

# Procjena antiproliferativne aktivnosti novosintetiziranih benzotiazola kao aktivatora apoptoze

---

Živatović, Karlo

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:621397>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Karlo Živatović**

**PROCJENA ANTIPROLIFERATIVNE  
AKTIVNOSTI NOVOSINTETIZIRANIH  
BENZOTIAZOLA KAO AKTIVATORA  
APOPTOZE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Karlo Živatović**

**PROCJENA ANTIPROLIFERATIVNE  
AKTIVNOSTI NOVOSINTETIZIRANIH  
BENZOTIAZOLA KAO AKTIVATORA  
APOPTOZE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

Rad je ostvaren u Laboratoriju za kulturu tkiva i funkcionalnu genomiku pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: prof. dr. sc. Ljubica Glavaš-Obrovac.

Rad ima 30 listova, 2 tablice i 5 slika.

## **Zahvala**

*Želim prije svega zahvaliti svojim roditeljima koji su na ovom putovanju bili sa mnom od samoga početka i koji su mi bili ogromna podrška.*

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac na pruženoj prilici u sudjelovanju u ovom istraživanju.*

*Zahvaljujem se doc. dr. sc. Marijani Jukić na svom utrošenom vremenu i strpljenju.*

*Zahvaljujem Geri na fantastičnom poslu sa slikama. Spasio si me.*

*Hvala mojim kolegama i prijateljima s fakulteta koji su me bodrili sve ove godine i hvala mojoj djevojci koja mi je bila najveća podrška.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Stanični ciklus.....	1
1.1.1. Regulacija staničnog ciklusa i kontrolne točke .....	1
1.2. Apoptoza.....	2
1.2.1. Vanjski put apoptoze.....	3
1.2.2. Mitohondrijski put apoptoze .....	3
1.3. Rak.....	4
1.3.1. Vrste raka .....	4
1.3.2. Nastanak i uzroci raka .....	5
1.3.3. Terapija raka.....	6
1.4. Benzotiazol i njegovo terapijsko djelovanje.....	6
2. HIPOTEZA .....	8
3. CILJ RADA .....	9
4. MATERIJAL I METODE .....	10
4.1. Ustroj studije.....	10
4.2. Materijali .....	10
4.2.1. Derivati benzotiazola.....	10
4.2.2. Stanične linije.....	10
4.2.3. Kemikalije .....	10
4.3. Metode .....	11
4.3.1. Uzgoj i održavanje stanica <i>in vitro</i> .....	11
4.3.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi .....	12
4.3.3. Priprema stanica i tretman.....	13

4.3.4.	Detekcija apoptoze .....	13
4.3.5.	Određivanje promjene u mitohondrijskom potencijalu.....	14
4.3.6.	Analiza stanica protočnom citometrijom .....	14
4.3.7.	Statističke metode .....	14
5.	REZULTATI.....	15
5.1.	Proapoptotski učinak derivata benzotiazola .....	15
5.2.	Promjene u mitohondrijskom potencijalu tretiranih stanica.....	17
6.	RASPRAVA .....	20
7.	ZAKLJUČAK .....	23
8.	SAŽETAK .....	24
9.	SUMMARY .....	25
10.	LITERATURA.....	26
11.	ŽIVOTOPIS .....	30

## POPIS KRATICA

ATP – adenzin trifosfat, engl. *adenosine triphosphate*,

BCL-2 – B – stanični limfom 2 protein, engl. *B-cell lymphoma 2*,

CDK – ciklin ovisne kinaze, engl. *cyclin-dependent kinases*,

DMSO – dimetil sulfoksid, engl. *dimethyl sulfoxide*,

DNK – deoksiribonukleinska kiselina, engl. *deoxyribonucleic acid*,

FBS – fetalni goveđi serum, engl. *fetal bovine serum*,

FITC – fluorescein izotiocijanat, engl. *fluorescein isothiocyanate*,

HEPES – 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etanesulonična kiselina, engl. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*,

JC-1 – 5,5,6,6-tetraklor-1,1,3,3-tetraetil-benzimidazolkarboksianin jodid, engl. *5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethyl-benzimidazolcarbocyanine iodide*,

PBS – fosfatom puferirana otopina soli, engl. *phosphate-buffered saline*,

PI – propidij jodid engl. *propidium iodide*,

TME - tumorski mikrokoliš, engl. *tumor microenvironment*,

TNF – faktori tumorske nekroze, engl. *tumor necrosis factor*.



# UVOD

## 1. UVOD

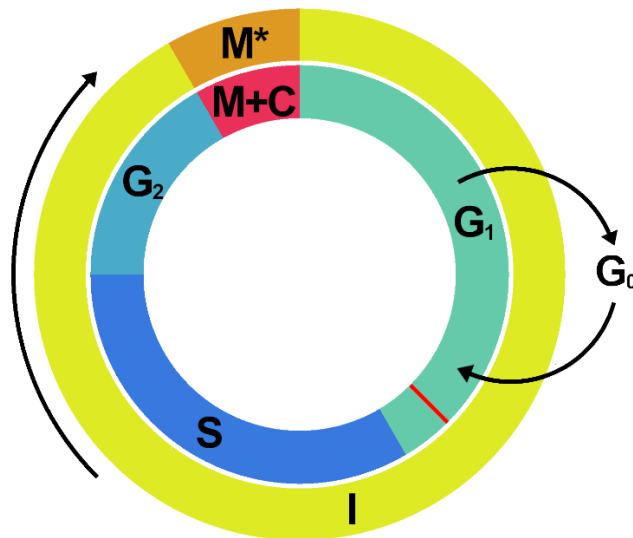
### 1.1. Stanični ciklus

Stanični ciklus predstavlja skupinu događaja koji, svojim normalnim i kontroliranim odvijanjem, omogućuju fiziološku funkciju najmanjoj i osnovnoj strukturnoj jedinici organizma, stanici. Svi događaji koji se odvijaju u tom ciklusu mogu se podijeliti u četiri zasebne faze koje zajedno omogućuju replikaciju deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNK), podjelu stanice, raspodjelu udvostručenih kromosoma novonastalim stanicama te stanični rast (1). Od iznimne je važnosti da se faze staničnog ciklusa, nazvane G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> i M, odvijaju točno određenim redoslijedom kako bi novonastale stanice bile strukturno i funkcionalno normalne (Slika 1.). Glavnu ulogu u tome imaju regulatorne molekule staničnog ciklusa kao što su izvanstanični faktori rasta, grupa evolucijski očuvanih enzima koji se nazivaju ciklin ovisne kinaze (engl. *cyclin-dependent kinases*, CDK) koje potiču napredovanje kroz određene regulatorne točke staničnog ciklusa, kao i inhibitori staničnog ciklusa koji zaustavljaju stanični ciklus uslijed oštećenja staničnih organela ili izvanstaničnih signala (2, 3).

#### 1.1.1. Regulacija staničnog ciklusa i kontrolne točke

Za normalnu funkciju i rast stanica potrebna je potpuna regulacija tijekom staničnog ciklusa te kontrola provedenih faza na određenim kontrolnim točkama pomoću različitih molekularnih mehanizama koji, u fiziološkim uvjetima, osiguravaju zaustavljanje staničnog ciklusa, provjeru pravilno provedene replikacije DNK te popravak iste u slučaju oštećenja (4, 5). Dugotrajno izlaganje karcinogenim tvarima može dovesti do mutacije protoonkogenih i tumor supresorskih gena, a time i nemogućnosti zaustavljanja staničnog ciklusa od strane njihovih proteinskih produkata. Prethodno navedeno ima za posljedicu poremećaj u kontroli tijekom staničnog ciklusa te nekontroliranog rasta i diobe stanice. Takve stanice ne mogu pokrenuti apoptozu, programiranu staničnu smrt koja ujedno predstavlja najvažniju obranu organizama od tumorskih bolesti kao jednih od najčešćih uzročnika smrti u suvremenom svijetu (6, 7).

