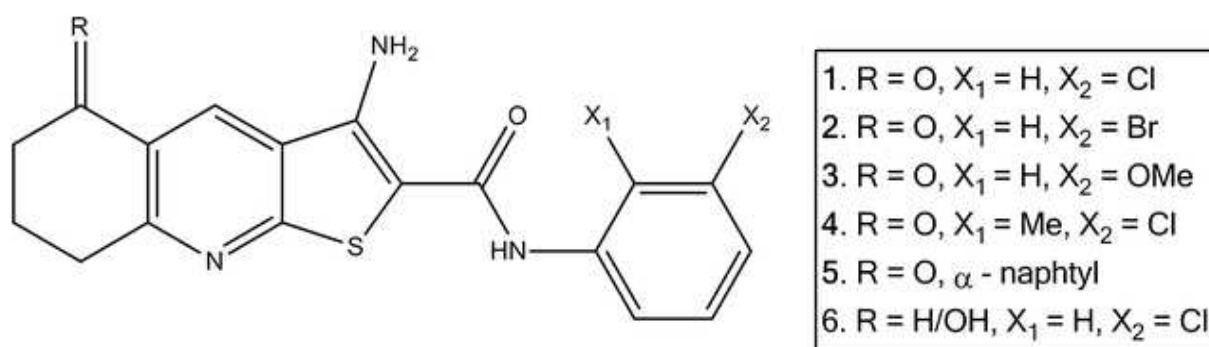
Preuzeto s: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/rak-vrata-maternice-epidemioloski-podaci/>

Datum preuzimanja: 24.9.2023.



## 1.7. Tienopiridinski derivati

Tieno[2,3-*b*]piridini kemijski su spojevi koji pokazuju antiproliferativnu aktivnost, a otkriveni su kao potencijalni inhibitori izoformi fosfolipaze C (PLC) te su pokazali snažne učinke inhibicije rasta staničnih linija ljudskih tumora (33). U istraživanju su korištene četiri stanične linije raka dojke za procjenu učinka šest reprezentativnih tieno[2,3-*b*]piridina (Slika 8). Dodatak derivata 3 u staničnu liniju MDA-MB-231 induciralo je inhibiciju rasta G2/M faze staničnog ciklusa i zaustavljanje ciklusa u G2 fazi. Derivati tieno[2,3-*b*]piridina stupaju u interakcije s izoformama fosfolipaze C, što posljedično utječe na staničnu dinamiku tubulina- $\beta$  i dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa. Nadalje, istraživana je i učinak derivata u kombinaciji s kemoterapeuticima te je dokazano da kombinacija s paklitakselom pokazuje visok stupanj sinergije, dok kombinacije s doksorubicinom i kamptotecinom pokazuju aditivne učinke (33).



**Slika 8.** Strukture tieno[2,3-*b*]piridinskih derivata 1-6

Preuzeto s: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26966420/>

Datum preuzimanja: 27.9.2023.

Matične stanice raka (CSC) i glikosfingolipidi (GSL) imaju važne uloge u patogenezi tumora te je na temelju toga 2022. godine provedeno istraživanje o učinku novosintetiziranog tieno[2,3-*b*]piridinskog derivata (spoj 1) na stanične linije raka dojke MDA -MB-231 i MCF-7. Spoj 1 pokazao je citotoksični učinak kod obje stanične linije, a postotak matičnih stanica bio je značajno niži u staničnoj liniji MDA-MB-231 (34).

Istraživan je utjecaj novorazvijenog derivata na rast i preživljavanje populacije matičnih stanica karcinoma dojke i prostate. Stanične linije MDA-MB-231 i Du-145 inkubirane su samo s derivatom ili u kombinaciji s paklitakselom te je pokazana potencijalna učinkovitost u liječenju karcinoma (35).

Nadalje, provedeno je istraživanje o utjecaju novog derivata, spoja 1, na izražaj CD15 i CD44 na stanicama trostruko negativnog raka dojke te je pokazana potencijalna uloga ovog spoja u liječenju (36).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

## 2.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je odrediti metabolički odgovor stanica humanog karcinoma grlića maternice nakon tretmana tieno[2,3-*b*]piridinskim derivatom (*E*)-3-amino-5-(3-(3-bromfenil)akriloil)-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-6-metiltieno[2,3-*b*]piridin-2-karboksamidom (inhibitor 8).

Učinak inhibitora 8 ispitivat će se na stanicama humanog karcinoma grlića maternice HeLa.

## **2.2. Hipoteza**

Tretman novosintetiziranim tienopiridinskim derivatom (inhibitorom 8) će promijeniti metabolički profil stanica humanog karcinoma grlića maternice HeLa.

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

### 3.1. Stanična linija i novosintetizirani inhibitor

U Tablici 2 prikazani su osnovni podaci o staničnoj liniji HeLa na kojoj su provedena *in vitro* ispitivanja temeljena na djelovanju tieno[2,3-*b*]piridinskog derivata, inhibitora 8. Na Slici 9 vidljiv je mikroskopski prikaz HeLa stanične linije.

#### 3.1.1. HeLa

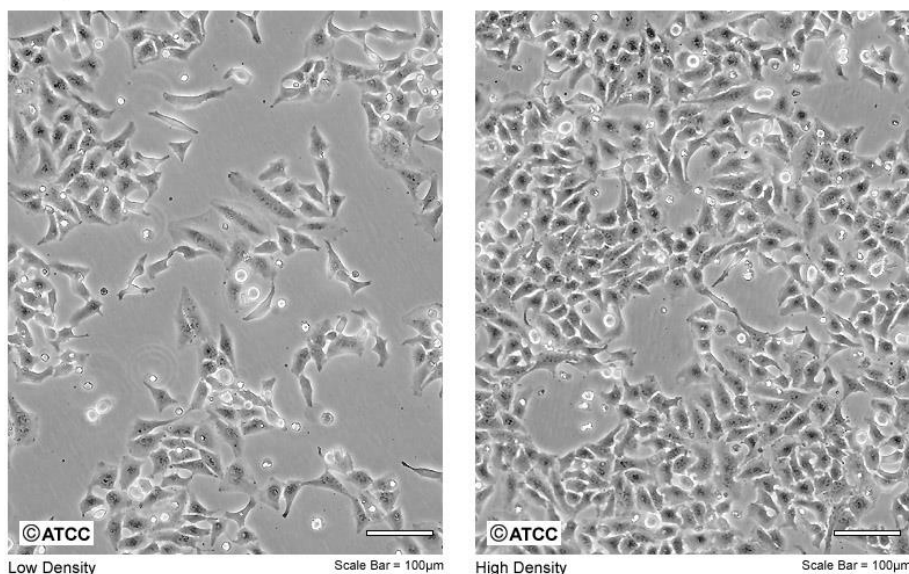
**Tablica 2.** Karakteristike stanične linije HeLa

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

Datum preuzimanja: 28.9.2023.

