

O staničnom tipu ovisna modulacija staničnog ciklusa djelovanjem 7- klorkinolin-benzoimidazolnih hibrida

Janić, Ivana

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:881940>

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**

Ivana Janić

**O STANIČNOM TIPU OVISNA
MODULACIJA STANIČNOG CIKLUSA
DJELOVANJEM 7-KLORKINOLIN-
BENZOIMIDAZOLNIH HIBRIDA**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Ivana Janić

**O STANIČNOM TIPU OVISNA
MODULACIJA STANIČNOG CIKLUSA
DJELOVANJEM 7-KLORKINOLIN-
BENZOIMIDAZOLNIH HIBRIDA**

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 28 stranica, 7 slika, 2 tablice

Zahvaljujem se ponajprije prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac na pruženoj prilici, predloženoj temi i stručnom vodstvu tijekom izrade završnog i diplomskog rada te prenesenom znanju tijekom cijelog studija.

Veliko hvala doc.dr.sc. Marijani Jukić na znanju koje je podijelila sa mnom, nesebičnoj pomoći i izdvojenom vremenu tijekom izrade rada.

Posebnu zahvalnost želim iskazati svojoj obitelji, prijateljima i dečku. Hvala Vam za svu brigu, strpljenje, podršku i motivaciju koju ste mi davali tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kinolin	1
1.1.1. Klorkinolin	1
1.2. Benzoimidazol	3
1.2.1. Spojevi benzoimidazola	3
1.3. Stanični ciklus	4
1.3.1. Regulacija staničnog ciklusa	5
1.4. Protočna citometrija	6
2. HIPOTEZA	8
3. CILJ	9
4. MATERIJALI I METODE	10
4.1. MATERIJALI	10
4.1.1. Stanične linije	10
4.1.2. Kemikalije	10
4.2. METODE	10
4.2.2. Priprema 7-klorkinolin-benzoimidazolnih hibrida	11
4.2.3. Tretman stanica hibridima	12
4.2.4. Određivanje staničnog ciklusa protočnom citometrijom	12
4.2.5. Statistička obrada podataka	13
5. REZULTATI	14
6. RASPRAVA	19
7. ZAKLJUČAK	22
8. SAŽETAK	23
9. SUMMARY	24
10. LITERATURA	25
11. ŽIVOTOPIS	28

POPIS KRATICA

DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*) deoksiribonukleinska kiselina

DMSO (engl. *dimethyl sulfoxide*) dimetil sulfoksid

HuT-78 (engl. *human T cell lymphoma*) T-stanični limfom

PBS (engl. *phosphate-buffered saline*) fosfatni pufer

PGCC (engl. *polyploid giant cancer cells*) gigantske poliplodne stanice raka

PI (engl. *propidium iodide*) propidij jodid

RNA (engl. *ribonucleic acid*) ribonukleinska kiselina

RPMI 1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute*) medij

TIBO (engl. *tetrahydro-imidazole-benzodiazepine*) derivat benzoimidazola

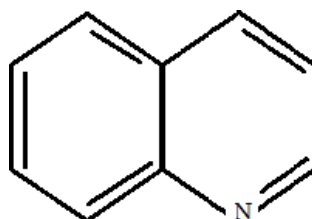
TNBC (engl. *triple negative breast cancer*) trostruko negativni karcinom dojke

TPH-1 (engl. *human monocytic cell leukemia*) monocitna leukemija

1. UVOD

1.1. Kinolin

Kinolin ili benzo[b]piridin skupina je heterocikličkih aromatskih organskih spojeva kemijske formule: C_9H_7N . Unutar kinolinske grupe spojeva kinolin je najjednostavniji spoj. Cijela skupina karakterizirana je dvostrukom prstenastom strukturom koja se sastoji od benzena i piridinskog prstena spojenog na dva susjedna ugljikova atoma (Slika 1.). Nekoliko derivata kinolina, nađenih u prirodi ili umjetno sintetizirani, se desteljećima koriste u terapijske svrhe. Primjerice, korijen biljke *Chinchona*, koja sadrži kinin, koristi se za liječenje aritmije već više od dvjesto godina, dok se diastereoizomer kinina, kinidin, početkom 20. stoljeća smatrao najmoćnijim antiaritmijским lijekom (1). Kinolinska struktura često se koristi za oblikovanje novih sintetičkih spojeva s različitim farmakološkim svojstvima. Mogu djelovati protuupalno, antimikrobno, citotoksično, antibakterijski i protutumorski (2).



Slika 1. Strukturna formula kinolina (sliku izradio autor)

1.1.1. Klorkinolin

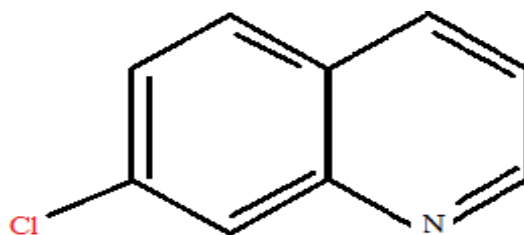
Klorkinolin je derivat kinolina, čija se struktura danas najviše koristi kao osnova za sintezu novih iznimno potencijalnih biološki aktivnih molekula u medicinskoj kemiji (Slika 2.). Klorokin, 7-kloro-4-aminokinolin, glavni je lijek koji se koristi za liječenje malarije u

posljednjih sedam desetljeća. Glavne prednosti ovog lijeka su ograničena toksičnost za domaćina, jednostavnost upotrebe te niska cijena. U posljednje vrijeme je zbog sve veće rezistencije parazita zamijenjen artemisininom i njegovim derivatima (3).

U novije vrijeme, klorkinolin i njegovi strukturni analozi predmet su velikog interesa i koriste se kao osnovne strukture u razvoju lijekova za liječenje raka pri čemu se koriste najnovije znanstvene spoznaje o njihovim interkalirajućim svojstvima (4).

Njihovim umetanjem između baznih parova DNA, tj. interkaliranjem, dolazi do ometanja normalnog funkcioniranja enzima topoizomeraze II (5). Ovaj način vezanja karakterizira niska selektivnost prema različitim sljedovima DNA ili RNA, kao i niska ili neselektivna bioaktivnost, no selektivnost se pokušava poboljšati uvođenjem specifičnih supstituenata na osnovnoj aromatskoj jezgri (6).

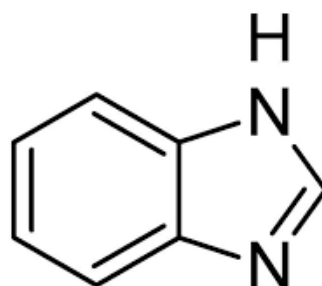
Objavljeni rezultati istraživanja pokazuju da spojevi klorkinolina su biološki aktivni, te da inhibiraju rast stanica u različitim vrstama ljudskih karcinoma, posebno u stanicama raka pluća i stanicama glioma. Nedavno su objavljeni i rezultati istraživanja iz koje se vidi da ove vrste spojeva zaustavljaju stvaranje metastaza i sprječavaju migracije stanica u mišjem modelu trostruko negativnog karcinoma dojke (engl. *Triple Negative Breast Cancer, TNBC*). Budući da je protutumorska aktivnost najzanimljivija karakteristika klorkinolina, uloženi su znatni naponi u dizajniranju i sintezi novih klorkinolinskih derivata (2).