## UVOD



**Slika 1.** Faze staničnog ciklusa. Stanični ciklus se sastoji od četiri zasebne faze. G<sub>1</sub> faza predstavlja vrijeme između mitoze i replikacije deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNK) u kojoj se odvija stanični rast i niz metaboličkih procesa. U ovoj fazi se nalazi najvažnija kontrolna točka staničnog ciklusa životinjskih stanica nazvana restriksijska točka u kojoj se kontrolira prolazak u iduću fazu u ovisnosti o faktorima rasta. Ukoliko nema dovoljno izvanstaničnih faktora rasta, stanica ulazi u G<sub>0</sub> fazu koja je znana kao faza mirovanja. U toj se fazi stanica ne dijeli, ali je metabolički aktivna sve dok je na izlazak iz te faze ne potaknu izvanstanični signali. Nakon G<sub>1</sub> faze slijedi S faza u kojoj se zbiva replikacija DNK. Stanica nastavlja rasti i sintetizirati potrebne proteine u G<sub>2</sub> fazi nakon koje slijedi mitozna faza, faza u kojoj se novosintetizirana DNK raspodjeljuje u dvije novosintetizirane jezgre i citokineza, faza u kojoj nastaju dvije stanice-kćeri s diploidnim setom kromosoma. Svega 5 % staničnog ciklusa čini mitozna i citokineza koji su dio M\* faze staničnog ciklusa, dok 95 % ciklusa čine G<sub>1</sub>, S i G<sub>2</sub> faza koji su dio interfaze. **Legenda:** G<sub>1</sub>, G<sub>0</sub>, S i G<sub>2</sub> – faze staničnog ciklusa, M – mitozna, C – citokineza, I – interfaza, M\* - faza staničnog ciklusa sastavljena od mitoze i citokineze, crvena linija – restriksijska kontrolna točka. Izradio autor.

### 1.2. Apoptoza

Apoptoza predstavlja programiranu staničnu smrt koja se, za razliku od nekroze, odvija kao o ATPu-ovisni put i fiziološki je dio života stanice. Događa se kontinuirano tijekom odrastanja i starenja održavajući homeostazu u populaciji normalnih stanica te služi kao obrambeni mehanizam kod patoloških stanja kada su stanice ili genetički materijal nepovratno oštećeni. Karakterizirana je određenim morfološkim promjenama u strukturi stanice kao što su kondenzacija kromatina, cijepanje DNK djelovanjem endonukleaza i tzv. „pupanje“ stanice te je ovisna o djelovanju specifičnih enzima ili hormona kao što su kortikosteroidi, ali može biti izazvana i djelovanjem

## UVOD

kemoterapeutskih lijekova koji izazivaju oštećenje DNK (8, 9). Još jedna bitna razlika u odnosu na nekrozu je ta što se oštećene stanice uklanjaju uz vrlo malo oštećenje okolnog tkiva, dok u nekrozi dolazi do ispuštanja unutarstaničnog sadržaja u izvanstanični prostor što izaziva puno veću štetu u tkivu. Pri fiziološkim uvjetima normalno funkcioniranje stanice ovisi o njenom prolasku kroz faze staničnog ciklusa, koji ovisi o međustaničnom komuniciranju i izvanstaničnim signalima koji su potrebni za njeno preživljavanje kao što su faktori rasta i citokini. Naprotiv, tvari i razni čimbenici koji će uzrokovati oštećenje DNK će predstavljati pokretače apoptoze kao što su ionizacijsko zračenje i kemoterapeutici. Inicijacija apoptoze ovisi o grupi enzima iz obitelji proteaza koji se nazivaju kaspaze. Sintetiziraju se unutar stanice kao katalitički neaktivni zimogeni te se kroz procese dimerizacije i proteolitičkog cijepanja pretvaraju u svoj aktivni oblik koji imaju središnju ulogu u vanjskom i mitohondrijskom putu apoptoze (10, 11).

### 1.2.1. Vanjski put apoptoze

Vanjski put apoptoze kreće izvan stanice kada makrofazi proizvedu specifične molekule koje će se vezati za membranske proteine stanica koje će proći kroz programiranu smrt. Ti proteini predstavljaju receptore za tzv. „ligande smrti“ koje proizvode makrofazi, a pripadaju u obitelj proteina nazvanih faktori tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*, TNF). Vezanje proteina za „ligand smrti“ će dovesti do dimerizacije i proteolitičkog cijepanja kaspaza i time njihove aktivacije. Aktivirane inicijatorske kaspaze uzrokovati će aktivaciju efektorskih kaspaza koje će proteolitički cijepati ciljne proteine, uzrokovati kondenzaciju kromatina i izazvati apoptozu stanice. Najčešće kombinacije proteina i liganda uključenih u vanjski put apoptoze su Fas proteini i njihovi receptori FasL/FasR te TNF proteini i receptori TNF- $\alpha$ /TNFR1 (8, 9).

### 1.2.2. Mitohondrijski put apoptoze

Nazvan i unutarnji put apoptoze, mitohondrijski put uključuje niz unutarstaničnih signala koji se izlučuju uslijed DNK oštećenja. Kaspaze se aktiviraju nakon što stanični stres uzrokuje propuštanje citokroma c iz membrane mitohondrija koja postaje propusnija za proteine te dolazi do narušavanja

## UVOD

mitohondrijskog membranskog potencijala. Geni koji su ključni za reguliranje ovog apoptotičkog puta su B – stanični limfom 2 gen (engl. *B-cell lymphoma 2*, BCL-2) te TP53 (12). Mitohondrijski membranski potencijal predstavlja središnju ulogu u sintezi molekule adenozin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*, ATP) koja je ključna u transportu energije unutar stanice te je stoga glavni indikator aktivnosti samog mitohondrija. Potencijal stvoren mitohondrijskim protonskim pumpama neophodan je pri sintezi i skladištenju energije u procesu oksidativne fosforilacije kao i održavanju mitohondrijske homeostaze kroz uklanjanje nefunkcionalnih mitohondrija kod kojih je narušen normalni transport iona. Uzeći u obzir da je mitohondrijski membranski potencijal neophodan za održavanje fizioloških procesa u stanici, njegovo narušavanje označava vrlo rani događaj u apoptozi (13).

### 1.3. Rak

Skupinu bolesti koje karakterizira abnormalni stanični rast te nekontrolirano širenje stanica u okolno tkivo nazivamo rak. Uz kardiovaskularne bolesti rak je jedan od najčešćih uzročnika smrti u suvremenom svijetu (14). Zbog svoje kompleksnosti i sklonosti komplikacijama te nespecifičnim simptomima koji mogu ukazivati na nepovezana patološka stanja postao je ozbiljan problem za farmakološku i medicinsku znanost, posebice u određivanju potrebne terapije, njegovog liječenja te sintetiziranja novih lijekova (15).

#### 1.3.1. Vrste raka

Glavna podjela tumorskih bolesti je na dobroćudne (benigne), koje su u pravilu lokalizirane i koje se ne šire u okolno tkivo te ga pri rastu samo potiskuju i na zloćudne (maligne), za koje se često koristi naziv rak te za koje je karakteristično širenje u udaljena tkiva i metastaziranje uslijed puno agresivnijeg staničnog rasta. Zloćudne stanične preobrazbe se dodatno dijele na tip stanica ili tkiva u kojima nastaju, a to su: karcinomi (nastaju iz epitelnih stanica), sarkomi (nastaju iz stanica vezivnog tkiva) i leukemije (nastaju iz krvotvornih stanica i stanica imunološkog sustava) (16 – 18).