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

ATCC Number: **CCL-2**  
Designation: **HeLa**



**Slika 9.** Stanice karcinomske linije HeLa

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

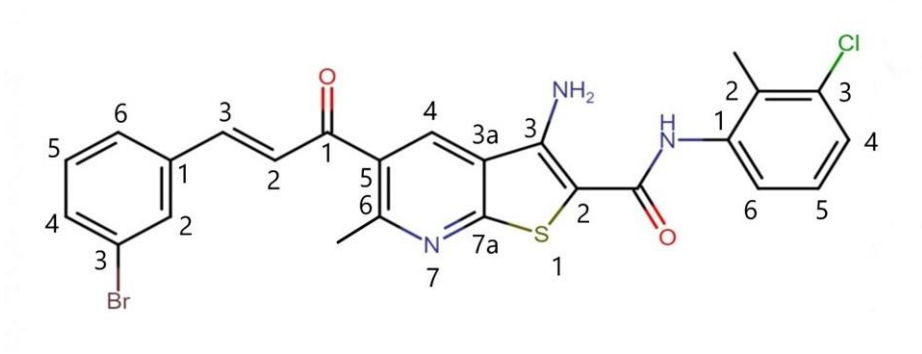
Datum preuzimanja: 28.9.2023.

### 3.2.2. Novosintetizirani inhibitor

Struktura novosintetiziranog inhibitora 8 dobivena je računalnim modeliranjem (Slika 10). Inhibitor 8 pripada skupini derivata tieno[2,3-*b*]piridina, a kemijski naziv mu je (*E*)-3-amino-5-(3-(3-bromfenil)akriloil)-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-6-metiltieno[2,3-*b*]piridin-2-karboksamid. Prethodno je korištenjem MTT testa određena je IC<sub>50</sub> vrijednost (2,14 µM) te su ispitivane stanice tretirane upravo tom koncentracijom.

MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) test je kolorimetrijski test kojim se mjeri metabolička aktivnost živih stanica. Temelji se na enzimskoj redukciji žuto obojene tetrazolijeve soli u formazan intenzivne ljubičasto-plave boje, a kvantificira se spektrofotometrijski (37).





**Slika 10.** 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

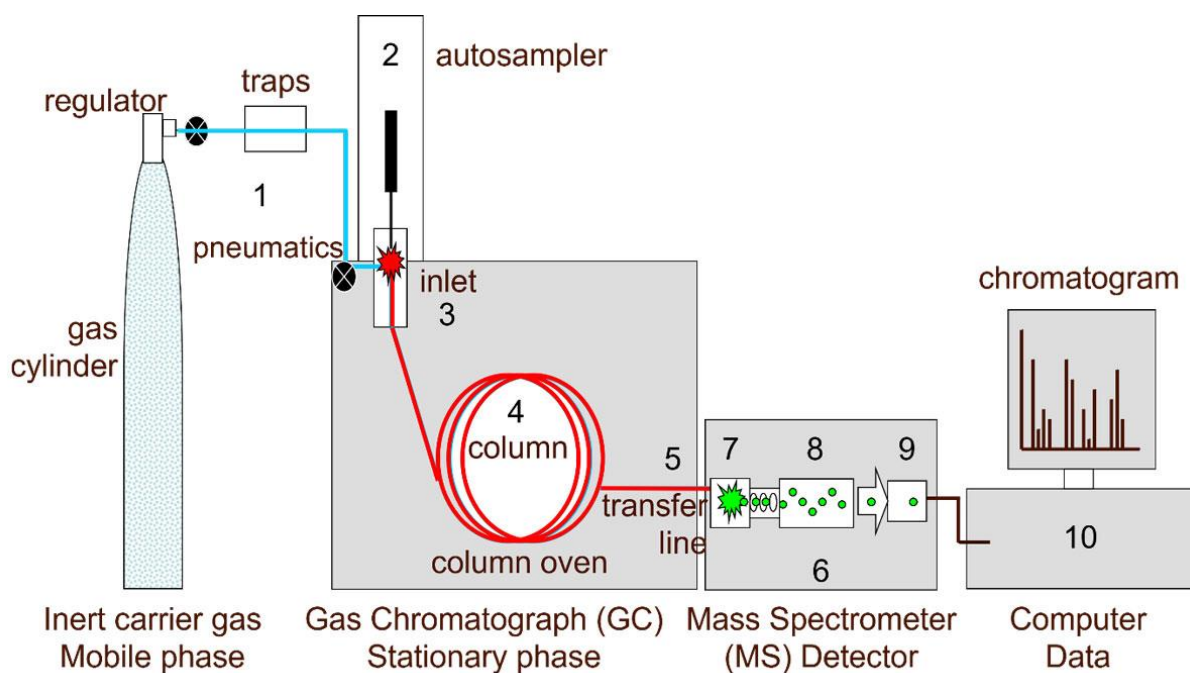
## 3.2. Postupak

Nakon perioda inkubacije stanične linije hranjivi medij se uklanja i stanicama se dodaje 2 mL PBS-a (fosfatni pufer) da bi se uklonio sav medij. Uklanjanje ostatka medija potreban je korak da bi na kraju dobili željene endometabolomske profile. Nakon toga dodaje se 1,5 mL hladnog metanola (1h na  $-80^{\circ}\text{C}$ ) da bi trenutačno zaustavili metabolizam stanica. Sadržaj se prebaci u Falcon tube u koje se onda dodaje 10  $\mu\text{L}$  ribitola kao standarda. Sljedeći korak je sušenje uzoraka dušikom koristeći vakuumski isparivač. Tube se nakon toga ostavljaju na  $-80^{\circ}\text{C}$  do analize.

Kad se uzorci izvade iz zamrzivača potrebno ih je ponovno sušiti vakuumskim isparivačem kako bi osigurali da nema zaostale vode koja bi utjecala na učinkovitost derivatizacije. Uzorke treba otopiti u 15  $\mu\text{L}$  otopine koja se sastoji od 40 mg/mL metoksilamina hidroklorida u piridinu. Uzorci se zatim vorteksiraju 2 min, a onda slijedi inkubacija 90 min na  $30^{\circ}\text{C}$ . Nakon toga se dodaje 50  $\mu\text{L}$  MSTFA+1%TMCS što se onda inkubira 60 min na  $37^{\circ}\text{C}$  za kompletnu derivatizaciju. Slijedi otapanje uzoraka u 100  $\mu\text{L}$  piridina i vorteksiranje 2 min. Uzorci se zatim trebaju centrifugirati (13000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 1 min) u mikrotubama te se prebacuju u mikroinserte za analizu na GC-MS.

### 3.3. GC-MS

Plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (GC-MS) analitička je metoda koja povezuje plinsko-tekućinsku kromatografiju i spektrometriju masa (38). GC-MS je osjetljiva metoda koja se u području metabolomike pokazala kao koristan alat za opsežnu identifikaciju i kvantifikaciju različitih metabolita niske molekulske mase (39). Uzorak se injektira u plinski kromatograf gdje se prevodi u plinovito stanje, a zatim putuje do stacionarne faze u koloni. Svaka komponenta uzorka različitim se afinitetom veže za stacionarnu fazu pa one koje najbrže stupaju u interakciju sa stacionarnom fazom izlaze prve iz kolone. Čimbenik koji također utječe na analizu je temperatura jer se povišenjem temperature brže eluiraju komponente s nižom točkom vrenja. Nakon elucije, razdvojene komponente putuju prema detektoru koji stvara elektronski signal koji se onda prikazuje u kompjuterskom programu u obliku kromatograma s karakterističnim pikovima. Zapis je maseni spektar na kojemu X-os predstavlja omjer mase i naboja ( $m/z$ ) koji je analitički signal, a y-os prikazuje intenzitet signala za svaku komponentu koja je detektirana (38).