Slika 2. Strukturna formula klorkinolina (sliku izradio autor)

1.2. Benzoimidazol

Benzoimidazol je heterociklički aromatski organski spoj koji je važan farmakofor u medicinskoj kemiji. Bicikličke je prirode i nastao je fuzijom prstena benzena i imidazola (Slika 3.), te se koristi od 1990.-ih godina kada su sintetizirani mnogi derivati benzoimidazola supstitucijom fluora, propilena, tetrahydrokinolina itd (7). Najistaknutiji spoj benzoimidazola u prirodi je N-ribozil-dimetilbenzimidazol, koji služi kao ligand za kobalt u vitaminu B12 (kobalamin). Nadalje, struktura benzoimidazola sadržana je u strukturi mnogih farmakoloških agensa koji imaju antibakterijsko, antifungalno, antiinfektivno, antitumorsko i mnoga druga biološka djelovanja (8).



Slika 3. Strukturna formula benzoimidazola (sliku izradio autor)

1.2.1. Spojevi benzoimidazola

Budući da je benzoimidazolska jezgra ključni gradivni element za razne kemijske spojeve koji imaju presudnu ulogu u funkcioniranju biološki važnih molekula, tijekom posljednjih nekoliko godina postoji stalan i rastući interes za sintezu novih derivata benzoimidazola i ispitivanje njihovih bioloških svojstava. Antibakterijsko djelovanje benzoimidazola opisano je u brojnim znanstvenim publikacijama, a mehanizam djelovanja se objašnjava njihovom kompetitivnosti s purinskim nukleobazama što rezultira inhibicijom sinteze bakterijskih nukleinskih kiselina i proteina (9). Također opisana su antimikrobna i antifungalna djelovanja derivata (7). Jedan od derivata benzoimidazola, tetrahydroimidazol-benzodiazepin (TIBO) je nekompetitivni ne-nukleotidni antiretrovirusni lijek sa specifičnim alosteričnim mjestom vezanja HIV-1 reverzne transkriptaze. Derivati TIBO pokazali su se

snažnim, visoko selektivnim i specifičnim inhibitorima replikacije HIV-1 *in vitro*, ali nažalost ne i kod HIV-2 (7).

Nekolicina prethodnih istraživanja sugerirala su da je benzoimidazol najistaknutiji heterociklički spoj koji ima dobra citotoksična svojstva protiv različitih vrsta staničnih linija karcinoma (7,10). Dobar primjer je nokodazol koji djeluje tako da ometa polimerizaciju mikrotubula. Zatim treba spomenuti i djelovanje metil-2-benzimidazol karbamata (karbendazima) koji inhibira funkciju mikrotubula što rezultira apoptozom u tretiranim stanicama. U *in vitro* istraživanjima dokazano je snažno antitumorsko djelovanje na mišji B16 melanom te na humane stanične linije karcinoma debelog crijeva HT-29 (10). Mehanizmi protutumorskog djelovanja su usko povezani s inhibicijom topoizomerase I i II, receptora VEGFR-2 i TIE-2 kinaze i enzima za popravak DNA polimeraze (11).

1.3. Stanični ciklus

Stanični ciklus sveprisutni je i složen proces uključen u rast i proliferaciju stanica, razvoj organa, regulaciju popravka oštećenja DNA te obnavljanje stanica, tkiva i organa. Kod eukariotskih stanica diobeni ciklus čine četiri međusobno povezana procesa: stanični rast, replikacija DNA, raspodjela udvostručenih kromosoma i podjela stanica. Taj proces odvija se približno svaka 24 sata. Stanični ciklus sastoji se od dva osnovna dijela: mitoze i interfaze. Mitoza je dioba stanične jezgre u kojima dolazi do odvajanja kromosoma stanica-kćeri te obično završava diobom stanice koju nazivamo citokineza. Za vrijeme mitoze kromosomi se kondenziraju, stvara se diobeno vreteno te dolazi do vezanja kromosoma za mikrotubule u diobenom vretenu. Zatim se kromatide odvajaju na suprotne polove stvarajući dvije jezgre. Mitoza se sastoji od četiriju faza: profaze, metafaze, anafaze i telofaze, dok se razdoblje između dvaju mitozu naziva interfazom koja čini 95% vremena cijelokupnoga staničnog ciklusa. Tijekom interfaze stanica se priprema za diobu, odnosno odvija se stanični rast, replikacija DNA, a kromosomi su dekonenzirani.

Sinteza DNA sastoji se od četiri zasebne faze: G1, S, G2, M. Tijekom G1 faze stanica raste, povećava svoj volumen, odnosno priprema se za S fazu u kojoj dolazi do replikacije DNA. Dovođenjem sinteze DNA počinje G2 faza u kojoj dolazi do staničnog rasta te sinteze proteina koji su potrebni za mitozu. U M fazi odvija se mitozu nakon koje slijedi citokineza, odnosno podjela stanice, te povratak dviju nastalih stanica kćeri u G1 fazu. Fazu

mirovanja nazivamo G0 fazom tijekom koje su stanice metabolički aktivne, ali nema proliferacije dok ih na to odgovarajući izvanstanični signali ne potaknu. Međutim, postoje stanice koje zauvijek ostaju u G0 fazi. To je vidljivo kod stanica koje su visoko diferencirane, kao što su živčane stanice, ili kod stanične starosti gdje zbog skraćivanja telomera ili oštećenja DNA stanice gube svoj diobeni potencijal (12,13).

1.3.1. Regulacija staničnog ciklusa

Dioba svake stanice pomno je reguliran i koordiniran proces sa staničnim rastom i replikacijom DNA kako bi se osigurao nastanak stanica kćeri s neoštećenim genomom. Usprkos strogoj regulaciji ciklusa, pogreške se događaju i uzrok su nenormalnoj proliferaciji u stanice raka pa su posljedično istraživanja staničnog ciklusa i nastanka raka postale usko povezane (12).

Stanični ciklus ima nekoliko regulatornih ili kontrolnih točaka čija zadaća je spriječiti ulazak u slijedeću fazu staničnog ciklusa ako prethodna faza nije dovršena. Za većinu stanica sisavaca glavna regulatorna točka nalazi se pri kraju G1 faze (tzv. restriksijska točka) koja regulira prelazak stanice iz G1 u S fazu ciklusa. Osim unutarstaničnih signala, napredovanje stanice kroz stanični ciklus reguliraju i izvanstanični signali iz okoline od kojih najveći utjecaj imaju faktori rasta. Prikladni faktori rasta omogućuju stanici prolazak kroz restriksijsku točku i ulazak u S fazu te napredovanje kroz ostale faze ciklusa čak i bez daljnje stimulacije faktorima rasta. S druge strane, ako faktori rasta nisu prisutni tijekom G1 faze, stanica ulazi u G0 fazu. Iduća kontrola proliferacije događa se u G2 fazi staničnog ciklusa. Ona otkriva nereplicirane dijelove DNA i na taj način sprječava ulazak u M fazu ukoliko S faza nije dovršena, odnosno ukoliko genom nije u potpunosti repliciran. Osim toga, otkriva oštećenja DNA uzrokovana zračenjem te popravljiva nastalo oštećenje. Kontrolna točka u S fazi kontrolira integritet DNA, otkriva i popravljiva oštećenje prije same replikacije (11–13).