## UVOD

### 1.3.2. Nastanak i uzroci raka

Iako je nemoguće odrediti osnovni uzrok koji je doveo do nastanka raka, veliki broj vrsta raka razvije se pod utjecajem određenih karcinogenih tvari kao što su duhanski dim, ultraljubičasto zračenje i aflatoksin. Manji dio istih se razvije kao posljedica naslijeđenih mutacija u genima, virusnim infekcijama, prekomjernim lučenjem određenih hormona i autoimunih bolesti. Djelovanje navedenih čimbenika će dovesti do poremećaja u staničnom ciklusu, molekularnih mehanizama koji su zaslužni za popravak DNK te mehanizama koji su zaslužni za zaustavljanje ciklusa i naposljetku sprječavanja nekontrolirane diobe stanica i njihovog širenja u okolna tkiva (1, 19). Poremećeni molekularni mehanizmi popravka DNK, zajedno s djelovanjem kemijskih i fizikalnih mutagena, virusnih infekcija i naslijeđenih mutacija među ostalima, će dovesti do ishodišne genetičke mutacije jedne stanice u procesu koji se naziva inicijacija tumora. Takva stanica će imati oštećenu DNK i abnormalan genotip i kariotip te će se kao takva nastaviti brzo dijeliti usred nereguliranih kontrolnih točaka ciklusa (20). Pokazano je da stanice raka pokazuju klonalnost, odnosno da su monoklonalnog podrijetla, te da daljnje stanice koje nastaju prekomjernom diobom pokazuju identične kromosomske abnormalnosti izvorne stanice. S većim brojem dioba moguće je da se razviju nove, sekundarne kromosomske aberacije i nove mutacije. Ukoliko nove mutacije dovedu do novih svojstava koja su pogodna za tumor, a to su brža dioba i veća invazivnost, dogodit će se klonska selekcija. Stanice koje imaju novostvorene mutacije i pogodnija svojstva će se dijeliti više od ostalih te će zauzimati većinu tumora sve dok ostale stanice koje nemaju ista svojstva postanu manjina (21).

Na osnovi specifičnih obilježja mogu se razlikovati normalne od tumorskih stanica. Za razliku od normalnih stanica, za tumorske stanice je karakteristično da rastu i dijele se neovisno o izvanstaničnim faktorima ili inhibitorima rasta. Imaju sposobnost izbjegavanja apoptoze, neograničeni broj dioba, širenje u ostala tkiva i stvaranje metastaza. Kroz proces angiogeneze tumorske stanice stvaraju veliku količinu krvnih žila i osiguravaju opskrbu kisikom. Tumorske stanice se nastavljaju dijeliti nakon što su dosegle određenu staničnu gustoću, za razliku od normalnih stanica kod kojih je prisutna inhibicija proliferacije ovisna o gustoći. Tumorske stanice pokazuju obilježja nediferenciranih ili slabo diferenciranih stanica te imaju mutirane protoonkogene i tumor-supresorske gene (22).

## UVOD

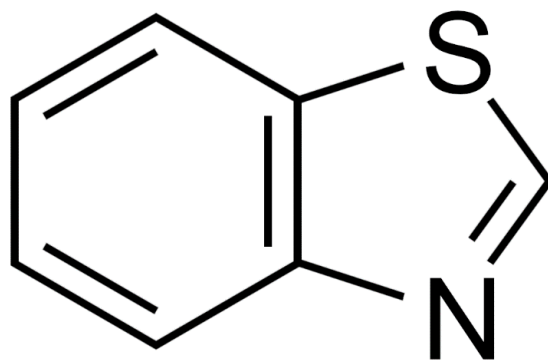
### 1.3.3. Terapija raka

Razvoj terapijskih pristupa u liječenju raka usmjeren je na što veću učinkovitost i smanjenje nuspojava, no to nije uvijek bilo tako posebice u slučaju radioterapije i kirurškog odstranjenja same tvorbe koji se još uvijek koriste. Međutim, razvile su se terapijske metode koje su smanjile nuspojave i remisiju bolesti kao što su imunoterapija, nanotehnologija i genska terapija. Do danas najučinkovitija metoda terapije raka jest njegovo rano otkrivanje te liječenje kirurškim zahvatom, kemoterapijom ili zračenjem prije nego što započne invazija u lokalna tkiva (23). Jedna od novih metoda je danas predmet mnogih istraživanja poboljšanja tumorske terapije. Zasniva se na tome da cilj djelovanja nisu tumorske stanice nego tumorski mikrookoliš (engl. *tumor microenvironment*, TME), tj. zdravo lokalno tkivo i stanice s kojima je tumor u kontaktu i s kojima komunicira različitim izvanstaničnim signalima i koje mogu djelovati promotorski na rast tumorskih stanica. Vjeruje se da se ciljnim djelovanjem na TME postiže ne samo terapijski učinak, već da se komplementiraju i nadopunjuju druge antitumorske terapijske metode (24). Upotreba molekularne dijagnostike pri analizi onkogeni i tumor – supresorskih gena pokazala je veliki uspjeh u praćenju liječenja i terapijskog odgovora. Također, istraživanjem sveukupnog genotipa stanica raka moguća je klasifikacija različitih tumora i prema tome uspješan odabir terapije. Osim klasifikacije tumora i njegovog ranog otkrivanja, molekularna dijagnostika se može koristiti pri ciljnom djelovanju na određene molekule što će dovesti do prestanka rasta tumora i njegove metastaze. Praćenjem genetičkog profila stanica molekularnom dijagnostikom moguće je raspoznati zdrave od tumorskih stanica i tako voditi terapiju k ciljnom djelovanju isključivo na stanice tumora (25). U novije vrijeme sve se više istražuju terapijske metode koje koriste protutumorske lijekove čiji je glavni sastojak benzotiazol, odnosno njegovi derivati (26).

### 1.4. Benzotiazol i njegovo terapijsko djelovanje

Benzotiazol je organski spoj s kemijskom formulom  $C_7H_5NS$  čiju okosnicu predstavlja kondenzacija benzenskog i tiazolnog prstena (Slika 2.). Danas se derivati benzotiazola koriste u kliničkoj terapiji, a njegova učinkovitost ovisi o vrsti supstituenta kao i njegovom položaju unutar benzotiazolne okosnice.

## UVOD



**Slika 2.** Struktura benzotiazola. Kemijska formula benzotiazola je  $C_7H_5NS$  te njegovu okosnicu čine benzenski i tiazolski prsten. Izradio autor.

U pokusima *in vitro* pokazano je da točno određeni derivati benzotiazola imaju izrazitu farmakološku aktivnost protiv tumorskih staničnih linija kao što su HeLa, SW480, HepG2 te HCC. Određeni derivati benzotiazola djeluju antitumorsko tako što uzrokuju apoptozu stanica *in vitro* s indukcijom unutarstaničnog puta apoptoze preko mitohondrija (27 – 29).

Jedno od djelovanja derivata benzotiazola je onemogućivanje regulacije pH u tumorskim stanicama djelovanjem na aktivno mjesto ugljičnih anhidraza, enzima koji su odgovorni za katalizu reverzibilne pretvorbe između ugljikovog dioksida i vode te disociranih iona ugljične kiseline čime induciraju apoptozu stanice (30, 31).

Neki derivati benzotiazola mogu utjecati na polimerizaciju mikrotubula, te tako remetiti stanični oblik i unutarstanični transport. U odsustvu polimerizacije  $\alpha$  i  $\beta$  tubulina u protofilamentima ne može doći do stvaranja diobenog vretena i diobe stanice. Upravo zbog ovog mehanizma djelovanja mikrotubuli su dulje vrijeme jedan od ciljeva djelovanja raznih kemoterapeutskih tvari, pa i derivata benzotiazola (32).

Osim antitumorske aktivnosti, benzotiazol i njegovi derivati posjeduju aktioksidativnu, antidijabetičku, antiupalnu, analgetičku, antibakterijsku i antiviralnu aktivnost među mnogim drugima (26, 33).

## **HIPOTEZA**

### **2. HIPOTEZA**

Polazna pretpostavka vezana za testirane derivate benzotiazola je da induciraju programiranu staničnu smrt u stanicama limfoma.



## **CILJ RADA**

### **3. CILJ RADA**

Cilj ovog istraživanja je ispitati proapoptotski potencijal derivata benzotiazola na stanice limfoma.