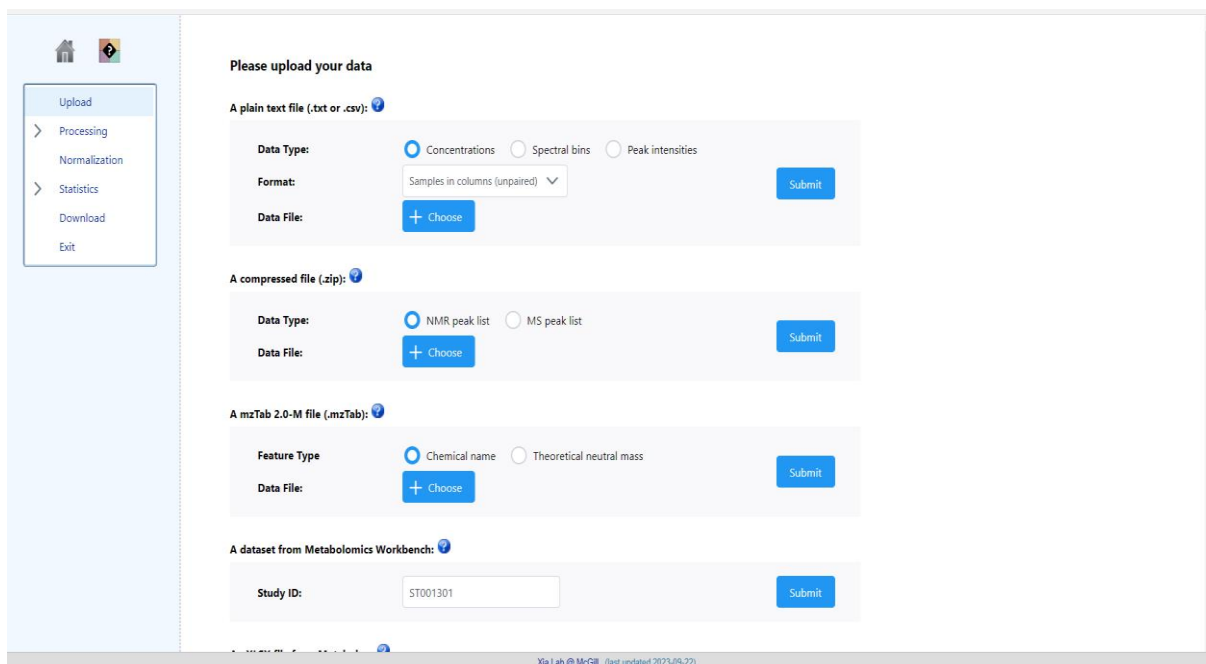
Slika 11. Pojednostavljeni dijagram GC-MS

Preuzeto s: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gc-ms-principle-instrument-and-analyses-and-gc-msms-362513>

Datum preuzimanja: 30.9.2023.

### 3.4. Statistička analiza

Za analizu podataka korištena je platforma MetaboAnalyst koja je namijenjena analizi metabolomičkih podataka. Podaci se na program učitavaju u .csv formatu i to kao nesporeni uzorci poredani u stupce (Slika 12).

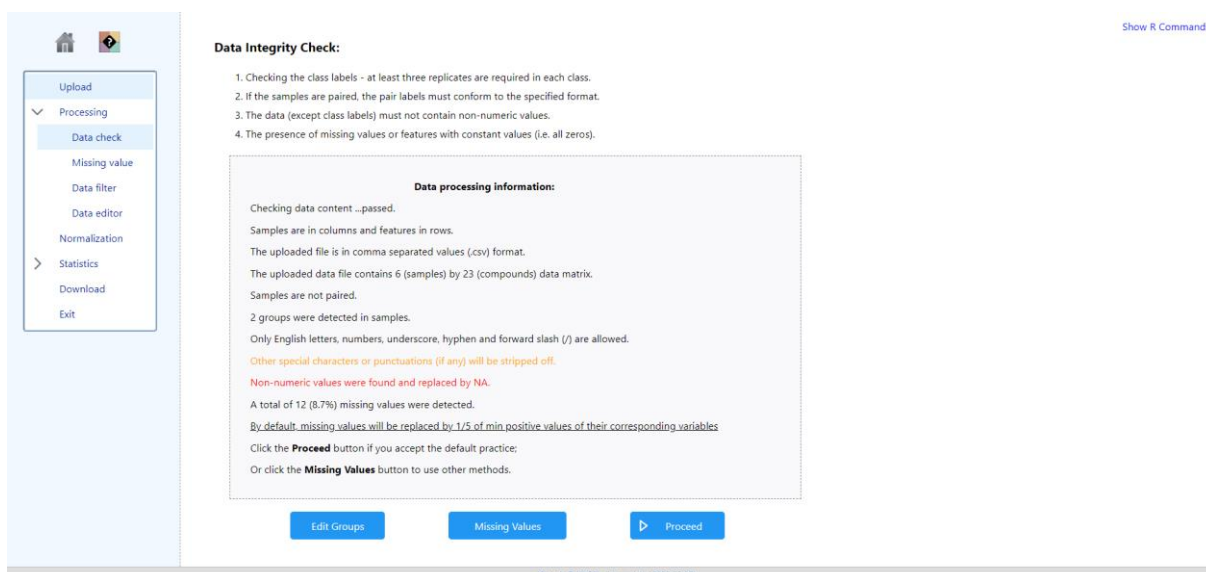


Slika 12. Učitavanje podataka

Preuzeto s: <https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/upload/StatUploadView.xhtml>

Datum preuzimanja: 6.10.2023.

Nakon unosa podataka pritiska se tipka **Submit**, koja onda preusmjerava do dijela za provjeru podataka (Slika 13).

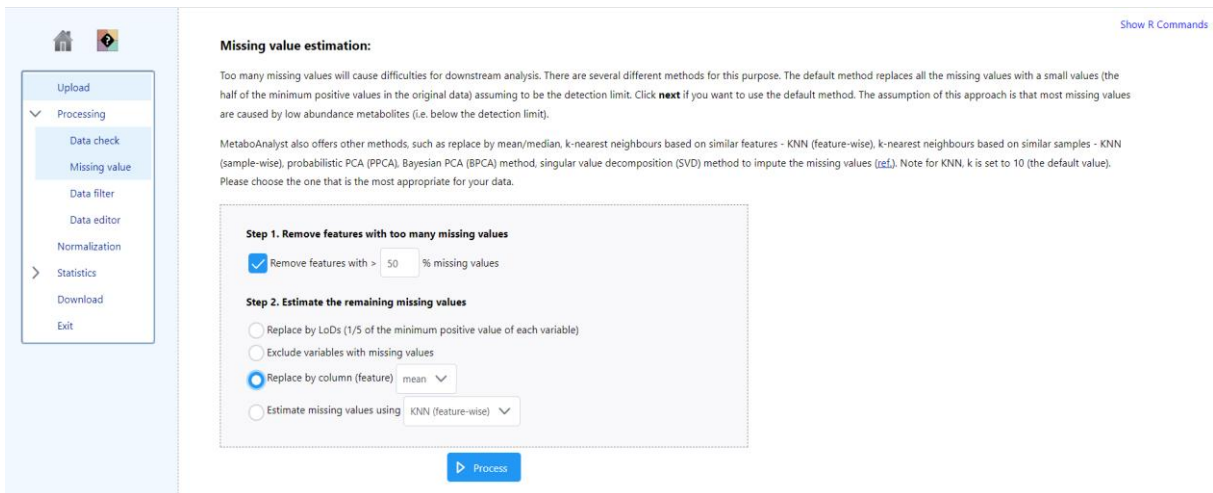


### Slika 13. Provjera unesenih podataka

Preuzeto s: <https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/Secure/process/SanityCheck.xhtml>

Datum preuzimanja: 6.10.2023.