Zaustavljanje ciklusa u G1, G2 i S kontrolnim točkama omogućuju proteinski kompleksi koje nazivamo i sensorima za DNA oštećenja. Djeluju tako što se vežu na oštećene dijelove DNA i pokreću signalne putove koji zaustavljaju stanični ciklus i dovode do aktivacije popravka nastalog oštećenja ili aktiviraju staničnu smrt (11).

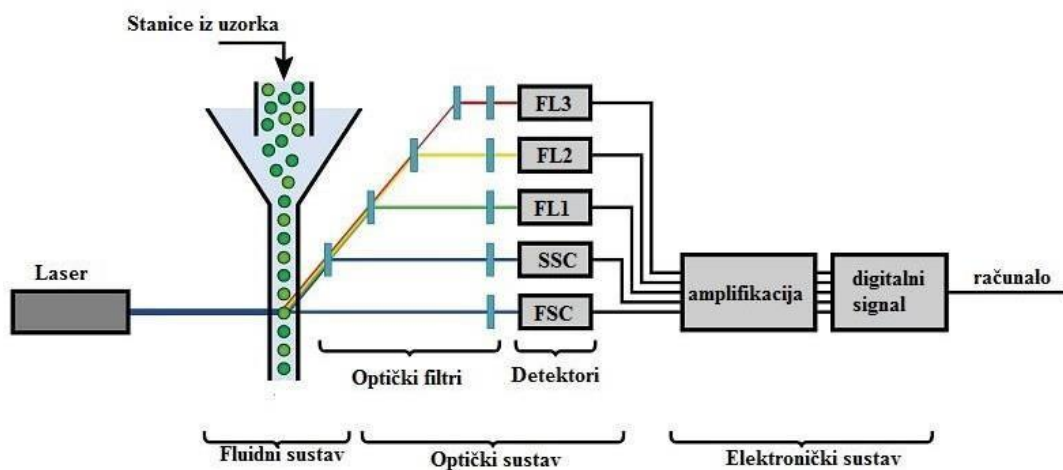
1.4. Protočna citometrija

Tijekom posljednjih godina protočna citometrija nametnula se kao korisna, jednostavna, visokoinformativna, brza metoda kojom se mogu analizirati strukturne, fiziološke i funkcijske osobine stanica. Povijesno gledano, prva razvijena protočna citometrija bila je instrument s jednim parametrom koji je detektirao samo veličinu stanica. Do danas su se razvili vrlo sofisticirani instrumenti s mogućnošću istodobnog otkrivanja 14 parametara (14).

Temeljni princip protočne citometrije povezan je sa raspršivanjem svjetlosti i emisijom fluorescencije, koja se javlja kao svjetlost iz izvora pobude (obično laserske zrake) koja udara u pokretne čestice. Raspršivanje svjetlosti izravno je povezano sa strukturnim i morfološkim svojstvima stanice, dok je emisija fluorescencije izvedena iz fluorescentne sonde proporcionalna količini fluorescentne sonde vezane za stanicu ili staničnu komponentu.

Glavne komponente protočnih citometara u osnovi su fluidni sustav, optički sustav (pobuda i prikupljanje), elektronička mreža (detektori) i računalo (Slika 4.). Tekućina je odgovorna za usmjeravanje suspenzija koje sadrže čestice prema izvoru svjetlosti. Optika pobude fokusira izvor svjetlosti na stanice/čestice, dok optika sakupljanja prenosi raspršeni svjetlosni ili fluorescentni svjetlosni materijal čestice u elektroničku mrežu. Elektronička mreža otkriva signal i pretvara ih u digitalne podatke koji su proporcionalni intenzitetu svjetlosti, dok je računalo potrebno za analizu podataka (15).

Protočna citometrija koristi se u otkrivanju membranskih, citoplazmatskih i nuklearnih antigena. Uz to, protočna citometrija također može istražiti cijele stanice i stanične komponente kao što su organele, jezgre, DNA, RNA, kromosomi, citokini, hormoni i sadržaj proteina. Analiza stanične proliferacije i staničnog ciklusa, mjerenje protoka kalcija i membranskih potencijala uobičajeni su primjeri metoda razvijenih za protočnu citometriju. Nadalje, protočnom citometrijom može se izravno mjeriti sadržaj jezgrine DNA te odrediti zastupljenosti udjela stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa. Uspoređujući testirane stanice s kontrolnima mogu se dobiti veoma značajni podatci o utjecaju raznih čimbenika (npr. primjena lijekova) na stanični ciklus stanica (14).



Slika 4. Sustav protočnog citometra (sliku izradio autor)

2. HIPOTEZA

Novosintetizirani hibridi 7-klorkinolin-benzoimidazoli dovode do zaustavljanja stanica u određenoj fazi staničnog ciklusa.

3. CILJ

Cilj istraživanja je ispitati učinak novosintetiziranih hibrida 7-klorkinolin-benzoimidazola na tumorskim stanicama, te odrediti promjene staničnog ciklusa i razliku u distribuciji stanica u odnosu na netretirane stanice.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. MATERIJALI

4.1.1. Stanične linije

U ovom radu korištene su dvije komercijalno dostupne stanične linije:

- HuT-78 (ATTC® TIB-161) – stanice akutnog T-staničnog limfoma
- THP-1 (ATTC® TIB-202) – stanice akutne monocitne leukemije

4.1.2. Kemikalije

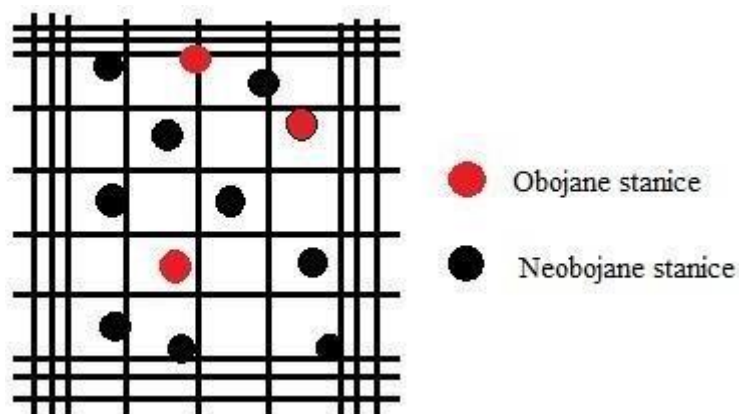
- Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640), AQmedia™, sa L-alanil-glutaminom, Sigma-Aldrich® (Velika Britanija)
- PBS (fosfatom puferirana otopina soli)
- Eritrozin B, Merck (Dermstadt, Njemačka)
- Etanol, histanol, Biognost (Zagreb, Hrvatska)
- RNase A, 50mg, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Njemačka)
- Propidij jodid, 95%, Acros Organics, Fisher Scientific (Velika Britanija)

4.2. METODE

4.2.1. Kultura stanica *in vitro*

Stanice smo kultivirali u bočicama za uzgoj stanica površine 25 cm² i 75 cm² (BD Falcon, Njemačka) u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s kontroliranom atmosferom uz 5% CO₂ i temperaturu od 37°C.