## **MATERIJAL I METODE**

### **4. MATERIJAL I METODE**

#### **4.1. Ustroj studije**

Ovaj diplomski rad organiziran je kao pokusno (eksperimentalno) istraživanje te je proveden u Laboratoriju za kulturu tkiva i funkcionalnu genomiku pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

#### **4.2. Materijali**

##### **4.2.1. Derivati benzotiazola**

Derivati benzotiazola sintetizirani su na Zavodu za organsku kemiju na Fakultetu za kemijsko inženjerstvo i tehnologiju na Sveučilištu u Zagrebu. U istraživanju je korišteno šest različitih derivata benzotiazola: D1, D2, D3, D4, D5 i D6.

##### **4.2.2. Stanične linije**

Antiproliferativno djelovanje derivata benzotiazola ispitivano je na humanoj staničnoj liniji HuT-78 koje su tumorske stanice T – staničnog limfoma. Korištene stanice limfoma su komercionalno dostupne stanice (ATCC TIB-161).

##### **4.2.3. Kemikalije**

Tijekom eksperimentalnog dijela diplomskog rada upotrijebljeno je više različitih kemikalija:

## MATERIJAL I METODE

- Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640) (Sigma Aldrich, Spruce Street, St. Louis, SAD), nadopunjen s 10 %-tnim fetalnim goveđim serumom (engl. *fetal bovine serum*, FBS), 1 %-tnim natrij piruvatom (Lonza, Verviers, Belgija) i 1 %-tnom 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etanesulfoničnom kiselinom (engl. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*, HEPES) (Sigma-Aldrich, Spruce Street, St. Louis, SAD)
- Set za određivanje apoptoze: Alexa Fluor 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa Fluor 488 annexin V and PI for Flow Cytometry (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Doksorubicin – Pliva, Hrvatska
- Set za određivanje mitohondrijskog membranskog potencijala: Mitochondria Staining Kit for mitochondrial potential changes detection (Sigma Aldrich, Spruce Street, St. Louis, SAD)
- Fosfatni pufer (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS)
- Eritrozin B – (Merck, Darmstadt, Njemačka)

### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Uzgoj i održavanje stanica *in vitro*

Stanice limfoma (HuT-78) su uzgojene i održavane u bocama za kultivaciju (BD Falcon, Njemačka) površine 25 cm<sup>2</sup> i 75 cm<sup>2</sup> suspendirane u RPMI 1640 mediju koji je nadopunjen s 10 %-tnim FBS-om, 1 %-tnim natrij piruvatom i 1 %-tnim HEPES-om. Stanične suspenzije su kultivirane u bocama za kultivaciju u CO<sub>2</sub> inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pri 37 °C i uz 5 % CO<sub>2</sub>. Prilikom čitavog postupka uzgoja i održavanja staničnih kultura podrazumijeva se rad u sterilnim uvjetima i kabinetima s kontinuiranim laminarnim protokom zraka.

## MATERIJAL I METODE

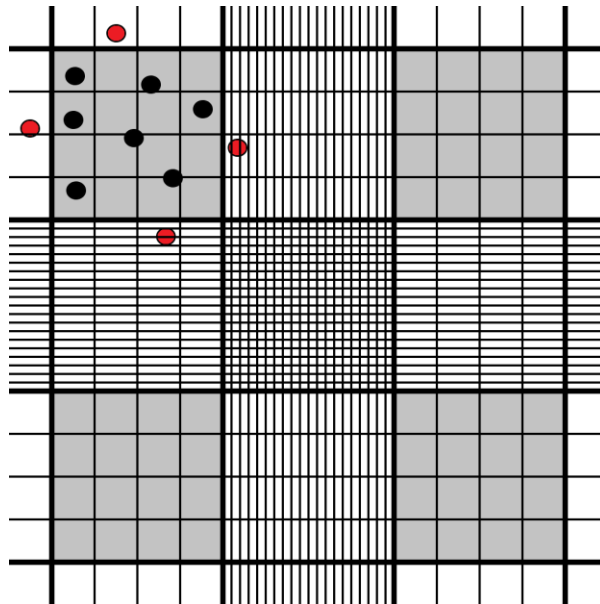
### 4.3.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi

Žive stanice su brojane nakon bojanja određenog volumena stanične suspenzije bojom eritrozinom B, koji se koristi za određivanje vijabilnosti stanica pri čemu se obojaju samo mrtve stanice koje su izgubile membranski integritet što ga čini učinkovitom i netoksičnom bojom koja je vrlo jednostavna za korištenje (34, 35).

Stanična suspenzija se pomiješa s bojom eritrozina B i nanese na Bürker – Türkovu komoricu (Slika 3.). Žive stanice su brojane pod invertnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka) u četiri najveća kvadrata pri čemu se dobiveni broj unosi u formulu. Formula za određivanje broja živih stanica glasi:

$$\frac{N}{4} \times 3 = X \times 10^4 \text{ stanica/mL}$$

pri čemu je N broj izbrojenih stanica, broj 4 broj polja u komorici, a broj 3 faktor razrjeđenja.



**Slika 3.** Bürker – Türkova komorica. Bürker – Türkova komorica podijeljena je u devet velikih kvadrata od kojih su četiri u uglovima dodatno podijeljeni u šesnaest manjih u kojima se broje stanice. Skupine u središnjem kvadratu su dodatno podijeljene u 16 manjih kvadrata. **Legenda:** crne stanice – stanice koje se broje, crvene stanice – stanice koje se ne broje, sivi kvadrati – glavni kvadrati u kojima se broje stanice. Izradio autor.

## MATERIJAL I METODE

### 4.3.3. Priprema stanica i tretman

Stanice limfoma HuT-78 su nasadene na mikrotitarske pločice te se u svakoj jažici nalazilo  $5 \times 10^5$  stanica. Ukupni volumen stanične suspenzije je 3000  $\mu\text{L}$  po jažici. Za ispitivanje apoptoze i mitohondrijskog potencijala korišteno je 16 jažica za svaku skupinu pri čemu se u svakoj skupini nalazila negativna i pozitivna kontrola te po sedam derivata benzotiazola u koncentraciji od 5  $\mu\text{mol/L}$ . Za pozitivnu kontrolu apoptoze korišten je doksorubicin u koncentraciji od 1  $\mu\text{mol}$ , a za pozitivnu kontrolu narušenog mitohondrijskog potencijala korišten je valinomicin prema uputama proizvođača. Svaka od navedenih sastavnica je korištena u duplikatu radi uspješnije statističke obrade. Nakon tretiranja staničnih suspenzija derivatima benzotiazola te induciranja apoptoze i narušenog mitohondrijskog potencijala u pozitivnim kontrolama slijedila je inkubacija istih u trajanju od 24 sata u  $\text{CO}_2$  inkubatoru na 37 °C.

### 4.3.4. Detekcija apoptoze

Nakon 24-satne inkubacije stanica s derivatima, stanice su pokupljene i centrifugirane pri 1100 rpm / 6 min. Supernatant je uklonjen, a u epruvete sa stanicama je dodano 100  $\mu\text{L}$  aneksin V vežućeg pufera. U epruvete je dodan aneksin V koji ima visoki afinitet za fosfatidilserin kojega prepoznaje te se za njega veže. Vežanje aneksina V i fosfatidilserina detektirano je konjugacijom aneksina V s fluorescentnom bojom Alexa Fluor 488 koja, po svom spektru fluorescencije, odgovara fluorescein izotiocijanatu (engl. *fluorescein isothiocyanate*, FITC). Nakon vezanja aneksina V u staničnu suspenziju je dodan propidij jodid (engl. *propidium iodide*, PI), crvena fluorescentna boja koja ima visoki afinitet prema nukleinskim kiselinama. Nakon dodavanja aneksina V i PI stanice su inkubirane u trajanju od 15 minuta u  $\text{CO}_2$  inkubatoru pri 37 °C. Dualnim bojanjem omogućena je detekcija stanica u svim stadijima apoptoze, pri čemu su stanice u ranoj apoptozi bile obojane samo aneksinom V, a stanice u kasnoj apoptozi i nekrozi aneksinom V i PI.

## MATERIJAL I METODE

### 4.3.5. Određivanje promjene u mitohondrijskom potencijalu

Druga skupina stanica, kod koje se ispituje promjena mitohondrijskog membranskog potencijala ( $\Delta\Psi_m$ ), tretirana je JC-1 bojom.