Klikom tipke **Missing Values** postavljen je način procjene vrijednosti koje nedostaju. Podaci kojima nedostaje više od 50% vrijednosti nisu obuhvaćeni analizom (Slika 14).

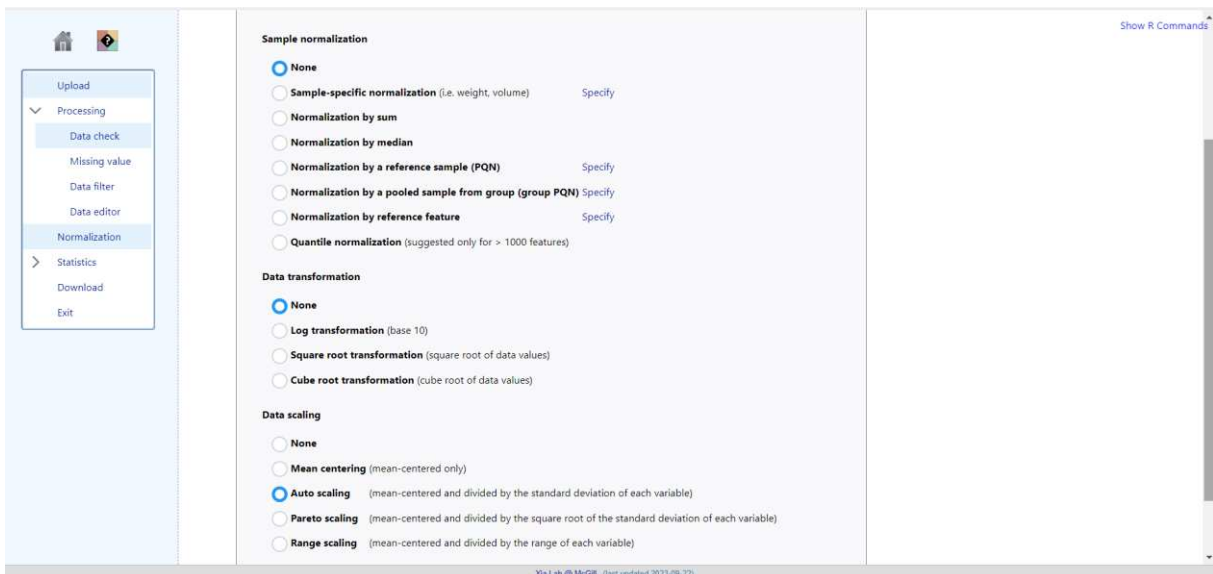


Slika 14. Procjena vrijednosti koje nedostaju

Preuzeto s: <https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/Secure/process/ProcMissing.xhtml>

Datum preuzimanja: 6.10.2023.

Slijedi određivanje parametara za normalizaciju, transformaciju i skaliranje podataka (Slika 15).



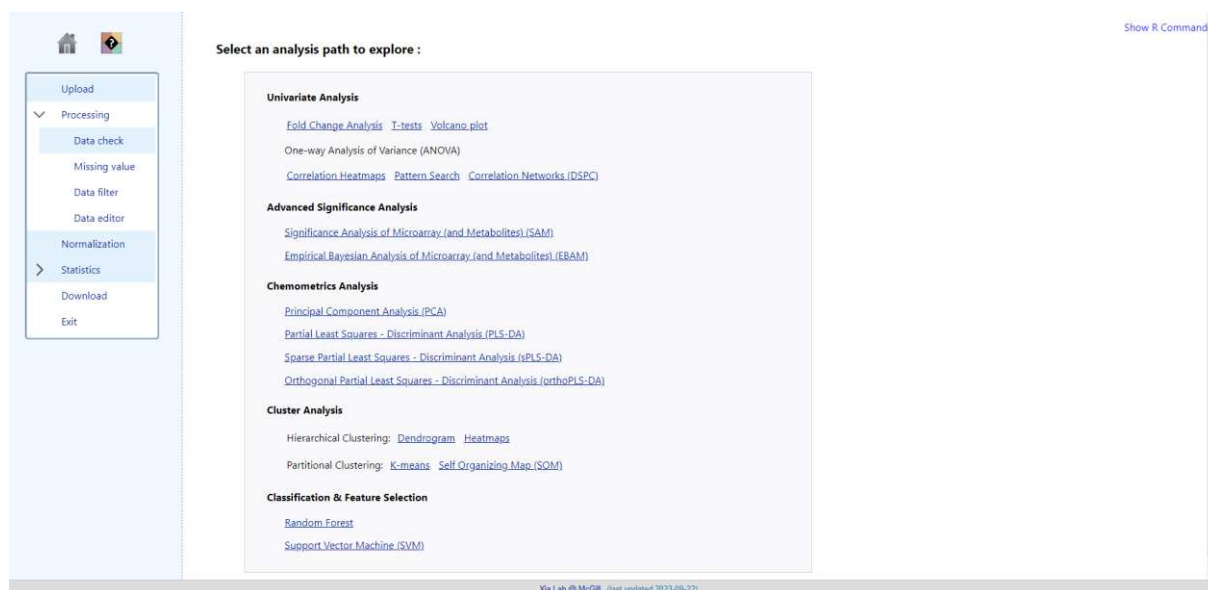
## Slika 15. Normalizacija, transformacija i skaliranje podataka

Preuzeto s:

<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/Secure/process/NormalizationView.xhtml>

Datum preuzimanja: 6.10.2023.

Klikom na tipku **Normalize** i zatim **Proceed** program preusmjerava na dio u kojem je moguće odabrati željene analize (Slika 16).



Slika 16. Statistička analiza podataka

Preuzeto s:

<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/Secure/analysis/AnalysisView.xhtml>

Datum preuzimanja: 6.10.2023.

## **4. REZULTATI**

## 4.1. Identifikacija spojeva

Pomoću GC-MS analize identificirani su spojevi prikazani u Tablici 3. Promatrani su spojevi navedeni u Bazi podataka ljudskog metaboloma (HMDB). Navedeni podaci upisuju se u Excel tablicu u obliku .csv formata koji se onda učitava u program MetaboAnalyst.

**Tablica 3.** Lista identificiranih spojeva u HeLa staničnoj liniji

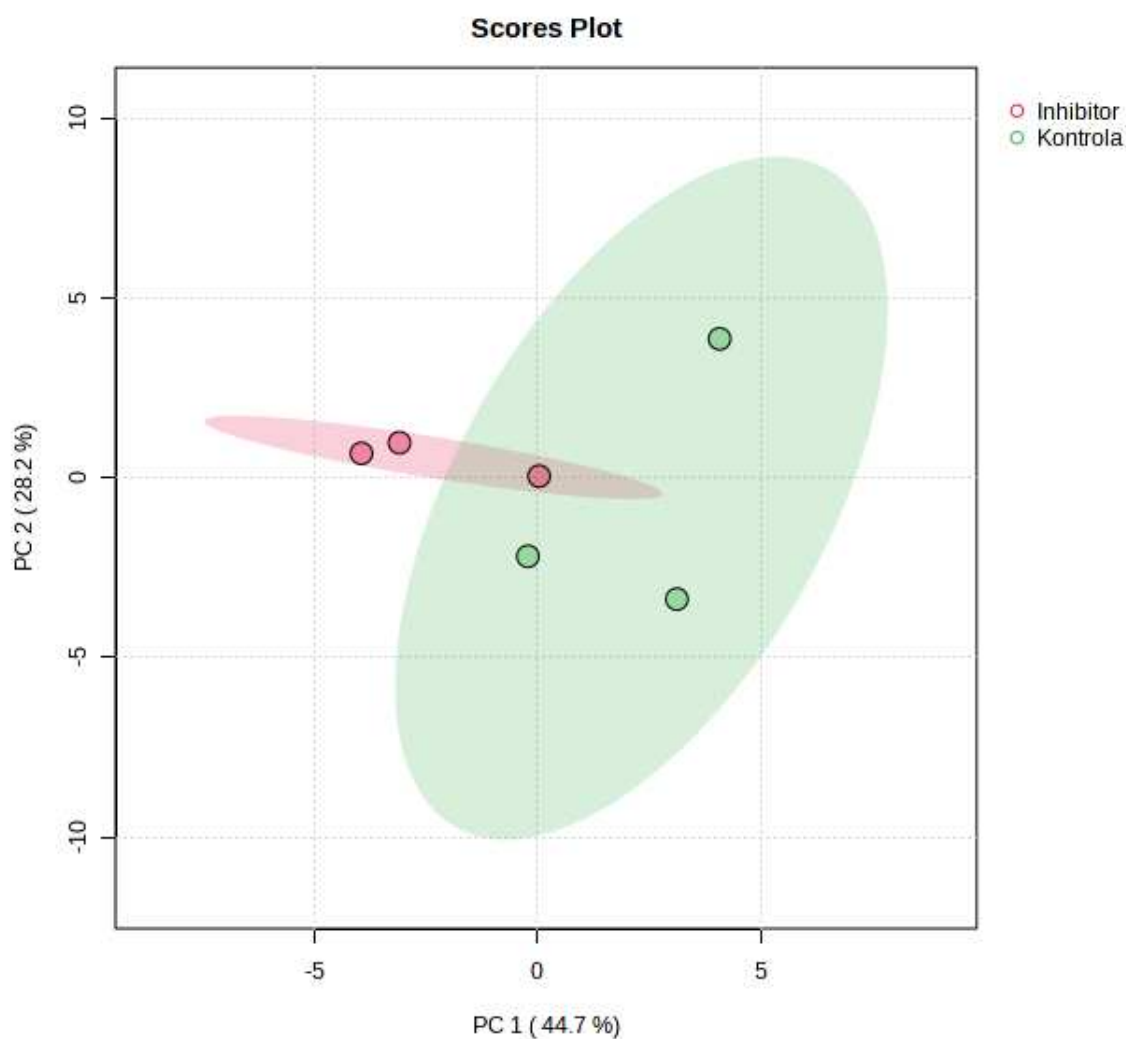
K1	K2	K3	AVG	I1	I2	I3	AVG	
0,20	0,18	0,26	<b>0,21</b>	0,22	0,25	0,28	<b>0,25</b>	PIRUVAT
22,61	15,55	18,40	<b>18,85</b>	16,79	15,71	19,22	<b>17,24</b>	LAKTAT
0,17	0,00	0,00	<b>0,06</b>	0,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>	L-VALIN
0,30	0,00	0,20	<b>0,17</b>	0,34	0,00	0,25	<b>0,20</b>	MASLAČNA KISELINA
0,29	0,00	0,00	<b>0,10</b>	0,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>	GLICIN
14,74	12,90	15,65	<b>14,43</b>	15,63	13,78	14,74	<b>14,71</b>	FOSFAT
0,20	0,00	0,00	<b>0,07</b>	0,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>	TREONIN
1,60	0,17	0,00	<b>0,59</b>	0,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>	GLICIN
0,16	0,16	0,16	<b>0,16</b>	0,19	0,15	0,17	<b>0,17</b>	JANTARNA KISELINA
0,12	0,00	0,11	<b>0,08</b>	0,00	0,09	0,00	<b>0,03</b>	L-ALANIN
0,00	0,11	0,00	<b>0,04</b>	0,14	0,11	0,15	<b>0,13</b>	ERITRITOL
0,46	0,41	0,59	<b>0,49</b>	0,49	0,50	0,54	<b>0,51</b>	L-PROLIN
0,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>	0,00	0,09	0,00	<b>0,03</b>	FENILALANIN
3,27	3,27	3,27	<b>3,27</b>	3,27	3,27	3,27	<b>3,27</b>	RIBITOL
0,13	0,10	0,15	<b>0,13</b>	0,00	0,11	0,40	<b>0,17</b>	NONADEK-1-EN
0,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>	ERITROFURANOZA
0,74	0,34	0,61	<b>0,57</b>	0,70	0,75	0,60	<b>0,68</b>	ERITROFURANOZA
0,20	0,24	0,25	<b>0,23</b>	0,25	0,27	0,26	<b>0,26</b>	DOKOZANOIČNA KISELINA
0,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>	0,10	0,27	0,15	<b>0,17</b>	FRUKTOZA
0,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>	0,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>	GALAKTOZA/GLUKOZA/MANOZA
3,74	3,05	4,85	<b>3,88</b>	3,78	4,64	3,95	<b>4,12</b>	GALAKTOZA/GLUKOZA/MANOZA
0,19	0,25	0,26	<b>0,24</b>	0,25	0,27	0,27	<b>0,26</b>	DIBUTIL FTALAT
0,19	0,17	0,25	<b>0,20</b>	0,19	0,21	0,25	<b>0,22</b>	MANITOL
0,81	0,77	0,76	<b>0,78</b>	0,81	0,83	0,98	<b>0,87</b>	PALMITINSKA KISELINA
0,56	0,46	0,73	<b>0,58</b>	0,70	0,66	0,66	<b>0,67</b>	MIO-INOZITOL
0,88	1,10	1,16	<b>1,05</b>	1,23	1,31	1,14	<b>1,23</b>	OKTADEKAN-1-OL
1,04	0,89	0,83	<b>0,92</b>	0,91	1,04	1,31	<b>1,08</b>	STEARINSKA KISELINA
0,00	0,15	0,00	<b>0,05</b>	0,22	0,19	0,00	<b>0,13</b>	MIRISTINSKA KISELINA
11,21	17,54	11,11	<b>13,29</b>	20,66	16,56	13,22	<b>16,81</b>	MONOPALMITIN
8,16	11,00	9,41	<b>9,53</b>	13,28	11,40	11,08	<b>11,92</b>	GLICEROL MONOSTEARAT
4,17	3,33	4,05	<b>3,85</b>	4,52	4,13	2,25	<b>3,63</b>	KOLESTEROL
0,00	1,24	1,36	<b>0,87</b>	1,76	2,19	2,25	<b>2,06</b>	GLICEROL

K1, K2 i K3 označavaju kontrole, dok I1, I2 i I3 označavaju stanice tretirane inhibitorom 8. U stupcima označenima s AVG pišu aritmetičke sredine, odnosno zbrojevi vrijednosti podijeljenih s brojem vrijednosti.



## 4.2. Analiza glavnih komponenti - PCA

Rezultati PCA (engl. *principal component analysis*) pokazali su da tretman tieno[2,3-b]piridinom uzrokuje metaboličke promjene u staničnoj liniji HeLa. PCA dijagram pokazuje grupiranje tretirane skupine u odnosu na kontrolnu. PC1 čini više od 44,7% varijacije podataka u staničnoj liniji HeLa (Slika 17).



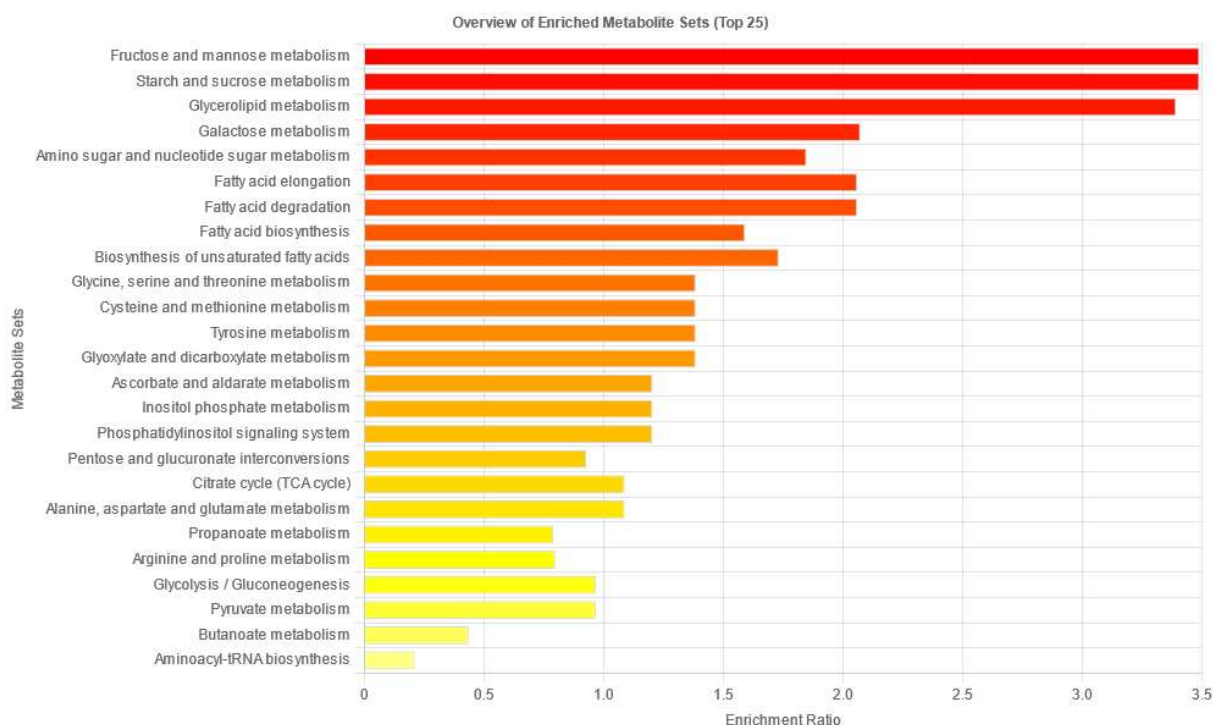
**Slika 17.** Analiza glavnih komponenti metaboličkog profila HeLa stanične linije nakon tretiranja s tieno[2,3-b]piridinom, PC – (engl. *Principal Component*)

Preuzeto s: <https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/Secure/analysis/PCAView.xhtml>

Datum preuzimanja: 8.10.2023.

### 4.3. Analiza kvantitativnog obogaćivanja

Analiza kvantitativnog obogaćivanja koristi se za identifikaciju obrazaca koncentracija metabolita i daje uvid u moguće biološke mehanizme. Rezultati se smatraju statistički značajnima kada je  $p < 0,05$ . Rezultati analize pokazuju da tretman stanica tieno[2,3-b]piridinom ima najveći učinak na metabolizam šećera (fruktoza, manoz, škrob i saharoza) i glicerolipida (Slika 18).



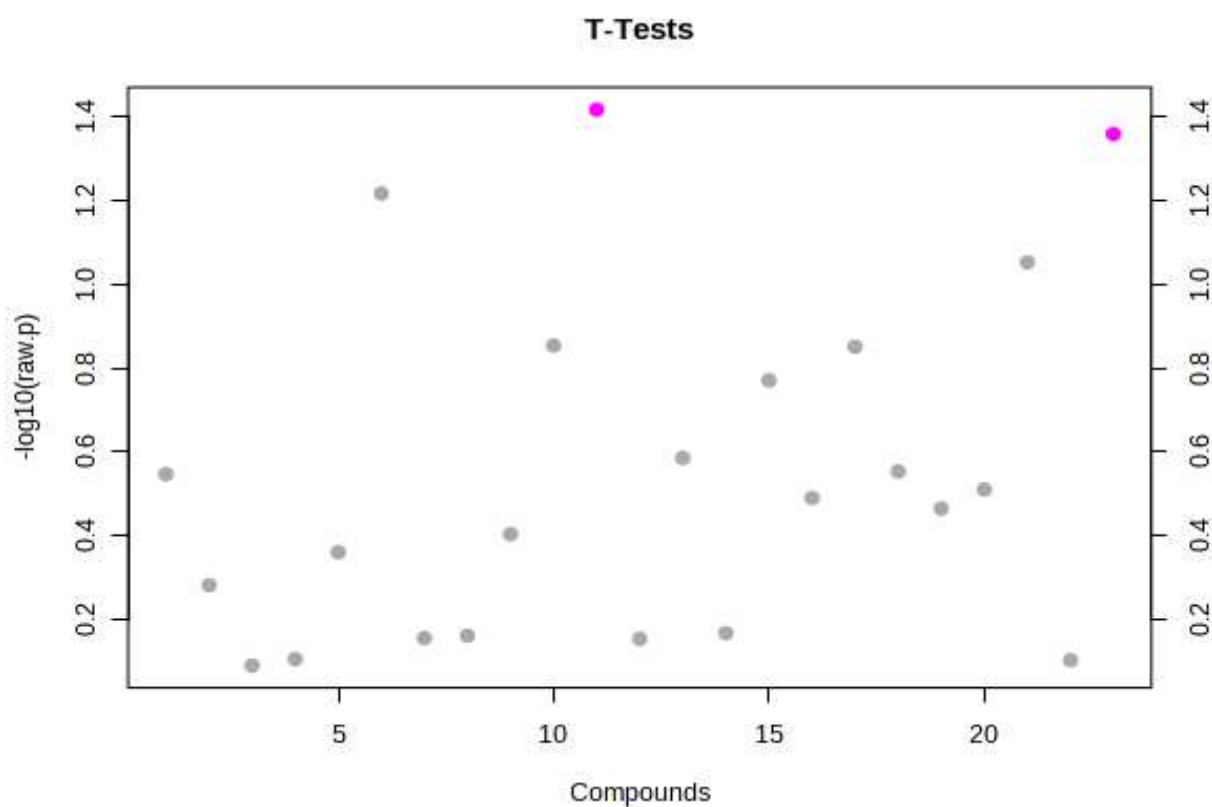
**Slika 18.** Analiza obogaćivanja seta metabolita HeLa stanica nakon tretiranja s tieno[2,3-b]piridinom

Preuzeto s: <https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/Secure/enrichment/OeaView.xhtml>

Datum preuzimanja: 8.10.2023.

## 4.4. T-test

T-test je statistički test usporedbe. Prag p-vrijednosti postavljen je na 0.05 te je dobiven grafički prikaz (Slika 19). Jedina dva spoja koja su pokazala statističku razliku su fruktoza i glicerol.



**Slika 19.** T-test metabolita HeLa stanica nakon tretiranja s tieno[2,3-b]piridinom

Preuzeto s: <https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/Secure/analysis/TtestView.xhtml>

Datum preuzimanja: 8.10.2023.

## **5. RASPRAVA**

Rak predstavlja vodeći uzrok smrti diljem svijeta. Na globalnoj razini 2020. godine zabilježeno je 19,3 milijuna novih slučajeva raka i gotovo 10 milijuna smrtnih ishoda. Kod žena je najčešće dijagnosticiran rak dojke s procijenjenih 2,3 milijuna (11,7%) novih slučajeva, a slijede ga rak pluća (11,4%), kolorektalni rak (10,0%), rak prostate (7,3%) i želudca (5,6%). Rak pluća ostao je vodeći uzrok smrti od raka sa zabilježenih 1,8 milijuna smrti. Stope smrtnosti od raka dojke i grlića maternice kod žena bile su znatno više u zemljama u tranziciji. Do 2040. godine očekuje se porast incidencije karcinoma za 47%, stoga je za globalnu kontrolu bolesti ključno širenje mjera za prevenciju raka i pružanje adekvatne skrbi u zemljama u tranziciji (31).

Za sprječavanje nastanka raka potrebne su mjere prevencije zloćudne bolesti koje obuhvaćaju otklanjanje uzročnih čimbenika kao što su pušenje duhana, prekomjerna tjelesna težina i pretilost te infekcija humanim papiloma virusom (40). Za sprječavanje raka grlića maternice ključno je izvođenje PAPA-testa odnosno obavljanje redovitih ginekoloških pregleda čak i nakon primljenog cjepiva protiv HPV-a (20).

Skupina tieno[2,3-*b*]piridina otkrivena je virtualnim probirom visoke propusnosti te su se pokazali kao potencijalni inhibitori izoformi fosfolipaze C (PLC). Pokazali su učinak na više molekularnih meta kao što su receptori vezani za G proteine, receptori P2Y12, fosfolipazu C- $\delta$ 1 i drugi. Dokazan je citotoksični učinak na različite stanične linije ljudskog karcinoma (33-36).

Predmet ovog istraživanja bio je odrediti metabolički odgovor stanica humanog karcinoma grlića maternice nakon tretmana tieno[2,3-*b*]piridinskim derivatom (*E*)-3-amino-5-(3-(3-bromfenil)akriloil)-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-6-metiltieno[2,3-*b*]piridin-2-karboksamidom (inhibitor 8). MTT testom utvrđena je IC50 koncentracija tieno[2,3-*b*]piridinskog derivata kojom su kasnije tretirane stanice, a iznosila je 2,14  $\mu$ M. Uzorci su analizirani GC-MS metodom te su rezultati provedeni kroz program MetaboAnalyst koji obrađuje dobivene metabolomičke podatke. Iz rezultata PCA analize vidi se grupiranje tretiranih u odnosu na kontrolne stanice, odnosno vidimo da stanice nisu metabolički iste. Kvantitativna analiza obogaćivanja prikazuje koji su metabolički putevi promijenjeni te se iz slikovnog prikaza može zaključiti da tretman stanica inhibitorom 8 ima najveći učinak na metabolizam šećera (fruktoza, manoz, škrob i saharoza) i glicerolipida. T-testom utvrđeno je da su metaboliti fruktoza i glicerol jedini pokazali statistički značajnu razliku.

Ovim rezultatima potvrđena je glavna hipoteza i ostvaren cilj istraživanja te je pokazan mogući potencijal inhibitora 8 u liječenju karcinoma. U konačnici možemo zaključiti da je potrebno provesti dodatna *in vitro* i *in vivo* istraživanja koji bi doveli do uvrštavanja tienopiridinskih derivata u terapiju.

U svakom istraživanju postoje određena ograničenja, a u ovom slučaju to je bilo korištenje samo jedne stanične linije.

## **6. ZAKLJUČAK**

- a) *In vitro* izlaganja stanica karcinoma grlića maternice stanične linije HeLa tieno [2,3-*b*]piridinskom derivatu (inhibitor 8) dovodi do promjene metaboličkog profila.
- b) PCA analizom pokazano je da tretiranje stanica inhibitorom 8 uzrokuje metaboličke promjene.
- c) Kvantitativna analiza obogaćivanja pokazuje da se najveća promjena dogodila u metabolizmima šećera i glicerolipida.
- d) T-testom utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji metabolita fruktoze i glicerola između tretiranih i netretiranih stanica.



## **7. LITERATURA**

1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. pp. 149-151.
2. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Biologija raka U: Raič A.,ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp. 3.
3. Geofrey M. Cooper, R.E.Hausman; Rak. U: Gordan Lauc, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp. 726-728.
4. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. pp. 164.
5. Geofrey M. Cooper, R.E.Hausman; Rak. U: Gordan Lauc, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp. 730-734.
6. Geofrey M. Cooper, R.E.Hausman; Rak. U: Gordan Lauc, urednik. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. pp. 729.
7. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Biologija raka U: Raič A.,ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. pp. 4.
8. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. pp. 183-184.
9. 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. pp. 7.
10. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. pp. 185-187.
11. 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; 2018. pp. 8–11.
12. <https://necurak.hzjz.hr/za-zene/rak-vrata-maternice/> ,datum pristupa: 21.9.2023.
13. 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. pp. 177.
14. Hu Z, Ma D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. Cancer Med. 2018;7:5217-5236.

15. Malla R, Kamal MA. E6 and E7 Oncoproteins: Potential Targets of Cervical Cancer. *Curr Med Chem.* 2021;28:8163-81.
16. Rezende MT, Bianchi AGC, Carneiro CM. Cervical cancer: Automation of Pap test screening. *Diagn Cytopathol.* 2021;49:559-74.
17. Burmeister CA, Khan SF, Schäfer G, Mbatani N, Adams T, Moodley J i sur. Cervical cancer therapies: Current challenges and future perspectives. *Tumour Virus Res.* 2022;13:200238.
18. Rosalik K, Tarney C, Han J. Human Papilloma Virus Vaccination. *Viruses.* 2021;13:1091.
19. Farmer E, Cheng MA, Hung CF, Wu TC. Vaccination Strategies for the Control and Treatment of HPV Infection and HPV-Associated Cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2021;217:157-95.
20. HPV infekcija – simptomi, liječenje i cijepljenje [Internet]. [pristupljeno 22.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/10129/HPV-infekcija-simptomi-lijecenje-i-cijepljenje.html#13203>
21. 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. pp. 178.
22. Burness JV, Schroeder JM, Warren JB. Cervical Colposcopy: Indications and Risk Assessment. *Am Fam Physician.* 2020;102:39-48.
23. 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. p. 179.
24. Poddar P, Maheshwari A. Surgery for cervical cancer: consensus & controversies. *Indian J Med Res.* 2021;154:284-292.
25. Li X, Xia L, Chen X, Fu Y, Wu X. Simple conization and pelvic lymphadenectomy in early-stage cervical cancer: A retrospective analysis and review of the literature. *Gynecol Oncol.* 2020;158:231-235.
26. Brandt B, Levin G, Leitao MM Jr. Radical Hysterectomy for Cervical Cancer: the Right Surgical Approach. *Curr Treat Options Oncol.* 2022;23:1-14.
27. Röseler J, Wolff R, Bauerschlag DO, Maass N, Hillemanns P, Ferreira H i sur. Challenges and Controversies in the Surgical Treatment of Cervical Cancer: Open Radical Hysterectomy versus Minimally Invasive Radical Hysterectomy. *J Clin Med.* 2021;10:3761.

28. 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. pp. 179-180.
29. Cohen AC, Roane BM, Leath CA 3rd. Novel Therapeutics for Recurrent Cervical Cancer: Moving Towards Personalized Therapy. *Drugs*. 2020;80:217-227.
30. World Health Organisation - Cervical cancer [Internet]. [pristupljeno 24.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer#:~:text=Overview,-%20and%20middle-income%20countries>
31. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A 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.
32. Rak vrata maternice – epidemiološki podaci [Internet]. [pristupljeno 24.9.2023.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevenција-nezaraznih-bolesti/rak-vrata-maternice-epidemioloski-podaci/>
33. Reynisson J, Jaiswal JK, Barker D, D'mello SA, Denny WA, Baguley BC 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.
34. Pervan M, Marijan S, Markotić A, Pilkington LI, Haverkate NA, Barker D i sur. Novel Thieno [2,3-*b*]pyridine Anticancer Compound Lowers Cancer Stem Cell Fraction Inducing Shift of Lipid to Glucose Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2022;23:11457.
35. Mastelić A, Čikeš Čulić V, Režić Mužinić N, Vuica-Ross M, Barker D, Leung EY i sur. 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.
36. 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<sup>+</sup> Breast Cancer Cells. *Medicines (Basel)*. 2021;8:32.
37. Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria - A review. *Acta Histochem*. 2018;120:303-311.
38. Perković A. Kvantitativno određivanje fenola iz uzoraka krvi i mokraće primjenom GC-MS metode [Diplomski rad]. Split: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet; 2018 [pristupljeno 29.9.2023.]. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:235952>
39. Papadimitropoulos MP, Vasilopoulou CG, Maga-Nteve C, Klapa MI. Untargeted GC-MS Metabolomics. *Methods Mol Biol*. 2018;1738:133-147.

40. Soerjomataram I, Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020-2070. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18:663-72.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** Cilj istraživanja bio je odrediti metabolički odgovor stanica humanog karcinoma grlića maternice nakon tretmana tieno[2,3-*b*]piridinskim derivatom (*E*)-3-amino-5-(3-(3-bromfenil)akriloil)-*N*-(3-kloro-2-metilfenil)-6-metiltieno[2,3-*b*]piridin-2-karboksamidom (inhibitor 8).

**Materijali i metode:** Prethodno je korištenjem MTT testa određena IC50 vrijednost inhibitora 8 (2,14 μM) te su tom koncentracijom tretirane stanice humanog karcinoma grlića maternice HeLa. Kontrolne stanice su inkubirane u samom mediju. Nakon 48h napravljena je derivatizacija staničnog metaboloma te su uzorci analizirani pomoću plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS). Ribitol je korišten kao standard. Za analizu podataka korištena je platforma MetaboAnalyst te statistička obrada T-testom, uz prag p-vrijednosti od 0,05. Rezultati su prikazani tablično i grafički pomoću PCA usporedbe (analiza glavnih komponenti, od engl. *principal component analysis*).

**Rezultati:** Provedeni su analiza glavnih komponenata(PCA), analiza kvantitativnog obogaćivanja i T-test te su rezultati prikazani grafički. PCA analizom pokazano je da tretiranje stanica inhibitorom 8 uzrokuje metaboličke promjene. Kvantitativna analiza obogaćivanja pokazuje da se najveća promjena dogodila u metabolizmima šećera i glicerolipida. T-testom utvrđen je statistički značajna razlika u koncentraciji metabolita fruktoze i glicerola između tretiranih i netretiranih stanica.

**Zaključci:** *In vitro* izlaganje stanične linije humanog karcinoma grlića maternice HeLa tieno[2,3-*b*]piridinskom derivatu dovodi do metaboličkih promjena. Tretiranje karcinomskih stanica tieno[2,3-*b*]piridinskim derivatom moglo bi predstavljati novi terapijski pristup liječenja, stoga su potrebna daljnja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja kako bi se potvrdilo djelovanje.

## **9. SUMMARY**



**Diploma theses title:** Analysis of metabolites of human cervical carcinoma cells after treatment with a thienopyridine derivative

**Objectives:** The aim of the research was to determine the metabolic response of human cervical cancer cells after treatment with 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).

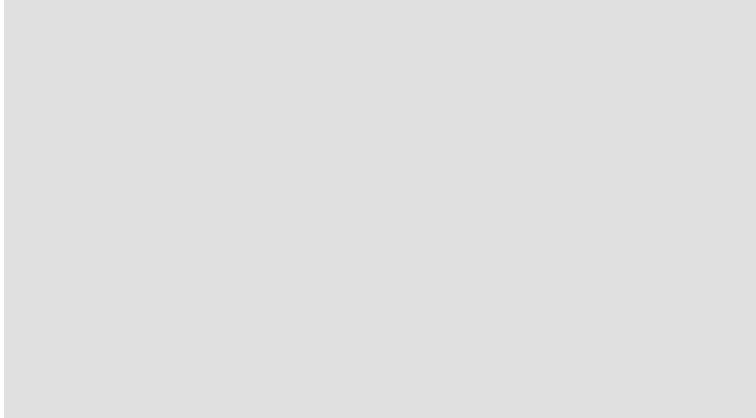
**Materials and methods:** Previously, the IC<sub>50</sub> value of inhibitor 8 (2,14 μM) was determined using the MTT test, and HeLa human cervical carcinoma cells were treated with this concentration. Control cells were incubated in the medium itself. After 48h the cellular metabolome was derivatized and the samples were analyzed using gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS). Ribitol was used as a standard. The MetaboAnalyst platform was used for data analysis and statistical processing with the T-test, with a p-value threshold of 0,05. The results are presented tabularly and graphically using PCA comparison (principal component analysis).

**Results:** Principal component analysis (PCA), quantitative enrichment analysis and T-test were performed and the results were presented graphically. PCA analysis showed that treatment of cells with inhibitor 8 causes metabolic changes. Quantitative enrichment analysis shows that the greatest change occurred in sugar and glycerolipid metabolisms. The t-test showed a statistically significant difference in the concentration of fructose and glycerol metabolites between treated and untreated cells.

**Conclusions:** *In vitro* exposure of the human cervical carcinoma cell line HeLa to a thieno[2,3-b]pyridine derivative leads to metabolic changes. Treatment of cancer cells with a thieno[2,3-b]pyridine derivative could represent a new therapeutic approach, therefore further *in vitro* and *in vivo* studies are needed to confirm the effect.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODACI:**



## **OBRAZOVANJE:**

- 2006. – 2014. Osnovna škola Dinka Šimunovića, Hrvace
- 2014. – 2018. Opća gimnazija “Marko Marulić”, Split
- 2018. – 2023. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, studij Farmacija
- Veljača 2023. – Kolovoz 2023. – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Brda

## **RADNO ISKUSTVO:**

- Svibanj 2020. – veljača 2023. Ispomoć u proizvodnji – Ljekarne Splitsko-dalmatinske županije, Galenski laboratorij

## **POSEBNE VJEŠTINE:**

**Rad na računalu:** MS Office, Eskulap 2000

**Strani jezici:** engleski jezik - C2 razina

**Vozačka dozvola:** B kategorija