Vijabilnost poraslih stanica u kulturi odredili smo neposredno prije stavljanja stanica u pokus. Stanice smo obojali Eritrozin B bojom koja prodire u stanice s oštećenom membranom, dok vijabilne stanice izbacuju boju te su vidljive kao neobojene stanice koje se broje. Staničnu suspenziju s bojom prenijeli smo u Bürker-Türkovu komoricu koju smo promatrali pod invertnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka) (Slika 5.)



Slika 5. Mikroskopski prikaz stanica u Bürker-Türkovej komorici (sliku izradio autor)

Broj živućih stanica odredili smo formulom:

$$N/4 \cdot 3 = X \cdot 10^4 \text{ stanica/cm}^3$$

Gdje je:

N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – faktor razrjeđenja

4.2.2. Priprema 7-klorkinolin-benzoimidazolnih hibrida

Otopine 7-klorkinolin-benzoimidazolnih hibrida otopili smo u dimetil sulfoksidu (DMSO) u koncentraciji od 1×10^{-2} mol/L. Hibridi su sintetizirani na Zavodu za organsku

kemiju na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Koristili smo sedam različitih hibrida koje smo označili oznakama: KB1, KB2, KB3, KB4, KB5, KB6 i KB7.

4.2.3. Tretman stanica hibridima

Svaku staničnu liniju prenijeli smo na mikrotitarske ploče sa šest jažica s ravnim dnom. Stanice HuT-78 nasadili smo u koncentraciji 5×10^5 st/jažici, dok smo THP-1 nasadili u koncentraciji 3×10^5 st/jažici u volumenu od 3 mL na mikrotitarskoj ploči sa šest jažica. Obzirom da se u radu upotrebljavaju stanične linije u suspenziji, odmah nakon nasađivanja stanice smo tretirali ispitivanim hibridima u koncentraciji 5×10^{-6} mol/L. Stanice su zatim inkubirane 24 sata u CO₂ inkubatoru na 37°C.

4.2.4. Određivanje staničnog ciklusa protočnom citometrijom

Nakon 24-satne inkubacije stanica s ispitivanim hibridima, stanice su centrifugirane na 1100 rpm / 6 min, isprane fosfatnim puferom (PBS) te fiksirane s 3 mL 70%-tnim hladnim etanolom te pohranjene na -20°C do dana analize na protočnom citometru.

Na dan izvođenja analize, stanice smo pripremili za postupak tako da smo svaku epruvetu nekoliko sekundi vorteksirali te centrifugirali (1100 rpm, 6 minuta, 25°C) (Jouan BR4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), nakon čega smo odlili etanol. Zatim smo dodali 1 mL PBS-a te ponovo centrifugirali. Nakon centrifugiranja odlili smo dodan PBS, stanice smo resuspendirali s 350 µL PBS-a i prenijeli u epruvete namijenjene za protočnu citometriju. Dodali smo RNA-zu u koncentraciji od 0,5 mg/mL te inkubirali 5 minuta. Zatim smo dodali fluorescentnu boju propidij jodid (PI) u koncentraciji od 15 µg/mL te smo epruvete ostavili inkubirati na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon pola sata inkubiranja, epruvete smo stavili na led te proveli analizu na protočnom citometru (BD FACSCanto, BD Biosciences, Češka).

4.2.5. Statistička obrada podataka

Protočnom citometrijom analizirali smo stanice u duplikatu. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost postotka populacije sa koeficijentom varijacije (CV). FlowJo program koristili smo za obradu i analizu podataka sa protočnog citometra. Statistička analiza podataka obavila se pomoću statističkog programa XLSTAT 2021.2.2 za Windows operative sustave (16). Distribucija stanica u fazama staničnog ciklusa provedena je ANOVA analizom s Dunnettovim testom gdje je razina statističke značajnosti određena kao $P < 0,05$.

5. REZULTATI

Stanični ciklus ispitivan je na staničnim linijama HuT-78 i THP-1 nakon 24-satnog tretmana hibridima 7-klorkinolin-benzoimidazola. Rezultati su prikazani tablično (Tablica 1. i 2.) i histogramski (Slika 6. i 7.).

Nakon izlaganja stanica HuT-78 hibridu KB1 došlo je do statistički značajnog porasta stanica u sub G0 fazi ($3,3 \% \pm 2$) i grupi poliploida ($19,3 \% \pm 0,8$) te smanjenje udjela stanica u fazama G0/G1 ($35,5 \% \pm 2,2$) i G2/M ($23 \% \pm 1,5$) u odnosu na kontrolne stanice. S druge strane, nije uočena statistički značajan razlika u staničnom ciklusu između tretiranih i kontrolnih THP-1 stanicama nakon izlaganja spoju .

Nakon izlaganja stanica HuT-78 KB2 hibridu došlo je do statistički značajnog smanjenja udjela stanica u G0/G1 ($39,2 \% \pm 3,7$) i G2/M fazi ($25,4 \% \pm 2$) te značajan porast udjela poliploida ($19,4 \% \pm 3,1$) u odnosu na kontrolu. Na stanični ciklus THP-1 stanica hibrid KB2 nije statistički značajno utjecao.

Tretman KB3 je kod HuT-78 stanične linije doveo do značajnog smanjenja udjela stanica u fazama G0/G1 ($35 \% \pm 4,7$) i G2/M ($21,5 \% \pm 2,5$), a porasta u sub G0 fazi ($3,2 \% \pm 0,8$) te grupi poliploida ($19,9 \% \pm 3,1$). Isti tretman na THP-1 staničnu liniju ne pokazuje statistički značajnu promjenu u odnosu na kontrolu.

Tretman KB4 primjenjen na HuT-78 staničnu liniju doveo je do statistički značajnog povećanja udjela stanica unutar sub G0 ($4 \% \pm 2$) i G2/M faze ($60 \% \pm 2,1$) te smanjenja stanica unutar G0/G1 faze ($9,2 \% \pm 0,02$) u odnosu na kontrolu. Kod THP-1 stanične linije nakon tretmana prisutan je statistički značajan porast stanica u sub G0 ($7,2 \% \pm 2,4$) i G2/M fazi ($54,1 \% \pm 4,2$) te skupini poliploida ($5,2 \% \pm 0,5$), dok je značajno smanjenje primjećeno unutar G0/G1 faze ($8,7 \% \pm 0,4$).

Tretman KB5 je kod HuT-78 stanične linije pokazao statistički značajan porast stanica unutar sub G0 faze ($13,8\% \pm 1,1$) te značajno smanjenje udjela stanica u G0/G1 fazi ($30,5\% \pm 0,4$) dok promjene u ostalim fazama nisu statistički značajne. Na THP-1 stanice, tretman je postigao značajnu promjenu u sub G0 fazi ($8,5\% \pm 0,6$) gdje se povećao udio stanica.

Tretman KB6 nije pokazao statistički značajnu promjenu ni jednoj fazi staničnog ciklusa u obje stanične linije u odnosu na kontrolu.

Tretman KB7 primjenjen na HuT-78 staničnu liniju nije statistički značajno promijenio distribuciju stanica, dok je u THP-1 staničnoj liniji doveo do značajnog porasta stanica u G0/G1 fazi ($52,6 \% \pm 5,3$), te smanjenja stanica unutar G2/M faze ($15,6 \% \pm 8,5$) staničnog ciklusa u odnosu na kontrole.