Nakon završetka inkubacije stanica s ispitivanim spojevima, stanice su pokupljene i centrifugirane pri 1100 rpm / 6 min. Supernatant je uklonjen, a u epruvete je dodana JC-1 boja po uputama proizvođača nakon čega su stanice inkubirane u trajanju od 20 minuta u CO<sub>2</sub> inkubatoru pri 37 °C. Unutar zdravih stanica JC-1 boja koncentrirana je u matriksu mitohondrija gdje tvori crvene fluorescentne agregate. U slučaju narušenog potencijala, JC-1 boja se raspršuje po cijeloj stanici te dolazi do promjene boje iz crvene u zelenu.

### 4.3.6. Analiza stanica protočnom citometrijom

Nakon što su se stanice inkubirale, u epruvetama za protočnu citometriju su centrifugirane na 3000 rpm u trajanju od pet minuta. Nakon bojanja stanice su analizirane na protočnom citometru (BD FACSCanto, BD Biosciences, Češka) na kojem je, s obzirom na valnu duljinu i intenzitetu fluorescencije, određen udio apoptotičkih i živih stanica.

### 4.3.7. Statističke metode

Protočnom citometrijom analizirane su stanice u duplikatu. FlowJo program je korišten za obradu i analizu podataka sa protočnog citometra. Statistička analiza podataka obavljena je pomoću statističkog programa XLSTAT 2021.2.2. za Windows operativne sustave. U statističkoj obradi podataka korišten je Dunnettov test sa statističkom značajnosti  $P < 0,05$  (36).

## REZULTATI

### 5. REZULTATI

#### 5.1. Proapoptotski učinak derivata benzotiazola

Proapoptotski učinak derivata benzotiazola ispitivan je na HuT-78 staničnoj liniji određivanjem postotka stanica koje su žive (Q4 kvadrant), stanica koje su u apoptozi (Q3 kvadrant) i stanica koje su u kasnoj apoptozi (Q2 kvadrant) (Slika 4.). Također, mjerena je promjena mitohondrijskog membranskog potencijala ( $\Delta\Psi_m$ ) kao potvrda ulaska stanice u programiranu staničnu smrt (Slika 5.). Korišteno je šest različitih derivata benzotiazola (D1, D2, D3, D4, D5 i D6) u koncentraciji od 5  $\mu\text{mol/L}$ . Derivati su inkubirani s ispitivanim stanicama 24 sata. Rezultati su prikazani tablicama, histogramima i grafom.

Svi ispitivani derivati (D1 – D6) djeluju na staničnu liniju tako da induciraju u tretiranim stanicama ranu ili kasnu apoptozu u odnosu na netretiranu kontrolnu populaciju stanica (Tablica 1.).

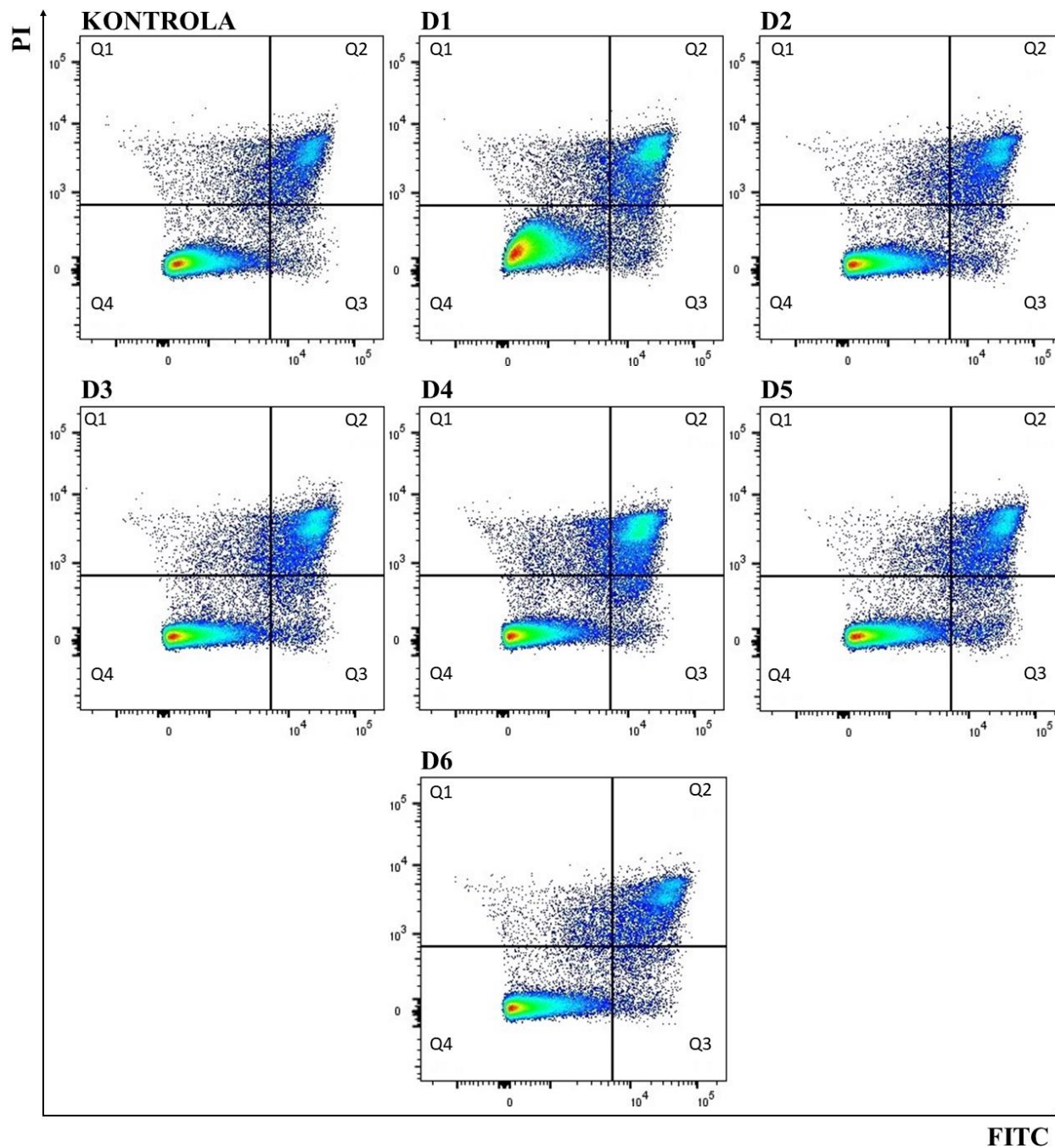
Tako su derivati D1, D3 i D4 u HuT-78 staničnoj liniji nakon 24-satnog tretmana inducirali povećanje broja stanica u kasnoj apoptozi za više od 5,54 % i smanjenje živih stanica za nešto više od 7,04 % u odnosu na netretiranu kontrolu.

Derivati D2 i D6 nisu značajnije utjecali na tretirane HuT-78 stanice (0,5 – 1,1 % više stanica u kasnoj apoptozi, 0,2 – 0,5 % više stanica u apoptozi te 1,2 – 1,4 % manje živih stanica u odnosu na netretiranu kontrolu).

Derivat D5 je inducirao porast broja HuT-78 stanica u apoptozi, konkretno 4,2 % više stanice bilo je u kasnoj apoptozi, 1 % više stanica u apoptozi te 4,9 % manje živih stanica u odnosu na netretiranu kontrolu.

Dunnettovim testom utvrđeno je da niti jedna od promjena nije statistički značajna.

## REZULTATI



**Slika 4.** Histogramski rezultati analize postotka živih i apoptotičkih stanica Hut-78 stanične linije tretiranih derivatima benzotiazola. Hut-78 stanice su tretirane derivatima benzotiazola u trajanju od 24 sata u koncentraciji od  $5 \mu\text{mol/L}$ . Legenda: D1-6 – derivati benzotiazola, Q1 – mrtve stanice, Q2 – stanice u kasnoj apoptozi, Q3 – stanice u apoptozi, Q4 – žive stanice, PI – propidij jodid, FITC – fluorescein izotiocijanat.



## REZULTATI

**Tablica 1.** Postotak živih i apoptotičkih stanica nakon 24-satnog tretmana derivatima benzotiazola.

DERIVATI	KASNA APOPTOZA (%)	APOPTOZA (%)	ŽIVE STANICE (%)
KONTROLA	10,4 ± 0,8	2,2 ± 0,1	83,8 ± 0,9
D1	15,3 ± 0,9	3,1 ± 0,1	76,7 ± 2,8
D2	10,9 ± 1,1	2,4 ± 0,6	82,4 ± 0,5
D3	15,8 ± 2,7	3,1 ± 0,1	76,1 ± 5,6
D4	15,6 ± 1,6	3,2 ± 0,1	76,2 ± 1,3
D5	14,6 ± 3,1	3,2 ± 0,6	78,9 ± 3,6
D6	11,5 ± 1,4	2,7 ± 0,04	82,6 ± 1,7

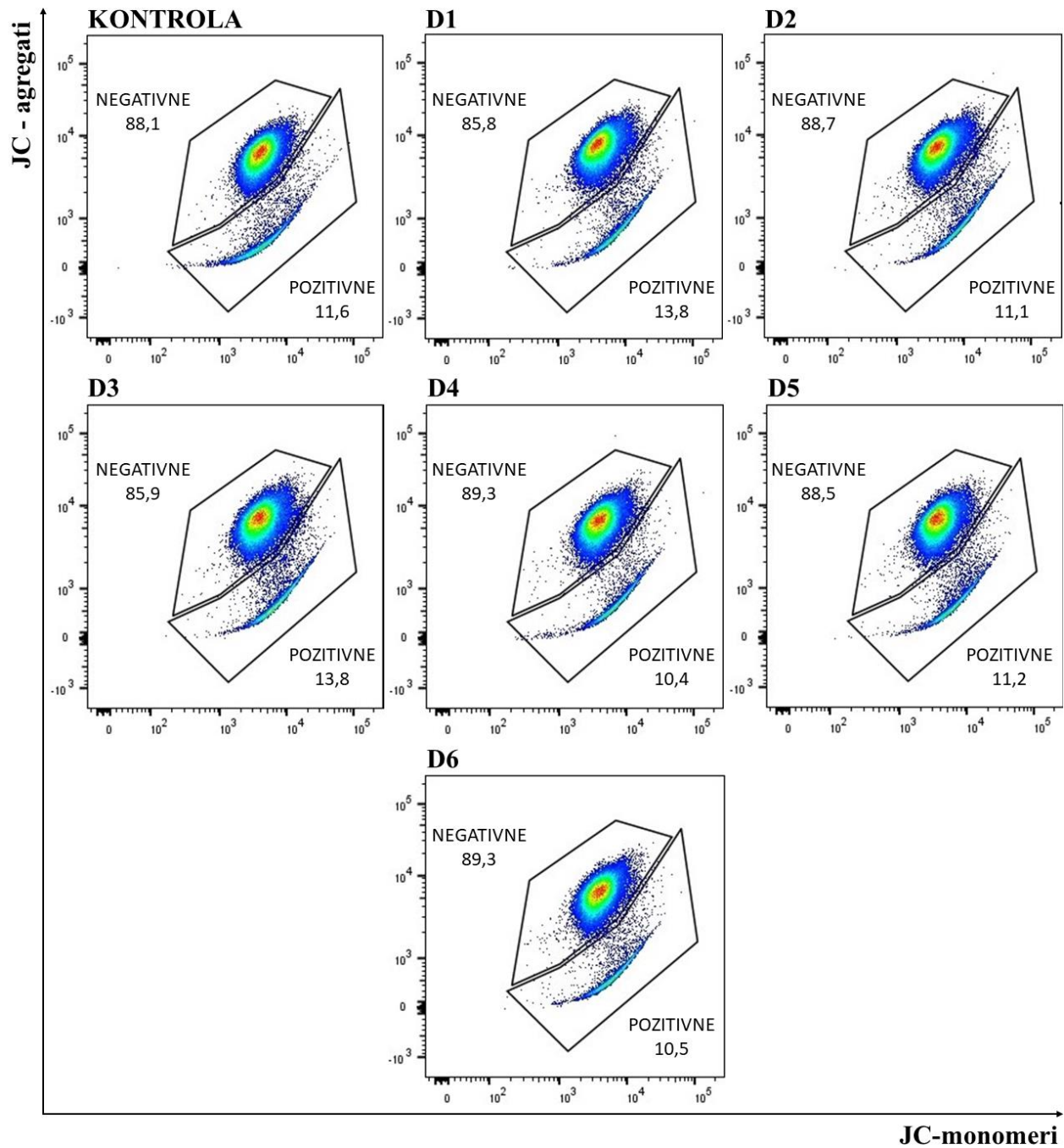
### 5.2. Promjene u mitohondrijskom potencijalu tretiranih stanica

U tretiranim stanicama nije došlo do biološki i statistički značajnih promjena u mitohondrijskom potencijalu.

D1 i D3 derivati u HuT-78 staničnoj liniji uzrokuju 2,2 % više stanica s narušenim mitohondrijskim membranskim potencijalom u odnosu na netretiranu kontrolu.

D2 derivat u HuT-78 staničnoj liniji uzrokuje 0,5 %, D4 derivat 1,2 %, D5 derivat 0,4 %, a D6 derivat 1,1 % manje stanica s narušenim mitohondrijskim potencijalom u odnosu na netretiranu kontrolu (Tablica 2.).

## REZULTATI



**Slika 5.** Histogramski rezultati analize postotka stanica Hut-78 stanične linije s narušenim i normalnim mitohondrijskim membranskim potencijalom tretiranih derivatima benzotiazola. Hut-78 stanice su tretirane derivatima benzotiazola u trajanju od 24 sata u koncentraciji od  $5 \mu\text{mol/L}$ . Postotak negativnih i pozitivnih stanica je označen na slici. Legenda: D1-6 – derivati benzotiazola.

## REZULTATI

**Tablica 2.** Postotak stanica s narušenim i normalnim mitohondrijskim membranskim potencijalom nakon 24-satnog tretmana derivatima benzotiazola.

<b>DERIVATI</b>	<b>NORMALAN MITOHONDRIJSKI MEMBRANSKI POTENCIJAL (%)</b>	<b>NARUŠENI MITOHONDRIJSKI MEMBRANSKI POTENCIJAL (%)</b>
KONTROLA	88,1 ± 0,9	11,6 ± 0,9
D1	85,8 ± 3,7	13,8 ± 3,7
D2	88,7 ± 0,1	11,1 ± 0,1
D3	85,9 ± 0,8	13,8 ± 0,9
D4	89,3 ± 0,3	10,4 ± 0,3
D5	88,5 ± 0,1	11,2 ± 0,1
D6	89,3 ± 0,4	10,5 ± 0,4

## RASPRAVA

### 6. RASPRAVA

Postoji mnogo čimbenika zbog kojih rak danas predstavlja jedan od najtežih i najizazovnijih zdravstvenih problema. Iako se lako može izliječiti u ranim stadijima, nedostatak specifičnih simptoma dovodi do toga da rak vrlo često napreduje u svoje kasnije i opasnije stadije. Zbog sposobnosti metastaziranja i klonalne selekcije njegovo liječenje je iznimno teško što predstavlja veliki problem i pritisak za medicinsku i farmakološku znanost za razvijanjem novih terapijskih metoda i lijekova (14, 15). U posljednje vrijeme mnogo istraživanja je usmjereno na derivate benzotiazola kao potencijalne antitumorske lijekove zbog njihove dokazane antiproliferativne aktivnosti remećenjem diobe, pH regulacije i oblika stanice na staničnim linijama kao što je HeLa (27 – 29).