Tablica 1. Udio HuT-78 stanica u fazama staničnog ciklusa obzirom na tretman 7-klorkinolin-benzoimidazolima

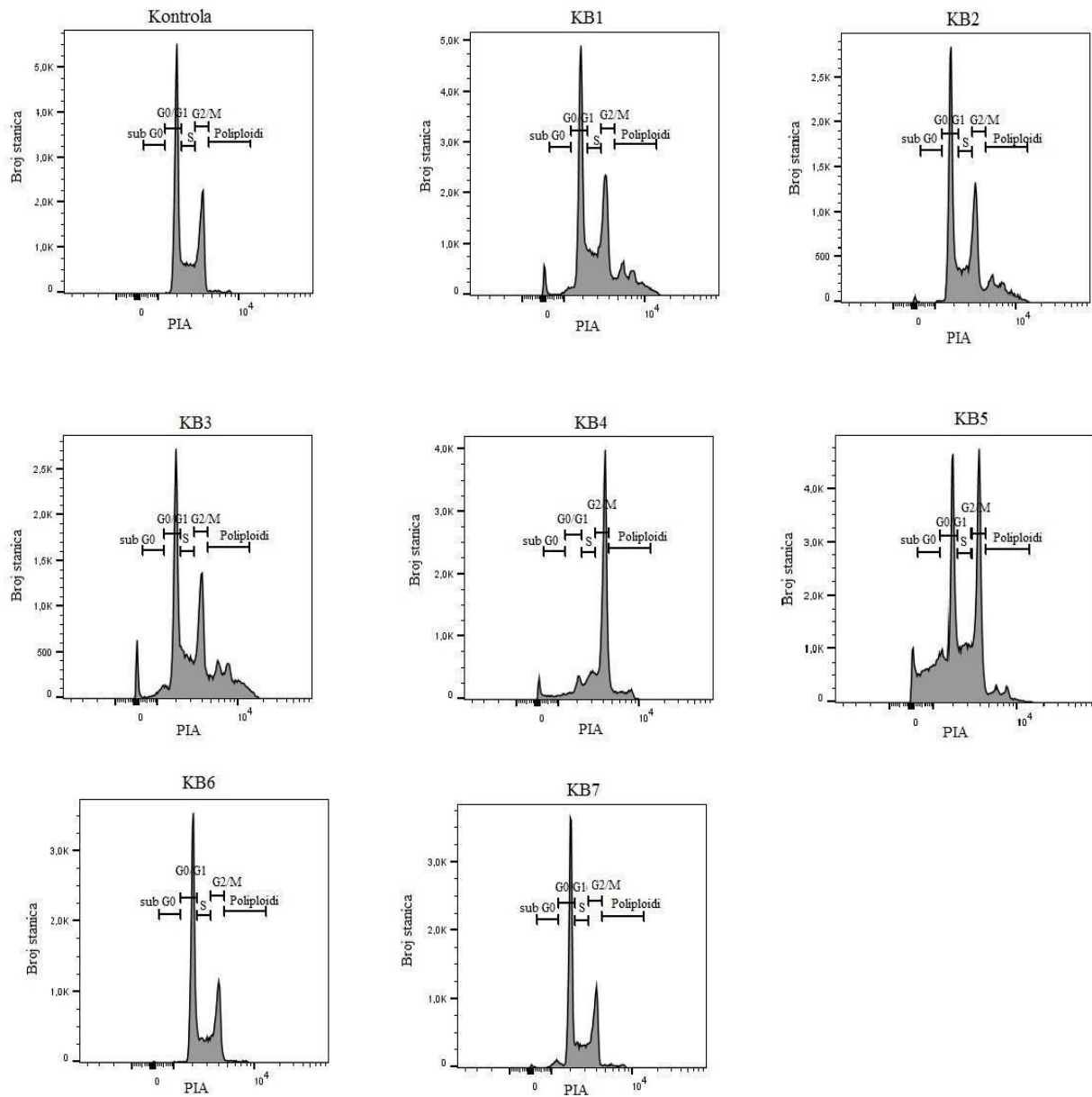
Stanična linija	Tretman	Stanice u sub G0 fazi (%)	Stanice u G0/G1 fazi (%)	Stanice u S fazi (%)	Stanice u G2/M fazi (%)	Poliploidi (%)
HuT-78	Kontrola	$0,3 \pm 0,01$	$47,8 \pm 1,6$	$17,4 \pm 0,5$	$31,1 \pm 1$	$2,8 \pm 0,1$
	KB1	$3,3 \pm 2^*$	$35,5 \pm 2,2^*$	$15,7 \pm 0,4$	$23 \pm 1,5^*$	$19,3 \pm 0,8^*$
	KB2	$0,6 \pm 0,2$	$39,2 \pm 3,7^*$	$14,3 \pm 1,3$	$25,4 \pm 2^*$	$19,4 \pm 3,1^*$
	KB3	$3,2 \pm 0,8^*$	$35 \pm 4,7^*$	$16,8 \pm 4,3$	$21,5 \pm 2,5^*$	$19,9 \pm 3,1^*$
	KB4	$4 \pm 2^*$	$9,2 \pm 0,02^*$	$12,4 \pm 0,8$	$60 \pm 2,1^*$	$11,3 \pm 0,9$
	KB5	$13,8 \pm 1,1^*$	$30,5 \pm 0,4^*$	$14,3 \pm 0,2$	$28,5 \pm 0,3$	$7,2 \pm 1,2$
	KB6	$0,6 \pm 0,1$	$52,7 \pm 0,6$	$15,5 \pm 0,1$	$28 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,1$
	KB7	$1,6 \pm 1,3$	$52,5 \pm 1,3$	$14,8 \pm 0,1$	$26,8 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,1$