Analiza aktivacije apoptoze ili programirane stanične smrti ispitivanih benzotiazola na stanice Hut-78 stanične linije pokazala je da, nakon 24-satnog tretmana benzotiazolima u koncentraciji od 5  $\mu\text{mol/L}$ , postotak stanica koje su ušle u kasnu apoptozu je u prosjeku 3,55 % veći te postotak stanica koje su ušle u apoptozu je u prosjeku 0,75 % veći nego što je to bilo prije tretmana. Dobiveni rezultat se slaže s postavljenom hipotezom, no statistička analiza podataka govori da nastale promjene nisu statistički značajne.

Statistički značajni rezultati s jednakim ishodom pokazani su na prethodno provedenim istraživanjima na MCF-7 staničnoj liniji te staničnim linijama raka debelog crijeva i planocelularnog karcinoma. Korištenjem derivata benzotiazola s polihidroksi kemijskim skupinama pokazana je iznimna citotoksična i antitumorska aktivnost na stanice MCF-7 stanične linije, no antiproliferativnog utjecaja na ostale stanične linije nije bilo (37). Modificiranjem strukture sintetiziranih derivata benzotiazola postignut je i značajan antiproliferativni utjecaj inhibiranjem topoizomeraza na stanične linije karcinoma pluća, debelog crijeva i leukemije (38). Istraživanja su također potvrdila antiproliferativnu aktivnost derivata benzotiazola induciranjem sinteze velike količine slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih spojeva u staničnoj liniji raka gušterače, no ovaj put apoptoze nije još potpuno istražen (39 – 41). Promjenom strukture i položaja derivata na benzotiazolnoj okosnici pokazan je i značajan antiproliferativni učinak na stanice hepatocelularnog karcinoma (26).

## RASPRAVA

Posljedicu statistički neznačajnog rezultata ne možemo sa sigurnošću odrediti, no pretpostavki je više. Moguće je da novosintetizirani derivati benzotiazola nisu dovoljno djelotvorni na ispitivanu HuT-78 staničnu liniju, da nisu korišteni u dovoljno velikoj množinskoj koncentraciji da bi izazvali terapijski učinak ili da nisu inkubirani s ispitivanim stanicama dovoljno dugo. Prilikom otkrivanja ispitivane stanične linije pokazano je da je sklona apoptozi s čime je njeno uzgajanje u kulturi otežano što može biti još jedan od razloga statistički neznačajnih rezultata (42).

Analizom mitohondrijskog membranskog potencijala u HuT-78 stanicama tretiranim s derivatima benzotiazola uočeno je da derivati D1 i D3 uzrokuju 2,2 % više stanica s narušenim mitohondrijskim membranskim potencijalom, dok ostali derivati uzrokuju veći postotak stanica s nepromijenjenim mitohondrijskim membranskim potencijalom u odnosu na netretiranu kontrolu.

Mitohondrijski membranski potencijal ključan je za procese stvaranja energije u obliku ATP-a, a pri tome i za održavanje homeostaze i fiziološke funkcije mitohondrija. Narušavanje mitohondrijskog membranskog potencijala stoga predstavlja početak programirane smrti stanice (14). Prethodna istraživanja pokazuju da određeni derivati benzotiazola uzrokuju apoptozu stanica hepatocelularnog karcinoma i karcinoma grlića maternice narušavanjem mitohondrijskog membranskog potencijala aktivacijom serije kaspaza, enzima koji su odgovorni za pokretanje mitohondrijske apoptoze (29, 43). Istraživanja također pokazuju da neki derivati benzotiazola mogu uzrokovati apoptozu stanica B i T limfoma apoptozom mitohondrija, ali i nakupljanjem toksičnih reaktivnih kisikovih spojeva (44).

D1 i D3 derivati su pokazani da narušavaju mitohondrijski membranski potencijal u odnosu na netretiranu kontrolu, ali statističkom obradom podataka utvrđeno je da promjene nisu statistički značajne. Razlog statistički neznačajnih rezultata, ali i rezultata u kojima su neki derivati djelovali tako da su povećali količinu stanica s normalnim mitohondrijskim membranskim potencijalom, može biti da samo neki od ispitivanih derivata induciraju apoptozu stanica aktiviranjem serija kaspaza i izvanstaničnih liganada što dovodi do narušavanja mitohondrijskog membranskog potencijala. Ostali derivati, koji nisu reagirali na isti način, mogu uzrokovati apoptozu HuT-78 stanica izvanstaničnim putem apoptoze ili pomoću kaspaza neovisnog metaboličkog puta koji ne uključuje narušavanje fiziološkog mitohondrijskog potencijala. Moguće je također da novosintetizirani derivati benzotiazola nisu dovoljno djelotvorni na ispitivanu HuT-78 staničnu liniju ili da nisu korišteni u dovoljno velikoj množinskoj koncentraciji da bi izazvali terapijski

## **RASPRAVA**

učinak. Dodatna istraživanja djelovanja derivata benzotiazola na HuT-78 staničnu liniju su potrebna kako bi se otkrio pravi uzrok dobivenih rezultata.

## ZAKLJUČAK

### 7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Svi ispitivani derivati benzotiazola pokazali su minimalni proapoptotski učinak na testirane stanice.
- D1 i D3 derivati benzotiazola uzrokuju minimalne promjene mitohondrijskog membranskog potencijala, dok ostali derivati nisu pokazali utjecaj na HuT-78 stanice.
- Nastale promjene nisu statistički značajne te su potrebna dodatna istraživanja na ispitivanoj staničnoj liniji kako bi se dobio uvid u nove derivate s potencijalnim većim terapijskim učinkom.

## SAŽETAK

### 8. SAŽETAK

**Ciljevi istraživanja:** Ispitati proapoptotski potencijal derivata benzotiazola na stanice limfoma.

**Nacrt studije:** Ovaj diplomski rad organiziran je kao pokusno (eksperimentalno) istraživanje.

**Materijal i metode:** U istraživanju je korišteno šest različitih derivata benzotiazola: D1, D2, D3, D4, D5 i D6. Antiproliferativno djelovanje derivata benzotiazola ispitivano je na humanoj staničnoj liniji HuT-78 koja se sastoji od tumorskih stanica T – staničnog limfoma.

Stanice su se uzgajale *in vitro* i održavale u bocama za kultivaciju te bojale eritrozinom B kako bi se odredio broj živih stanica. Stanice su tretirane 5  $\mu\text{mol/L}$  derivatima benzotiazola tijekom 24 sata. Nakon tretmana stanice su bojane aneksinom V konjugiranim s Alexa Fluor 488 bojom i propidij jodidom za određivanje stanica u apoptozi, te JC-1 bojom pomoću koje je određen postotak stanica s narušenim mitohondrijskim membranskim potencijalom. Dobiveni rezultati analizirani su pomoću statističkog programa XLSTAT 2021.2.2 za Windows operativne sustave.

**Rezultati:** Svi ispitivani derivati uzrokuju povećanje udjela apoptotskih stanica u tretiranim HuT-78 stanicama.

Derivati D1 i D3 uzrokuju povećanje postotka stanica s narušenim mitohondrijskim membranskim potencijalom. Statistička obrada podataka pokazuje da nastale promjene nisu statistički značajne.

**Zaključak:** Svi ispitivani derivati benzotiazola pokazali su minimalni proapoptotski učinak na testirane stanice.

**Ključne riječi:** Apoptoza; benzotiazoli; stanice limfoma; mitohondriji.



## SUMMARY

### 9. SUMMARY

Evaluation of antiproliferative activity of newly synthesized benzothiazoles as apoptosis activators

**Objectives:** The goal of this study is to test the proapoptotic potential of newly synthesized benzothiazole derivatives on T-cell lymphoma HuT-78 cell line.

**Study design:** This master's thesis is organized as an experimental research.

**Material and Methods:** There were six different benzothiazole derivatives used in the research: D1, D2, D3, D4, D5 i D6. Anitproliferative activity of benzothiazole derivatives has been tested on T-cell lymphoma HuT-78 cell line.

Cells have been grown and maintained *in vitro* in specialized bottles for cell cultivation. After that, they have been stained with erythrosine B to determine the number of living cells. Cells have been treated with 5  $\mu\text{mol/L}$  benzothiazole derivatives during 24 hours. After the treatment cells have been stained with annexin V that's been conjugated with Alexa Fluor 488 stain and with propidium iodide to determine the percentage of cells in apoptosis. Percentage of cells with disturbed mitochondrial membrane potential has been determined with JC-1 stain. Final results have been analysed with XLSTAT 2021.2.2 analytics software.