(*) – statistička značajnost određena je Dunnett testom na razini $P < 0,05$

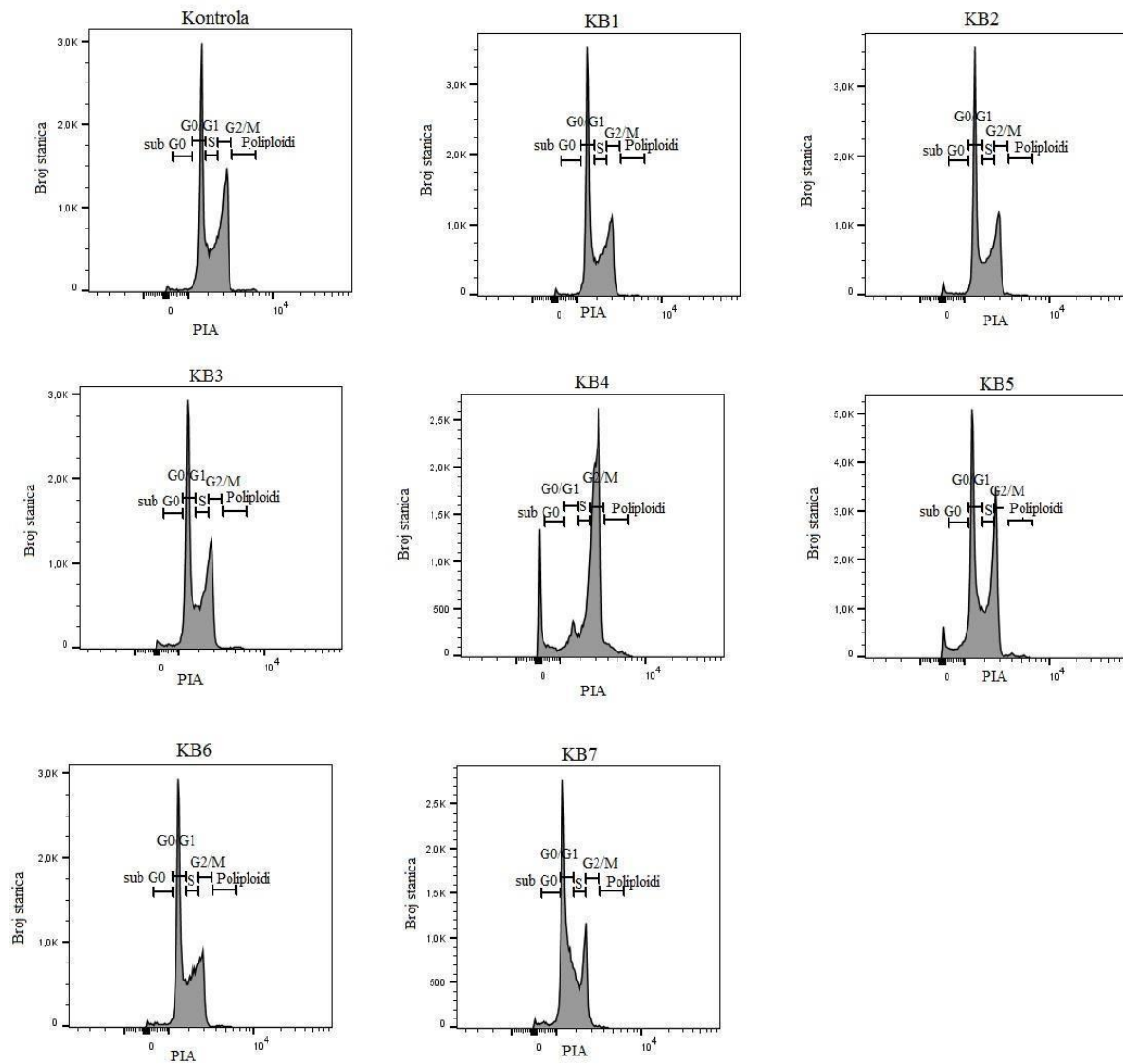
Tablica 2. Udio THP-1 stanica u fazama staničnog ciklusa obzirom na tretman 7-klorkinolin-benzoimidazolima

Stanična linija	Tretman	Stanice u sub G0 fazi (%)	Stanice u G0/G1 fazi (%)	Stanice u S fazi (%)	Stanice u G2/M fazi (%)	Poliploidi (%)
THP-1	Kontrola	2,5 ± 0,3	39,3 ± 2,8	20,4 ± 0,6	34 ± 3,3	1,9 ± 0,3
	KB1	2,3 ± 0,2	44,7 ± 4,7	21 ± 0,7	28,3 ± 4,7	1,6 ± 0,6
	KB2	3,3 ± 0,4	48,3 ± 1,6	23 ± 2,4	21,5 ± 4,1	1,4 ± 0,2
	KB3	4,3 ± 0,2	48,7 ± 1,2	23,8 ± 0,4	19,8 ± 0,4	1,4 ± 0,2
	KB4	7,2 ± 2,4*	8,7 ± 0,4*	13,3 ± 0,3	54,1 ± 4,2*	5,2 ± 0,5*
	KB5	8,5 ± 0,6*	43,6 ± 0,8	18,7 ± 5,8	23,6 ± 6,4	1,7 ± 0,3
	KB6	3,4 ± 0,3	47 ± 3,8	23,5 ± 1,4	22,7 ± 5,3	1,7 ± 0,4
	KB7	5,8 ± 2,6	52,6 ± 5,3*	23,2 ± 1	15,6 ± 8,5*	1 ± 0,3

(*) – statistička značajnost određena je Dunnett testom na razini P < 0,05



Slika 6. Stanični ciklus HuT-78 stanične linije. Histogrami prikazuju stanični ciklus kontrole te stanica nakon tretmana ispitivanim hibridima.



Slika 7. Stanični ciklus THP-1 stanične linije. Histogrami prikazuju stanični ciklus kontrole te stanica nakon tretmana ispitivanim hibridima.

6. RASPRAVA

Tumorska oboljenja, usprkos dosadašnjim saznanjima i dostignućima u primjeni novih pristupa u liječenju, ostaju glavna prijetnja zdravlju i smatraju se drugim vodećim uzrokom smrti na svijetu nakon kardiovaskularnih bolesti (17). Bolest nastaje uslijed mutacija koje dovode do nekontrolirane proliferacije stanica te posljedično nastanka monoklonalnih populacija stanica raka koje karakterizira neuređeni rast i metastaziranje. Daljnjom progresijom raka nastaju dodatne mutacije koje stanicama omogućuju preživljenje i brže širenje. Liječenje karcinoma kompleksan je proces koji može uključivati nekoliko oblika terapije: kirurško liječenje, liječenje radioterapijom te lijekovima. U kliničkoj praksi koristi se nekoliko tipova lijekova: kemoterapeutici koji uključuju citostatike i ciljne lijekove, te biološki lijekovi koji uključuju imunoterapiju, hormonalnu terapiju i terapiju temeljenu na nukleinskim kiselinama (18). Kemoterapija raka složena je i skupa te nerijetko neučinkovita zbog velike raznolikosti vrsta neoplazmi, nespecifičnosti lijekova, visoke razine toksičnosti te ograničenosti zbog rezistencije (19).

Sve veće znanje o molekularnoj složenosti raka i mehanizmima njihove rezistencije na lijekove, ukazuje da učinkovito liječenje zahtijeva višedimenzionalni pristup. Stoga nove strategije otkrivanja i razvoja kemoterapije usredotočene su na molekule koje istodobno djeluju na više ciljeva, što se postiže kombinacijom nekoliko lijekova ili kombiniranjem nekoliko aktivnih farmakofora povezanih u jedan hibrid molekula. Takve hibridne molekule različitih kemijskih struktura i funkcija mogu djelovati na više ciljeva uključenih u proliferaciju stanica raka, inducirati sinergijske učinke te posljedično savladati problem rezistencije i tako poboljšati učinkovitost terapije (4, 21).

Antitumorska svojstva kinolina i benzoimidazola pojedinačno su vrlo dobro istražena, dok su hibridi ovih dvaju molekula ispitani u znatno manjem broju istraživanja. Većina dosadašnjih istraživanja proučavala su njihova antimikrobna svojstva. Tako je hibrid benzimidazol-kinolin u istraživanju iz 2018. pokazao snažno antimikrobno djelovanje protiv rezistentnih *Pseudomonas Aeruginose* i *Candide Tropicalis* (22). Međutim, Dorina Mantu i suradnici u istraživanju iz 2016. godine ispitivali su antitumorsko djelovanje hibrida benzoimidazola i 8-aminokolina protiv renalnog karcinoma i karcinoma dojke, gdje je hibrid pokazao dobro i selektivno djelovanje sa inhibicijom rasta od 45% (19).

U ovom radu ispitivan je utjecaj sedam novosintetiziranih 7-klorkinolin-benzoimidazola na stanični ciklus humanog T-staničnog limfoma i monocitne leukemije gdje je uspoređivan njihov utjecaj na stanični ciklus u odnosu na stanični ciklus netretiranih stanica. Analizom rezultata protočne citometrije nađeno je da su se stanice nalazile u sub G₀, G₀/G₁, S, G₂/M fazi staničnog ciklusa, a nađen je i povećan udio poliploidnih stanica.

Poliploidi su takozvane gigantske stanice karcinoma koje sadrže jednu ili više jezgara (engl. PGCC – *Polyploid Giant Cancer Cells*). Mogu nastati prolaskom kroz alternativni stanični ciklus nazvan endoplukacijski stanični ciklus koji se može odvijati bez mitoze. U endoplukacijskom staničnom ciklsu stanice zadržavaju višestruko umnožen genom ili mogu ući u mitozu, koju ne uspjevaju dovršiti. U preglednom radu Amende i sur. iz 2019. godine sugerirano je da su PGCC stanice ključne za metastaziranje, stvaranje rezistencije te preživljavanje u teškim mikrookolišnim uvjetima tumora kao što su hipoksija, nizak pH i nedostupnost hranjivih tvari (23). Istraživanje iz 2016. utvrdilo je da gigantske stanice mogu nastati uslijed pada broja inicijalnih stanica raka uzrokovanog velikim stresom kao što je primjena citostatika. Poliploidne stanice zatim ponavljaju krug endoreplikacije nakon čega ponovo postaju sposobne ući u mitozu te stvaraju diploidne stanice kćeri sa preraspoređenim kromosomima punim translokacija i delecija (24).

U našem istraživanju u objema staničnim linijama prisutne su poliploidne stanice. Tretman derivatima KB1, KB2, KB3 je kod HuT-78 stanične linije doveo do značajnog povećanja udjela poliploida gdje je derivat KB1 povećao udio na 19,3 %, KB2 na 19,4 %, te KB3 na 19,9 %. Kod THP-1 stanične linije samo je derivat KB4 povećao udio poliploida na 5,2 %. Isti derivati značajno su promijenili distribuciju stanica u fazama staničnog ciklusa pa se razlog porasta broja poliploida može objasniti staničnim stresom uslijed primijenjene terapije, kao što su predložila prijašnja istraživanja, ili može biti način kojim stanice pokušavaju izbjeći terapiju, odnosno preživjeti. Povećanje broja poliploidnih stanica nakon tretmana derivatima KB1-KB3 može objasniti prisutno smanjen udio stanica unutar G₀/G₁ i G₂/M faze kod HuT-78 stanica.

Derivat KB4 je kod obje stanične linije doveo do nakupljanja stanica unutar G₂/M faze uz popratno povećanje stanica u sub G₀ fazi te smanjenje stanica unutar G₀/G₁ faze što ukazuje na spječavanje ulaska stanica u novi ciklus. Ovakav zastoj staničnog ciklusa u G₂/M fazi pokazali su u istraživanjima i drugi derivati benzoimidazola. Primjerice, tretman analogom nokodazola, primijenjen na HeLa i MDF-7 staničnim linijama, doveo je do

smanjenja stanica unutar G0/G1 i S faze te akumuliranja stanica u G2/M fazi (25). Mebendazol (metil-5-benzoil-2-benzimidazol-karbamat) primijenjen na trostruko negativnom karcinomu dojke također je doveo do zastoja staničnog ciklusa u G2/M fazi (26). Smatra se da određeni benzoimidazoli dovode do pojačane regulacije Ciklina B1 i Cdc-2 što dovodi do zaustavljanja mitotičke prometafaze te posljedično apoptoze stanica (25).

Tretman derivatom KB5 je kod obje stanične linije doveo do zaustavljanja staničnog ciklusa unutar sub G0 faze. Odnosno, došlo je do porasta broja stanica u mirovanju koje se ne dijele. Derivat KB7 je u THP-1 stanicama doveo do nakupljanja stanica u G0/G1 fazi te smanjenja stanica unutar G2/M faze što ukazuje na smanjenu proliferaciju.

Benzoimidazoli i klorkinolini te njihovi derivati pokazali su u ovom, i drugim istraživanjima, dobre antitumorske rezultate te su obećavajući pristup u razvoju novih strategija u liječenju karcinoma.

7. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog istraživanja, možemo zaključiti:

- Derivati KB1, KB2, KB3, KB4 i KB5 dovode do zaustavljanja staničnog ciklusa HuT-78 stanica
- Derivati KB4, KB5 i KB7 dovode do zaustavljanja staničnog ciklusa THP-1 stanica
- KB4 derivat zaustavlja stanični ciklus u G2/M fazi
- KB5 derivat zaustavlja stanični ciklus u sub G0 fazi
- KB6 derivat nije pokazao djelovanje na promjene u fazama staničnog ciklusa neovisno o staničnoj kulturi
- THP-1 stanična linija otpornija je na djelovanje 7-klorkinolin-benzoimidazola dok je HuT-78 osjetljivija

8. SAŽETAK

Uvod: Mnogi protutumorski lijekovi svoju aktivnost zasnivaju na zaustavljanju napredovanja stanice kroz stanični ciklus. Kako bismo stekli uvid u mehanizam djelovanja novosintetiziranih 7-klorkinolin-benzoimidazolnih hibrida ispitan je njihov utjecaj na proliferaciju odabranih tumorskih stanica.

Hipoteza: Novosintetizirani hibridi 7-klorkinolin-benzoimidazoli dovode do zaustavljanja stanica u određenoj fazi staničnog ciklusa

Cilj: Cilj istraživanja je odrediti promjene staničnog ciklusa u ovisnosti o staničnom tipu tretiranih stanica 7-klorkinolin-benzoimidazolnim hibridima.

Materijali i metode: U pokusu su korištene stanične linije limfoma (HuT-78) i leukemije (THP-1) te derivati 7-klorkinolin-benzoimidazola. Stanice su uzgojene u *in vitro* uvjetima te tretirane ispitivanim hibridima tijekom 24 sata. Nakon inkubacije, stanice su fiksirane i spremljene na -20°C do analize. Protočnom citometrijom određena je distribucija stanica po fazama staničnog ciklusa.

Rezultati: Derivati KB1-KB5 doveli su do značajne promjene distribucije HuT-78 stanica, dok su derivati KB4, KB5 i KB7 značajno promijenili distribuciju THP-1 stanica. Derivat KB6 ni u jednoj staničnoj liniji nije značajno utjecao na stanični ciklus.

Zaključak: Većina testiranih derivata dovodi do promjenjene distribucije stanica unutar staničnog ciklusa. HuT-78 stanice bolje reagiraju na terapiju hibridima.

Ključne riječi: klorkinolini, benzoimidazoli, stanični ciklus, stanice limfoma i leukemija

9. SUMMARY

Cell specific modulation of cell cycle by 7-chloroquinoline-benzimidazole hybrids

Introduction: Many anticancer drugs their activity base on stopping cell progression through the cell cycle. In order to get insight into the mechanism of action of newly synthesized 7-chloroquinoline-benzoimidazole hybrids on the suppression of tumor cell proliferation, it is necessary to examine the influence of derivatives on cell cycle distribution.

Hypothesis: Newly synthesized 7-chloroquinoline-benzoimidazole hybrids lead to cell arrest at a certain stage of the cell cycle.

Research objectives: The aim of the study is to determine the changes in the cell cycle depending on the cell type treated with 7-chloroquinoline-benzoimidazole hybrids.

Materials and methods: Lymphoma (HuT-78) and leukemia (THP-1) cell lines and 7-chloroquinoline-benzoimidazole derivatives were used in the experiment. Cells were grown *in vitro* and treated with derivatives for a period of 24 hours. After incubation, the cells were fixed and stored at -20°C until analysis. Distribution of cells through phases of cell cycle we determined by flow cytometry.

Results: KB1-KB5 derivatives led to a significant change in the distribution of HuT-78 cells, while KB4, KB5 and KB7 derivatives significantly changed the distribution of THP-1 cells. The KB6 derivative did not significantly affect the cell cycle in any cell line.

Conclusion: Most derivatives lead to a change in cell distribution within the cell cycle. HuT-78 cells respond better to hybrid therapy.

Key words: chlorquinolines, benzoimidazoles, cell cycle, lymphoma and leukemia cells

10. LITERATURA

1. Ghorab M, Alsaid M. Anti-breast cancer activity of some novel quinoline derivatives. *Acta Pharm.* 2015 Sep;65(3):271–83.
2. Begnini K, Duarte W, da Silva L, Buss J, Goldani B, i sur. Apoptosis induction by 7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides in triple negative breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2017 Jul;91:510–6.
3. Aboelnaga A, EL-Sayed T. Click synthesis of new 7-chloroquinoline derivatives by using ultrasound irradiation and evaluation of their biological activity. *Green Chemistry Letters and Reviews.* 2018;11(3):254–63.
4. Krstulović L, Stolić I, Jukić M, Opačak-Bernardi T, Starčević K, Bajić M, et al. New quinoline-arylamidine hybrids: Synthesis, DNA/RNA binding and antitumor activity. *Eur J Med Chem.* 2017 Sep 8;137:196–210.
5. Kaczmarek L, Peczyńska-Czoch W, Osiadacz J, Mordarski M, Sokalski W, Boratyński J, et al. Synthesis, and cytotoxic activity of some novel indolo[2,3-b]quinoline derivatives: DNA topoisomerase II inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 1999;7(11):2457–64.
6. Hranjec M, Kralj M, Piantanida I, Sedić M, Šuman L, Pavelić K, et al. Novel Cyano- and Amidino-Substituted Derivatives of Styryl-2-Benzimidazoles and Benzimidazo[1,2-a]quinolines. Synthesis, Photochemical Synthesis, DNA Binding, and Antitumor Evaluation, Part 3. *J Med Chem.* 2007;50(23):5696–711.
7. Walia R, Naaz S, Iqbal K, Lamba H. Benzimidazole derivatives - an overview. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry.* 2011;1(3):10.
8. Hranjec M, Karminski-Zamola G. Ciklički derivati benzimidazola i njihovo antitumorsko djelovanje. *Kemija u industriji : Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske.* 2008 Jun 6;57(6):299–306.
9. Spasov A, Yozhitsa I, Bugaeva L, Anisimova V. Benzimidazole derivatives: Spectrum of pharmacological activity and toxicological properties (a review). *Pharm Chem J.* 1999 May 1;33(5):232–43.

10. Shrivastava N, Naim M, Alam M, Nawaz F, Ahmed S, Alam O. Benzimidazole Scaffold as Anticancer Agent: Synthetic Approaches and Structure-Activity Relationship: Benzimidazole Scaffold as Anticancer Agent. *Arch Pharm Chem Life Sci.* 2017 Jun;350(6):e201700040.
11. Błaszczak-Świątkiewicz K, Mikiciuk-Olasik E. Some characteristics of activity of potential chemotherapeutics – benzimidazole derivatives. *Advances in Medical Sciences.* 2015 Mar;60(1):125–32.
12. Cooper G, Hausman R. *Stanica: Molekularni pristup. 5.izdanje.* Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
13. Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol.* 1998 Nov;35(6):461–78.
14. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology.* 2017 Feb 17;37(2):163–76.
15. Ochatt S. Flow cytometry (ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus). *Flow cytometry.* 2006;13.
16. Addinsoft, New York, USA. XLSTAT statistical and data analysis solution [Internet]. XLSTAT, Your data analysis solution. 2021. Available from: <https://www.xlstat.com>
17. Jemal A, Center M, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Aug;19(8):1893–907.
18. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. *Klinička onkologija.* 2013.
19. Mantu D, Antoci V, Moldoveanu C, Zbancioc G, Mangalagiu I. Hybrid imidazole (benzimidazole)/pyridine (quinoline) derivatives and evaluation of their anticancer and antimycobacterial activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 2016 Nov 2;31(sup2):96–103.
20. El-Gohary N, Shaaban M. Synthesis and biological evaluation of a new series of benzimidazole derivatives as antimicrobial, anti-quorum-sensing and antitumor agents. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2017 May 5;131:255–62.

21. Szumilak M, Wiktorowska-Owczarek A, Stanczak A. Hybrid Drugs—A Strategy for Overcoming Anticancer Drug Resistance? *Molecules*. 2021 Apr 29;26(9):2601.
22. Wang Y, Bheemanaboina R, Gao W, Kang J, Cai G, Zhou C-H. Discovery of Benzimidazole-Quinolone Hybrids as New Cleaving Agents toward Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* DNA. *ChemMedChem*. 2018 May 23;13(10):1004–17.
23. Amend S, Torga G, Lin K, KostECKa L, Marzo A, Austin R, et al. Polyploid giant cancer cells: Unrecognized actuators of tumorigenesis, metastasis, and resistance. *Prostate*. 2019 Aug 2;23877.
24. Niu N, Zhang J, Zhang N, Mercado-Urbe I, Tao F, i sur. Linking genomic reorganization to tumor initiation via the giant cell cycle. *Oncogenesis*. 2016 Dec;5(12):e281–e281.
25. Zuo D, Jiang X, Han M, Shen J, Lang B, Guan Q, et al. Methyl 5-[(1H-indol-3-yl)selanyl]-1H-benzoimidazol-2-ylcarbamate (M-24), a novel tubulin inhibitor, causes G2/M arrest and cell apoptosis by disrupting tubulin polymerization in human cervical and breast cancer cells. *Toxicology in Vitro*. 2017 Aug;42:139–49.
26. Zhang L, Bochkur Dratver M, Yazal T, Dong K, Nguyen A, i sur. Mebendazole Potentiates Radiation Therapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2019 Jan 1;103(1):195–207.

11. ŽIVOTOPIS

Ivana Janić rođena je 15.6.1997. godine u Zagrebu. Nakon završenog osnovnog obrazovanja u OŠ Antun Nemčić Gostovinski, godine 2012. upisuje smjer Opće gimnazije Fran Galović u Koprivnici. Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike upisuje 2016. godine na Medicinskom fakultetu u Osijeku, te po završetku upisuje diplomski studij istoga smjera 2019. godine.