**Results:** All of the tested benzothiazole derivatives induced increase number of apoptotic cells compared to the untreated control.

D1 and D3 derivatives showed greater percentage of cells with ruined mitochondrial membrane potential. Statistical evaluation of the results has shown that none of the changes are statistically significant.

**Conclusion:** All of the benzothiazole derivatives that have been researched showed minimal proapoptotic effect on the tested cells.

**Keywords:** Apoptosis; benzothiazoles; lymphoma cells; mitochondria.

## LITERATURA

### 10. LITERATURA

1. Cooper MG, Hausman RE. Stanica – Molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada 10000 Zagreb; 2010.
2. Poon RYC. Cell cycle control: A system of interlinking oscillators. *Methods Mol Biol.* 2016;1342:3-19.
3. Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol.* 1998;35(6):461-78.
4. Wenzel ES, Singh ATK. Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. *In Vivo.* 2018;32(1):1-5.
5. Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol.* 2014;1170:29-40.
6. Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS. The Spindle Assembly Checkpoint. *Curr Biol.* 2012;22(22):R966–80.
7. Manic G, Corradi F, Sistigu A, Siteni S, Vitale I. Molecular Regulation of the Spindle Assembly Checkpoint by Kinases and Phosphatases. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2017;328:105-161.
8. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019;43(6):582–92.
9. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4)495-516.
10. Kaczanowski S. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Phys Biol.* 2016;11;13(3):031001
11. Corcoran GB, Fix L, Jones DP, Moslen MT, Nicotera P, Oberhammer FA, i sur. Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994;128(2):169-81.
12. Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, Mignotte B. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* 2012;942:157-83.
13. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, i sur. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem.* 2018;552:50–9.

## LITERATURA

14. Hausman DM. What Is Cancer? *Perspect Biol Med*. 2019;62(4):778–84.
15. Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, Kokolus S, i sur. Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):21087–113.
16. Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*. 2016;53(3):441.
17. Volpe JPG. Genetic Instability of Cancer. Why a Metastatic Tumor Is Unstable and a Benign Tumor Is Stable. *Cancer Genet Cytogenet*. 1988;34(1):125-34.
18. Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, Kurywchak PA, Levchenko A, Kalluri R, i sur. Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst*. 2019;9(2):109–27.
19. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2004;14(6):473–86.
20. Evans JJ, Alkaisi MM, Sykes PH. Tumour Initiation: a Discussion on Evidence for a “Load-Trigger” Mechanism. *Cell Biochem Biophys*. 2019;77(4):293–308.
21. Teixeira MR, Heim S. Cytogenetic Analysis of Tumor Clonality. *Adv Cancer Res*. 2011;112:127-49.
22. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
23. Arruebo M, Vilaboa N, Sáez-Gutierrez B, Lambea J, Tres A, Valladares M, i sur. Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies. *Cancers*. 2011;3(3):3279–330.
24. Wang JJ, Lei KF, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(12):3855-3864.
25. Lee YT, Tan YJ, Oon CE. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur J Pharmacol*. 2018;834:188–96.
26. Irfan A, Batool F, Zahra Naqvi SA, Islam A, Osman SM, Nocentini A, i sur. Benzothiazole derivatives as anticancer agents. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2020;35(1):265–79.

## LITERATURA

27. Corbo F, Carocci A, Armenise D, De Laurentis N, Laghezza A, Loiodice F, i sur. Antiproliferative Activity Evaluation of a Series of *N*-1,3-Benzothiazol-2-ylbenzamides as Novel Apoptosis Inducers. *J Chem*. 2016;2016:1–5.
28. Cummings J, Ward TH, Ranson M, Dive C. Apoptosis pathway-targeted drugs—from the bench to the clinic. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2004;1705(1):53–66.
29. Xuejiao S, Yong X, Ningyu W, Lidan Z, Xuanhong S, Youzhi X, i sur. A Novel Benzothiazole Derivative YLT322 Induces Apoptosis via the Mitochondrial Apoptosis Pathway In Vitro with Anti-Tumor Activity in Solid Malignancies. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e63900.
30. Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(2):168–81.
31. Supuran CT. Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochem J*. 2016;473(14):2023–32.
32. Fu D-J, Liu S-M, Li F-H, Yang J-J, Li J. Antiproliferative benzothiazoles incorporating a trimethoxyphenyl scaffold as novel colchicine site tubulin polymerisation inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2020;35(1):1050–9.
33. Gjorgjieva M, Tomašič T, Kikelj D, Mašič LP. Benzothiazole-based Compounds in Antibacterial Drug Discovery. *Curr Med Chem*. 2019;25(38):5218–36.
34. Krause AW, Carley WW, Webb WW. Fluorescent erythrosin B is preferable to trypan blue as a vital exclusion dye for mammalian cells in monolayer culture. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. 1984;32(10):1084–90.
35. Franke JD, Braverman AL, Cunningham AM, Eberhard EE, Perry GA. Erythrosin B: a versatile colorimetric and fluorescent vital dye for bacteria. *BioTechniques*. 2020;68(1):7–13.
36. Addinsoft (2021). XLSTAT statistical and data analysis solution. New York, USA.
37. Pathak N, Rathi E, Kumar N, Kini SG, Rao CM. A Review on Anticancer Potentials of Benzothiazole Derivatives. *Mini-Rev Med Chem*. 2020;20(1):12–23.

## LITERATURA

38. Saeed S, Rashid N, Jones PG, Ali M, Hussain R. Synthesis, characterization and biological evaluation of some thiourea derivatives bearing benzothiazole moiety as potential antimicrobial and anticancer agents. *Eur J Med Chem.* 2010;45(4):1323–31.
39. Li M-H, Yang P, Yang T, Zhang K, Liu Y, Liu J, i sur. A novel water-soluble benzothiazole derivative BD926 triggers ROS-mediated B lymphoma cell apoptosis via mitochondrial and endoplasmic reticulum signaling pathways. *Int J Oncol.* 2016;49(5):2127–34.
40. Hegde M, Vartak SV, Kavitha CV, Ananda H, Prasanna DS, Gopalakrishnan V, i sur. A Benzothiazole Derivative (5g) Induces DNA Damage And Potent G2/M Arrest In Cancer Cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):2533.
41. Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis.* 2007;12(9):1543–68.
42. Bunn PA, Foss FM. T-Cell lymphoma cell lines (HUT102 and HUT78) established at the National Cancer Institute: History and importance to understanding the biology, clinical features, and therapy of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) and adult T-cell leukemia-lymphomas (ATLL). *J Cell Biochem.* 1996;63(S24):12–23.
43. Kamal Ä, Ashraf Md, Vishnu Vardhan MVPS, Faazil S, Nayak VL. Synthesis and anticancer potential of benzothiazole linked phenylpyridopyrimidinones and their diones as mitochondrial apoptotic inducers. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(1):147–51.
44. Li M-H, Yang P, Yang T, Zhang K, Liu Y, Liu J, i sur. A novel water-soluble benzothiazole derivative BD926 triggers ROS-mediated B lymphoma cell apoptosis via mitochondrial and endoplasmic reticulum signaling pathways. *Int J Oncol.* 2016;49(5):2127–34.

# ŽIVOTOPIS

## 11. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODACI:

- Ime i prezime: Karlo Živatović
- Datum i mjesto rođenja: 10. listopad 1997., Slavonski Brod
- Adresa stanovanja: Dinka Šimunovića 20, 35000 Slavonski Brod
- Kontakt: 095/519 3817
- E-pošta: karlozivatovic@gmail.com

### OBRAZOVANJE:

- 2004. – 2012. Osnovna škola „Vladimir Nazor“, Slavonski Brod
- 2012. – 2016. Opća gimnazija „Matija Mesić“, Slavonski Brod
- 2016. – 2019. Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek
- 2019. – danas. Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek