

# Antiproliferativna aktivnost novosintetiziranih 3- i 5-supstituiranih rodanina na tumorske stanice

---

Mihaljević, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:152:724969>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Luka Mihaljević**

**ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST  
NOVOSINTETIZIRANIH 3- I 5-  
SUPSTITUIRANIH RODANINA NA  
TUMORSKE STANICE**

**Završni rad**

**Osijek, 2022.**

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

**Luka Mihaljević**

**ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST  
NOVOSINTETIZIRANIH 3- I 5-  
SUPSTITUIRANIH RODANINA NA  
TUMORSKE STANICE**

**Završni rad**

**Osijek, 2022.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kulturu stanica pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku.

Mentor: doc. dr. sc. Marijana Leventić

Rad ima 23 lista i 10 slika.

## ZAHVALA

*Velike zahvale upućujem mentorici doc. dr. sc. Marijani Leventić na pruženoj prilici za mentorstvo izrade završnog rada, predloženoj temi, suradnji i velikoj pomoći od početka do kraja same izrade ovoga rada. Hvala na svemu, bez Vas izrada ovoga rada ne bi bila laka.*

*Također se zahvaljujem i višoj tehničarki univ.bacc.med.lab.diagn. Ivani Jelavić, na prenesenim praktičnim i teorijskim znanjima i vještinama o radu u Laboratoriju za kulturu stanica te utrošenom vremenu tijekom suradnje.*

*Zatim se zahvaljujem svim profesorima, asistentima i kolegama što su učinili moj preddiplomski studij jednim predivnim iskustvom, hvala im za svo preneseno znanje, životne lekcije, a ponekad i vic.*

*Na kraju se želim zahvaliti svim prijateljima koji su mi bili podrška u studiranju i tijekom njega, ali najveću zahvalu dugujem svojim roditeljima bez čije podrške moje studiranje ne bi bilo lako te je ovaj rad jednim dijelom plod njihovog vjerovanja u mene i njihove podrške.*

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1 Rodanini i derivati rodanina .....	1
1.2. Kultura stanica i uzgoj .....	2
1.3. Tumorske stanice i uzroci .....	3
1.4. Metode određivanja citotoksičnosti .....	5
1.4.1. Test redukcije tetrazolijumom – MTT .....	5
2. HIPOTEZA .....	7
3. CILJ .....	8
4. MATERIJALI I METODE .....	9
4.1. Ustroj studije.....	9
4.2.1. Materijali.....	9
4.2.2. Uzgoj i održavanje kulture stanica <i>in vitro</i> .....	9
4.2.3. Određivanje vijabilnih stanica u kulturi .....	9
4.3. Procjena stanične proliferacije MTT testom .....	10
4.4. Statističke metode .....	11
5. REZULTATI.....	12
6. RASPRAVA .....	16
7. ZAKLJUČAK .....	18
8. SAŽETAK .....	19
9. SUMMARY .....	20
10. LITERATURA.....	21
11. ŽIVOTOPIS .....	23

## **POPIS KRATICA**

ATP – adenzin trifosfat

DMEM – Dulbecov modificirani medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO – dimetilsulfoksid

DNK – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

FBS – fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*)

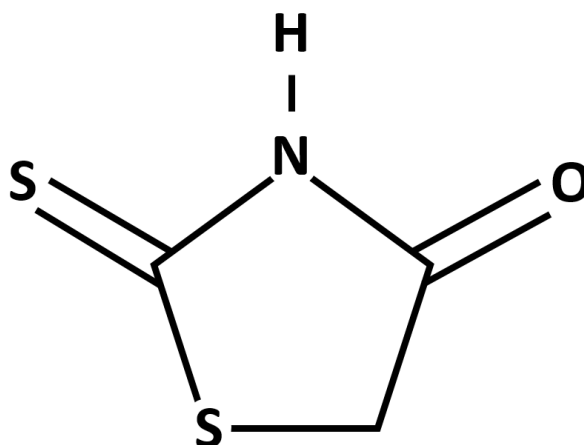
LDH – laktat dehidrogenaza

SAR – odnosi strukture i aktivnosti (engl. *structure-activity relationship*)

## 1. UVOD

### 1.1 Rodanini i derivati rodanina

Rodanini pripadaju skupini heterocikličkih derivata, kemijskog naziva 2-tiokso-4-tiazolidin (prema IUPAC-u: 2-sulfaniliden-1,3-tiazolidin-4-on), za koje je pronađeno da pokazuju antitumorsko djelovanje u ovisnosti o supstituiranom radikalu. Monomeri rodanina s kemijskom formulom  $C_3H_3NOS_2$  dobiveni su iz tiazolidina te s obzirom da okosnicu rodanina čini tiazolidinski prsten, zbog svoje je biološke aktivnosti postao jedan od najzanimljivijih heterocikličkih prstenova za istraživanje (1) (Slika 1.). Posljednjih deset godina kontinuirano raste broj znanstvenih publikacija i patenata baziranih na rodaninima koji opisuju široki spektar bioloških aktivnosti, a vrhunac je bio 2014. godine s 341 publikacijom (2).



Slika 1. Strukturna formula rodanina (izradio Luka Mihaljević)

Zbog sve većeg istraživanja lijekova i farmaceutskih proizvoda, rodanini su se našli kao jedan od zanimljivijih spojeva pogodnih za manipulaciju u svrhu sinteze derivata sa biološkim učinkom. Derivati rodanina pokazuju velike učinke ponajprije u antitumorskim aktivnostima, zatim u antidijabetičkim, antibakterijskim, antifungalnim, antimikobakterijskim i još mnogim drugim aktivnostima (2,3). Analizom protutumorskog djelovanja novosintetiziranih derivata rodanina, utvrđeno je da 5-benziliden-3-etil-rodanin djeluje na replikaciju deoksiribonukleinske kiseline (DNK) i potiče staničnu smrt apoptozom induciranjem blokade tijekom G0/G1 staničnog ciklusa. To pokazuje važnost prisutnosti benzilidenske skupine na poziciji C-5 rodanina. Također je dokazano antitumorsko djelovanje N-supstituiranih rodanina na K562 leukemijskoj staničnoj liniji. Analiza staničnog ciklusa zaključila je da N-supstituirani rodanini



utječu na replikaciju DNK i uzrokuju nakupljanje stanica u G0 fazi ciklusa. To rezultira odbacivanjem G2/M, G1 i S faza, što dovodi do programirane stanične smrti apoptozom (4).

## 1.2. Kultura stanica i uzgoj

Nezaobilazni dio proučavanja i istraživanja stanica u današnje doba predstavlja kultura stanica. To je opći pojam u molekularnoj i staničnoj biologiji te biotehnologiji i biomedicini koji predstavlja izolirane stanice, tkiva ili organa porijeklom iz čovjeka ili životinje, i njihov uzgoj u kontroliranim uvjetima (5). Kako bi se kultura stanica mogla održavati, potrebno joj je omogućiti odgovarajuće fizikalno-kemijske (temperatura, osmotski tlak, pH, tlak O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>) i fiziološke (faktor rasta, hormoni) uvjete, kao i medij za uzgoj stanica nutritivno optimiziran za uzgoj pojedinih staničnih kultura (6). Mnoga istraživanja temeljena su na ovoj metodi poput biologije stanica tumora i matičnih stanica, potpomognute izvantjelesne oplodnje, proizvodnje cjepiva, genske terapije te razvoj lijekova (5).

Početak i temelje kulture stanica postavio je Ross Harrison 1907. godine kada je zabilježio rast i održavanje živčane stanice izolirane iz žabljeg embrija. Njegovi sljedbenici odlučili su pokušati otići korak dalje te kultivirati stanice sisavaca da bi 1952. godine George Gey i suradnici uspjeli kultivirati humane tumorske stanice, danas poznate kao HeLa stanice (6).

Primarna kultura uspostavlja se izolacijom stanice iz tkiva i proliferiranjem u odgovarajućim uvjetima, taj stadij kulture odražava realnu funkciju stanica u organizmu. Stanice kada dosegnu konfluentnost moraju se subkulturirati prijenosom u novu posudu sa svježim medijem za rast kako bi se osiguralo više prostora za nastavak rasta. Nakon prve subkulture, primarna kultura postaje poznata kao stanična linija ili sekundarna kultura. Stanične linije dobivene iz primarnih kultura imaju ograničen životni vijek, a kako se subkultiviraju, prevladavaju stanice s najvećim kapacitetom rasta, što rezultira stupnjem genotipske i fenotipske ujednačenosti u populaciji. Ako je subpopulacija stanične linije pozitivno odabrana iz kulture kloniranjem ili nekom drugom metodom, ova stanična linija postaje stanični soj. (6).

Normalne stanice obično se dijele samo ograničen broj puta prije nego što izgube svoju sposobnost dijeljenja, što je genetski uvjetovan događaj poznat kao starenje. Ove stanične linije poznate su kao konačne. Međutim, neke stanične linije postaju besmrtno kroz proces koji se

naziva transformacija, koja se može dogoditi spontano ili može biti kemijski ili virusno potaknuta. Kada konačna stanična linija doživi transformaciju i stekne sposobnost neograničene diobe, ona postaje kontinuirana stanična linija (6).

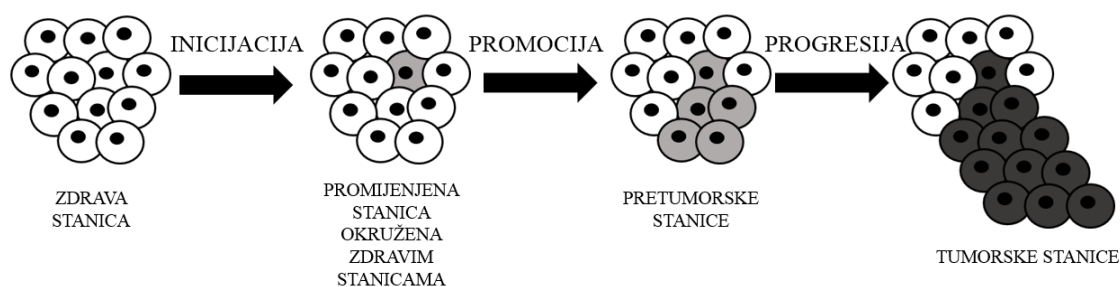
Prema načinu rasta i uzgoja stanica razlikujemo dvije vrste staničnih kultura, adherentne i suspenzijske stanice. Adherentne stanice rastu u monosloju u kontaktu s nabijenom tretiranom podlogom. Sam uzgoj adherentnih /prijanjajući stanica zahtjeva odvajanje stanica od podloge koje se najčešće izvodi pomoću enzima. Za razliku od adherentnih, suspenzijske stanice rastu neovisno o podlozi te ih je jednostavnije subkultivirati oduzimanjem stanične suspenzije i/ili dodavanjem svježeg medija. Prikladno je za sve vrste stanica, uključujući i primarne kulture, posudu s kulturom tkiva /stanica tretirati u kontroliranim uvjetima te se zatim koriste za citologiju, kontinuirano sakupljanje proizvoda i mnoge istraživačke primjene (6).

### 1.3. Tumorske stanice i uzroci

Tumorske stanice razlikuju se od normalnih zdravih stanica u procesu proliferacije i staničnog signaliziranja. Ne reagirajući na prestanak proliferacije, one se neprestano dijele i nekontrolirano rastu, šireći se u tkiva i organe, a naposljetku i po čitavom tijelu. Tumori svojim rastom mogu potiskivati okolne dijelove tijela u odnosu na onaj dio tijela gdje se tumor razvio, a razvijajući svoju vlastitu opskrbu krvi stvaranjem vlastitih krvnih žila (angiogeneza), oduzimajući potrebne hranjive tvari domaćinu. Tumorske stanice gube kontrolu rasta zbog nakupljanja poremećaja u različitim regulacijskim sustavima zaduženima za rast i apoptozu, što se može vidjeti i u *in vitro* uvjetima kulture stanica. Razlika normalnih i tumorskih stanica je u inhibiciji rasta stanice ovisne o gustoći, gdje tumorske stanice ne prestaju sa svojim rastom te ne staju u G0 fazi staničnog ciklusa. Zbog velikog broja tumora, najbolji način razlikovanja istih je podjela na benigne (dobročudne) i maligne (zloćudne) tumore. Naime, ključna razlika između benignih i malignih tumora je u tome što benigni tumori ostaju ograničeni na mjestu gdje su nastali i mogu se kirurški odstraniti. Za razliku od benignih tumora, maligni tumori se mogu lako proširiti na okolno zdravo tkivo i na kraju se proširiti po cijelom tijelu kroz cirkulacijski i limfni sustav (metastaze). Maligni tumori često se ne mogu ukloniti lokalnim liječenjima i tretmanima (7).

Promatrajući nastanak tumora na staničnoj razini, predstavlja više stupanjski proces, a uključuje mutacije i selekciju stanica sa sve izraženijim mogućnostima širenja, preživljavanja,

proliferacije i metastaziranja. Kao prvi korak smatra se inicijacija tumora koja je rezultat genetičke promjene koja dovodi do abnormalne proliferacije jedne jedine stanice. Prekomjernom proliferacijom monoklonske populacije tumorskih stanica dolazi do progresije tumora gdje se nastavlja nakupljanje dodatnih mutacija u populaciji tumorskih stanica (Slika 2). Neke stanice postaju dominantno selektivne zbog svojih svojstava preživljavanja i brzine rasta te se taj proces naziva klonska selekcija. Navedeni je proces u tumorskim stanicama stalno prisutan i zbog toga stanice postepeno sve brže rastu i postaju sve zloćudnije (7).



Slika 2. Stupnjevi nastanka tumora (sliku izradio Luka Mihaljević)

Karcinogeni su tvari koji uzrokuju tumore. Istraživanja bazirana na pokusnim životinjama i epidemiološkom analizom otkrivene su učestalosti pojedinih vrsta tumora u određenim populacijama ljudi. Kako je nastanak tumora složeni proces u više koraka, ne možemo reći da karcinogeni direktno utječu na pojavu zloćudne bolesti, ali utječu na vjerojatnost pojave i razvoja tumora. Zračenje i mnogi kemijski karcinogeni djeluju na oštećenje DNK i induciraju mutacije, a karcinogeni koji pridonose pojavi tumora u ljudi su Sunčevo ultraljubičasto zračenje, kemikalije iz duhanskog dima (benzo( $\alpha$ )piren, dimetilnitrozamin, spojevi nikla), aflatoksin itd (7).

Druga vrsta karcinogena su promotori tumora. Ne uzrokuju mutacije, ali mogu izazvati rak stimulirajući proliferaciju stanica. Hormoni su također važni pokretači tumora. Na primjer, prekomjerna uporaba estrogena kao hormonske terapije može značajno povećati vjerojatnost razvoja raka maternice ili dojke. Naposljetku imamo virusne i bakterijske uzročnike karcinogeneze. Od virusnih to su virus hepatitisa B i C (tumor jetre), papilomavirusi (rak grlića maternice), Epstein-Barrov virus (Burkittov limfom i karcinom nazofarinska) te ljudski T-stanični limfotropni virus (T stanična leukemija odraslih). Jedan od najčešćih bakterijskih uzročnika je *Helicobacter pylori* koji uzrokuje rak želudca (7).

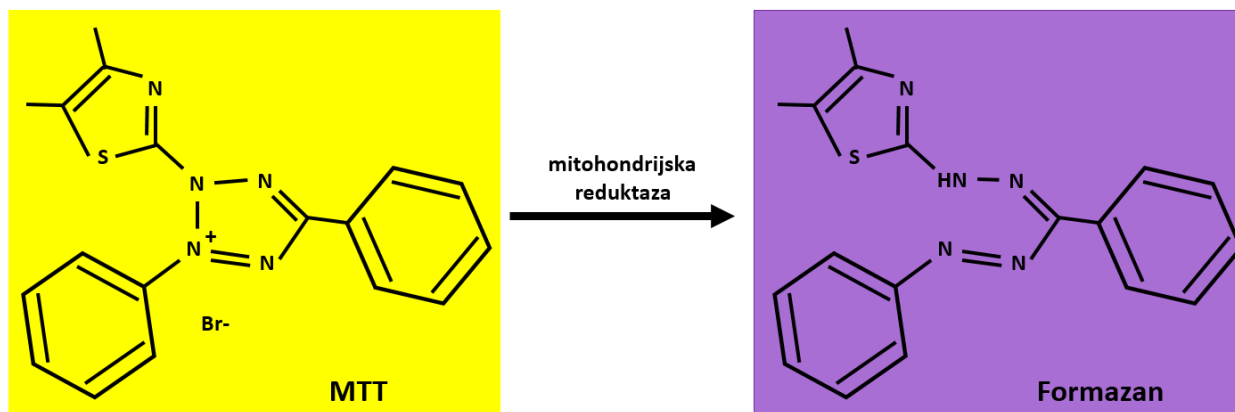
## 1.4. Metode određivanja citotoksičnosti

Stanična citotoksičnost odnosi se na sposobnost određenih kemikalija ili stanica medijatora da unište žive stanice. Korištenjem citotoksičnog spoja, zdrave žive stanice mogu se potaknuti na nekrozu (slučajna stanična smrt) ili apoptozu (programirana stanična smrt). Sposobnost preciznog mjerenja citotoksičnosti pokazao se kao vrlo dobar alat u identificiranju spojeva koji bi mogli predstavljati određene zdravstvene rizike kod ljudi. To može biti od vitalne važnosti tijekom faze istraživanja razvoja novih farmaceutskih proizvoda kako bi se osigurala sigurnost krajnjih korisnika. Mjerenje stanične citotoksičnosti također se pokazalo vrlo nezamjenjivim u procesu razvoja terapijskih lijekova protiv tumora. Određivanjem razine citotoksičnosti stanica tumora, lijekovi protiv njih mogu spriječiti proliferaciju ciljnih stanica bilo miješanjem s njihovim genetskim materijalom ili blokiranjem hranjivih tvari koje su stanici potrebne za preživljavanje. Nadalje, razumijevanje mehanizama uključenih u citotoksičnost također može dati istraživačima dublje znanje o biološkim procesima (normalnim i abnormalnim) koji upravljaju rastom, proliferacijom i smrću stanica (8).

Iako se može mjeriti na više različitih načina, procjena vitalnosti stanica korištenjem vitalnih boja (formazanskih boja), biomarkera proteaze ili mjerenjem sadržaja adenozin trifosfata (ATP) su neke od najčešće korištenih metoda u određivanju citotoksičnosti. Formazanske boje su kromogeni produkti koji nastaju redukcijom tetrazolijevih soli dehidrogenazama, kao što je laktat dehidrogenaza (LDH) i reduktaze koje se oslobađaju kod smrti stanice (8).

### 1.4.1. Test redukcije tetrazolijumom – MTT

Određivanje stanične vijabilnosti moguće je odrediti korištenjem MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) testa. MTT test bazira se na redukciji tetrazolijevih soli u crveno-ljubičasti formazan (Slika 3). Intenzitet obojenja nakon otapanja formazanskih kristalića u organskom otapalu razmjernan je količini živih metabolički aktivnih stanica (9,10).



Slika 3 Pretvorba MTT-a u formazan (sliku izradio Luka Mihaljević)

## 2. HIPOTEZA

Derivati rodanina smanjuju proliferaciju stanica u ovisnosti o koncentraciji i staničnoj liniji.

### 3. CILJ

Cilj istraživanja je odrediti antiproliferativnu aktivnost derivata rodanina na tumorskim stanicama.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Rad je ustrojen kao pokusno (eksperimentalno) istraživanje koje je odobrilo Etičko povjerenstvo Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku Medicinskog fakulteta Osijek 29. travnja 2022. godine.

#### 4.2.1. Materijali

U radu se ispitao učinak 3- ; 5- supstituiranih derivata rodanina na:

- HeLa stanicama (adenokarcinom vrata maternice)
- Caco-2 stanicama (adenokarcinom debelog crijeva)
- MRC-5 normalnim stanicama fibroblasta

Derivati su sintetizirani na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku, te su pripremljeni za analizu otapanjem u dimetilsulfoksidu (DMSO) u koncentraciji od 0,01 mol/L.

#### 4.2.2. Uzgoj i održavanje kulture stanica *in vitro*

Adherentne HeLa, Caco-2 i MRC-5 stanice uzgojene su u DMEM (Dulbecco modificirani Eagle medij) mediju obogaćenim sa 10 % FBS-om (fetalni goveđi serum), 2 mM glutaminom i 100U/0,1mg penicilin/streptomycin. Stanice su inkubirane u CO<sub>2</sub> inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pri 37°C /5 % CO<sub>2</sub> uz visoku vlažnost.

#### 4.2.3. Određivanje vijabilnih stanica u kulturi

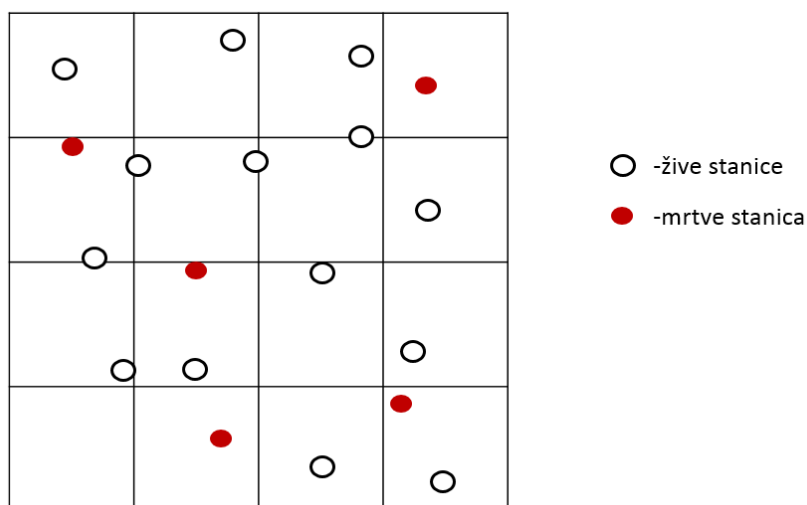
Prije izvođenja testa je utvrđen broj vijabilnih stanica u kulturi. Vijabilnost stanica određena je bojenjem stanica s eritrozinskom bojom (Sigma-Aldrich, Velika Britanija) i brojanje pod invertnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka) u Bürker-Türkovoj komorici (Slika 4). Žive stanice zbog svoje očuvane stanične membrane ne dopuštaju ulazak boje u stanicu i ostaju



nebojene. Za razliku od njih, mrtve stanice zbog oštećene membrane poprimaju crveno obojenje. Žive stanice prebrojane su unutar četiri kvadranta te je ukupan broj vijabilnih stanica određen prema formuli:

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

gdje je R ukupan broj vijabilnih stanica, a N broj živih stanica određen u Bürker-Türkovoju komorici. Broj 4 označava broj polja u komorici, a broj 3 faktor razrjeđenja.



Slika 4. Princip brojenja stanica u Bürker-Türkovoju komorici (sliku izradio Luka Mihaljević)

### 4.3. Procjena stanične proliferacije MTT testom

Kolorimetrijskim MTT testom mjeri se aktivnost grupe enzima dehidrogenaza u živim stanicama. Adherentne stanice nasađene su na pločicu sa 96 jažica ravnog dna u koncentraciji od  $2 \times 10^4$  st/ml. Stanice su inkubirane na  $37^\circ\text{C}$  kroz 24 sata u  $\text{CO}_2$  inkubatoru. Na prvi dan testa stanice su tretirane sa testnim derivatima u različitim koncentracijama ( $1 \times 10^{-4}$  i  $1 \times 10^{-5}$  mol/L). Po završetku vremena inkubacije na stanice je dodano 5mg/mL MTT otopine. MTT-formazan kristalići otopljeni su u DMSO-u. Intenzitet nastalog obojenja izmjeren je na čitaču mikroploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) na 595 nm.

Postotak živih stanica u određenoj jažici izračunat je prema formuli:  $\% = (A_{\text{tretman}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{blank}}) \times 100$ , te se time interpretira koliko je određeni spoj utjecao na stanice.

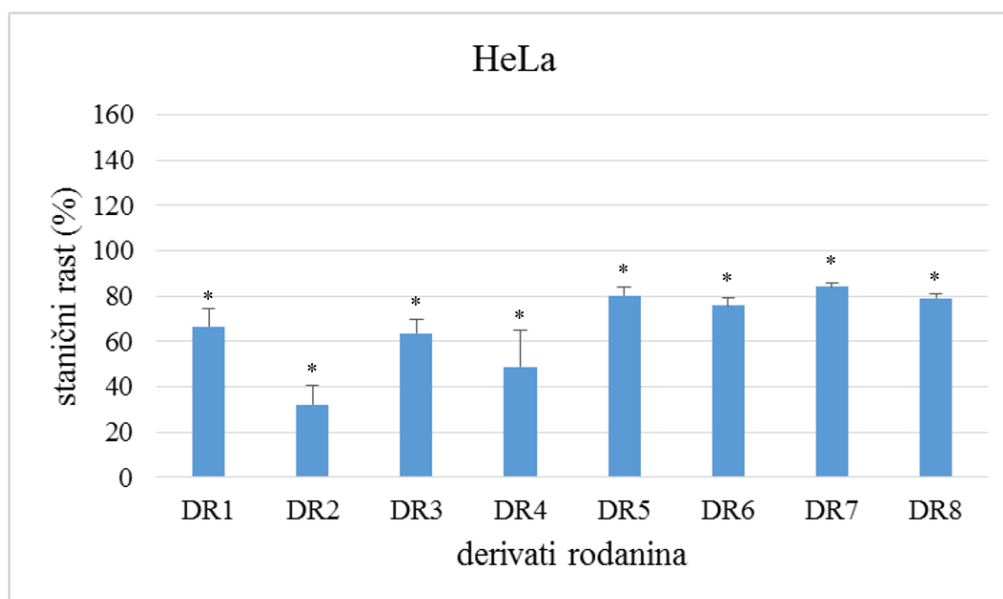
### 4.4. Statističke metode

Biološki eksperimenti antiproliferativne aktivnosti prikazani su kao aritmetička sredina sa standardnom pogreškom. Primijenjen je neparametrijski test Mann-Whitney uz statističku značajnost  $P < 0,05$ . Statistička analiza podataka povedena je pomoću statističkog programa XLSTAT za Windows operativne sustave.

## 5. REZULTATI

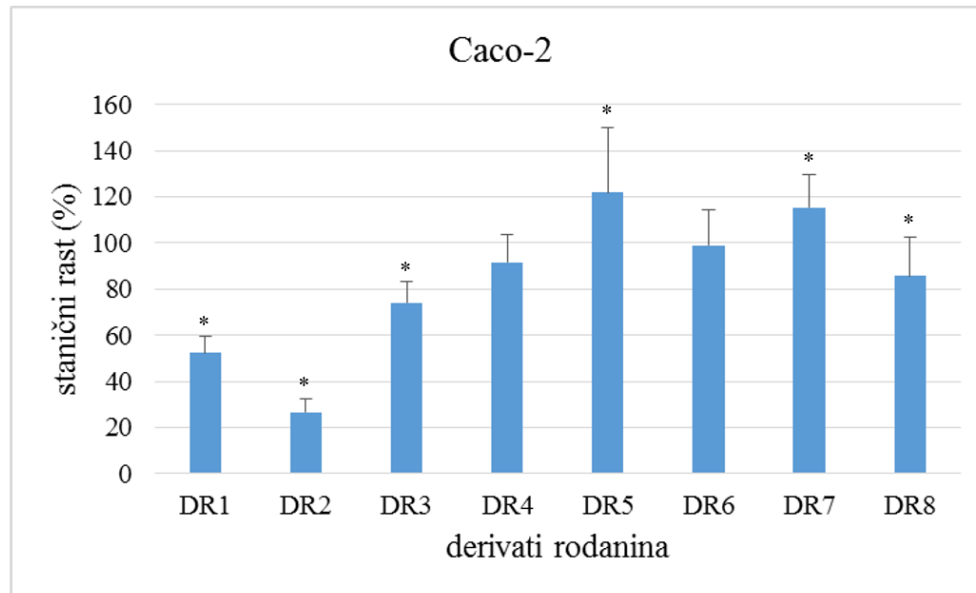
Antiproliferativni učinak osam rodaninskih derivata (DR1 - DR8) testiran je na tri stanične linije (HeLa, Caco-2, MRC-5). Rezultati ispitivanja antiproliferativne aktivnosti derivata prikazani su na slikama od 5 do 7. Svi testni spojevi ispitani su na spomenutim staničnim linijama u koncentraciji od  $10^{-4}$  mol/L. Derivat DR2 ima statistički značajan učinak u svim staničnim linijama te je njegovo ispitivanje napravljeno i u koncentraciji od  $10^{-5}$  mol/L. Antiproliferativna aktivnost procijenjen je primjenom MTT testa. Aritmetička sredina dobivenih rezultata uz standardnu devijaciju ( $\Delta \pm SD$ ) triju nezavisnih ponavljanja u triplikatu grafički je prikazana. Granica statističke značajnosti ( $P < 0,05$ ) označena je (\*).

Ispitivanje derivata rodanina na HeLa staničnoj liniji pri koncentraciji od  $10^{-4}$  mol/L pokazalo se da svi derivati imaju statistički značajanu antiproliferativnu aktivnost (Slika 5). Najveću inhibiciju staničnog rasta pokazao je DR2 sa inhibicijom od oko 70 %. Iza njega je DR4 sa inhibicijom staničnog rasta od oko 50 %. Derivati DR1 i DR3 pokazuju podjednako djelovanje od oko 40 % stanične inhibicije, kao i DR5-DR8 sa oko 20 % inhibicije.



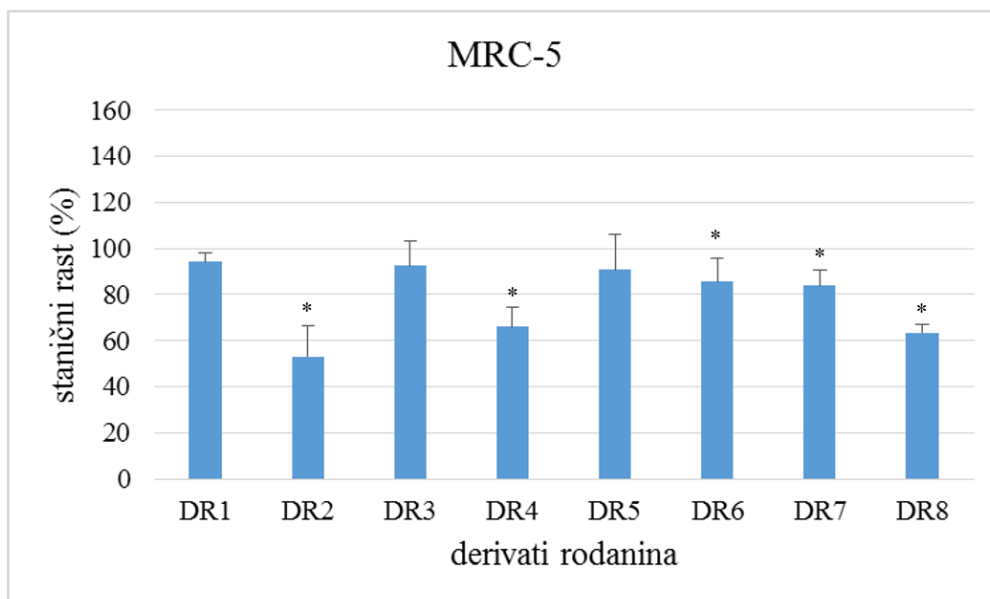
Slika 5. Antiproliferativna aktivnost derivata rodanina (DR1 – DR8) na HeLa staničnu liniju. Djelovanje derivati rodanina određeno je MTT teston nakon 72 sata u koncentraciji od  $1 \times 10^{-4}$  mol/L. Primijenjen je Mann-Whitney test sa granicom statističke značajnosti ( $P < 0,05$ ) koja je označena kao (\*).

Na staničnoj liniji Caco-2, derivati rodanina DR1 i DR2 u koncentraciji od  $10^{-4}$  mol/L pokazali su najveću inhibiciju stanica, gdje je DR2 inhibirao gotovo 80 % rasta Caco-2 stanica (Slika 6). Derivati DR5 – DR8 ne pokazuju inhibiciju rasta stanica.



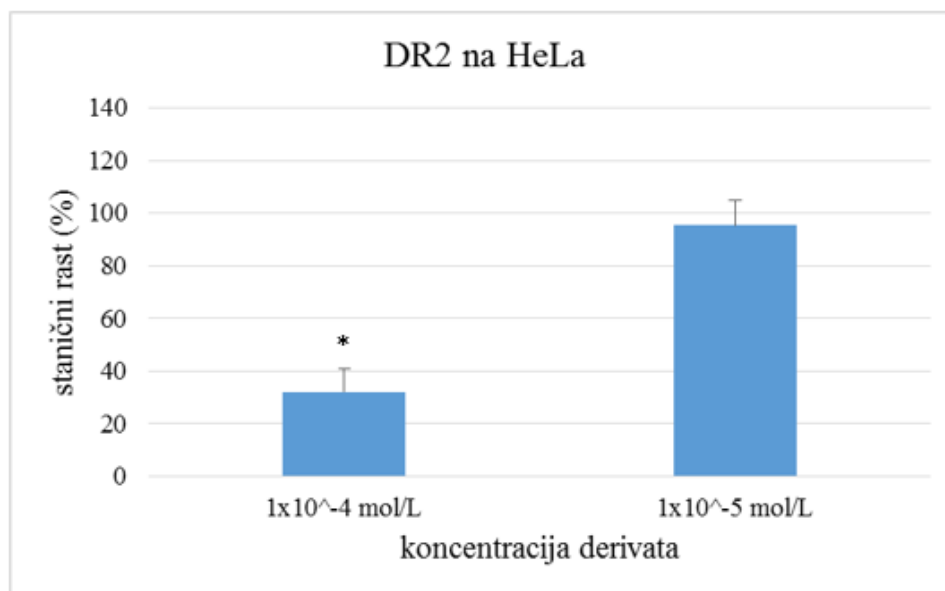
Slika 6. Antiproliferativna aktivnost derivata rodanina (DR1 – DR8) na Caco-2 staničnu liniju. Djelovanje derivata rodanina određeno je MTT testom nakon 72 sata u koncentraciji od  $1 \times 10^{-4}$  mol/L. Primijenjen je Mann-Whitney test sa granicom statističke značajnosti ( $P < 0,05$ ) koja je označena kao (\*).

Na MRC-5 staničnoj liniji DR2 pokazuje najveću inhibiciju od oko 50 %, dok su derivati DR4 i DR8 inhibirali rast za oko 30 %. Derivati DR6 i DR7 pokazuju sličnu postotnu inhibiciju od oko 10 %, za razliku od DR1, DR3 i DR5 koji nisu pokazali nikakvu inhibiciju (Slika 7).

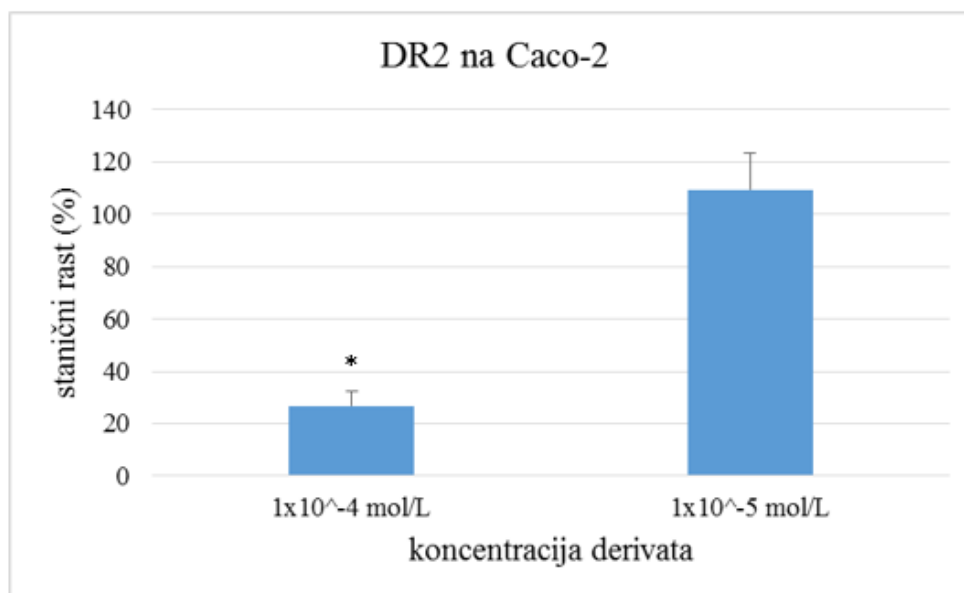


Slika 7. Antiproliferativna aktivnost derivata rodanina (DR1 – DR8) na MRC-5 staničnu liniju. Djelovanje derivata rodanina određeno je MTT testom nakon 72 sata u koncentraciji od  $1 \times 10^{-4}$  mol/L. Primijenjen je Mann-Whitney test sa granicom statističke značajnosti ( $P < 0,05$ ) koja je označena kao (\*).

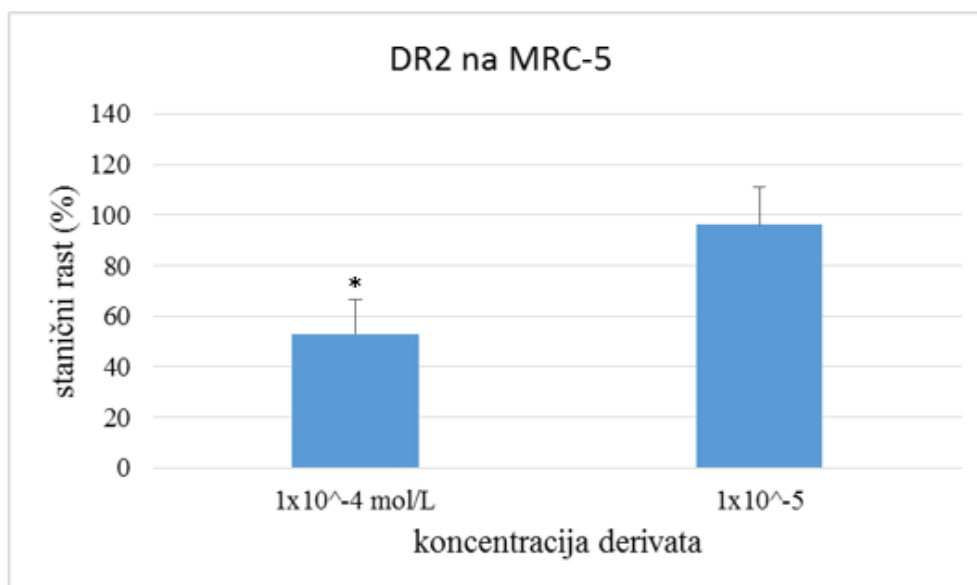
Prošireno testiranje derivata DR2 na nižu koncentraciju od  $1 \times 10^{-5}$  mol/L nije pokazalo zamjetnu antiproliferativnu aktivnost ni na jednoj testiranoj staničnoj liniji (Slika 8, 9 i 10)



Slika 8. Usporedni učinak DR2 na HeLa staničnu liniju pri koncentraciji od  $1 \times 10^{-4}$  mol/L i  $1 \times 10^{-5}$  mol/L. Primijenjen je Mann-Whitney test sa granicom statističke značajnosti ( $P < 0,05$ ) koja je označena kao (\*).



Slika 9. Usporedni učinak DR2 na Caco-2 staničnu liniju pri koncentraciji od  $1 \times 10^{-4}$  mol/L i  $1 \times 10^{-5}$  mol/L. Primijenjen je Mann-Whitney test sa granicom statističke značajnosti ( $P < 0,05$ ) koja je označena kao (\*).



Slika 10. Usporedni učinak DR2 na MRC-5 staničnu liniju pri koncentraciji od  $1 \times 10^{-4}$  mol/L i  $1 \times 10^{-5}$  mol/L. Primijenjen je Mann-Whitney test sa granicom statističke značajnosti ( $P < 0,05$ ) koja je označena kao (\*).

## 6. RASPRAVA

Maligne bolesti veliki su javnozdravstveni problem kako u svijetu, tako i u Hrvatskoj. Nakon bolesti srca i krvnih žila, maligna oboljenja su drugi najznačajniji uzrok smrti u Republici Hrvatskoj. U Hrvatskoj su 2019. godine od tumora umrle 13 344 osobe, stopa mortaliteta bila je 328,2/100 000. Kod muškaraca najčešća maligna oboljenja su bila na prostati, plućima, kolonu, rektumu i mokraćnom mjehuru, dok su kod žena bila oboljenja na dojci, plućima, kolonu, tijelu maternice i štitnjači (11). Zbog sve češćeg rasta incidencije pojave malignih oboljenja, svijetu i medicini potrebno je otkriće novih protutumorskih lijekova. Dosadašnje metode kirurškim odstranjivanjem te radio i imunoterapijom pokazale su donekle uspješne, međutim ova vrsta oboljenja zahtjeva bolji način izliječenja. Lijekovi za kemoterapiju, najčešće korišteni lijekovi protiv raka, ne znaju kako razlikovati stanice raka od drugih normalnih tjelesnih stanica. Ti lijekovi ne samo da ciljano djeluju na oboljele stanice raka, već uništavaju i zdrave stanice te u konačnici oštećuju cijeli organizam. Stoga, iako su trenutno dostupni neki kemoterapijski agensi koji donekle pomažu (cisplatin, dakarbazin, 5-fluoroacil, vinblastin, vinkristin), bolest je još uvijek opasna i smrtonosna (12). Zbog svih navedenih čimbenika teško je pronaći odgovarajući lijek koji bi uspješno suzbio ovu bolest. Posljednjih nekoliko desetljeća intenzivno se provode različita istraživanja antitumorskih spojeva niske toksičnosti i minimalnih nuspojava.

Kao jedan od potencijalnih protutumorskih lijekova, u prethodnim godinama kroz istraživanja pokazao se i rodanin te njegovi derivati. Prisutnost amino skupine omogućuje spojevima rodanina da stupaju u interakciju s mjestom vezanja liganda ciljnih proteina putem različitih vrste interakcija, uključujući hidrofobne interakcije, vezivanje vodika, kao i interakcije s metalnim ionima. Provedeno je nekoliko istraživanja o raznim zamjenama komponenti rodanina kako bi se procijenio njihov potencijal, uključujući anti-dijabetike, anti-HIV, anti-alzheimerovo, anti-kancerogeno, anti-bakterijsko, anti-tuberkulozno i anti-fungalno djelovanje (13).

Dobiveni rezultati u ovom radu pokazuju potencijal u antiproliferativnom djelovanju testiranih novosintetiziranih derivata rodanina. Djelovanje derivata rodanina ukazuje na razliku između staničnih linija, kao i u ovisnosti o apliciranoj koncentraciji derivata na stanice. Derivat DR2 pokazao je najjaču inhibiciju na svim testiranim staničnim linijama, s blago pošteđnim učinkom na normale stanice fibroblasta u odnosu na stanice adenokarcinoma. Pojedina istraživanja bazirana na određivanju protutumorske aktivnosti novosintetiziranih derivata

rodanina ukazuju na manju citotoksičnost prema normalnim staničnim linijama (14). Jedan od takvih derivata pokazao se N-supstituirani derivat rodanina 2-tiokso-1,3-tiazolidin-4-on koji je pokazao selektivnu aktivnost inhibiranjem HTC 116 stanica adenokarcinoma, bez inhibicije staničnog rasta normalnih fibroblasta. Nadalje u radu se spominje novosintetizirani derivat, 5-ariliden-2-tiokso-1,3-tiazolidin karbamat, sa najjčim djelovanjem prema Huh7 D12 (stanična linija hepatocelularnog karcinoma) i Caco-2 staničnim linijama, bez značajne inhibicije normalnih fibroblasta (14). Iako se derivat DR2 u našem istraživanju pokazao kao najzanimljiviji zbog statistički značajne inhibicije testiranih staničnih linija, prošireno testiranje na nižu koncentraciju nije pokazalo značajnu inhibiciju.

Derivat DR1 nije pokazao inhibiciju rasta MRC-5 stanica, za razliku od Caco-2 stanične linije i nešto manje inhibicije HeLa stanične linije. Sličan obrazac pokazuje i DR3 gdje je veća inhibicija rasta HeLa stanica, u odnosu na Caco-2 stanice.

Ekperimentalni protutumorski rezultati bazirani na testiranju novih derivata sa rodaninskom osnovom u strukturi uvelike doprinose boljem razumijevanju molekularne interakcije derivata sa staničnim strukturama, koja se koriste u odnosu strukture i aktivnosti (SAR, engl. *structure-activity relationship*) pri biomedicinskoj grani istraživanja. Iako su mnogobrojna istraživanja napravljena na bazi rodanina i dalje postoji potreba za proširivanjem saznanja vezana uz razvoj protutumorskih lijekova na bazi rodanina (12).



## 7. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog istraživanja, možemo zaključiti slijedeće:

- uočeno je antiproliferativno djelovanje pojedinih derivata rodanina na ispitivanim staničnim linijama
- najveću inhibiciju staničnog rasta pokazao je derivat rodanina DR2 pri testiranoj koncentraciji od  $1 \times 10^{-4}$  mol/L
- DR2 pokazao je veću inhibiciju rasta stanica karcinoma u odnosu na normalne stanice fibroblasta (MRC-5 stanice)
- pri nižim koncentracijama od  $1 \times 10^{-5}$  mol/L derivat DR2 nije pokazao statistički značajnu inhibiciju staničnog rasta
- najmanju antiproliferativnu aktivnosti na stanicama imali su derivati DR5-DR8

## 8. SAŽETAK

**Uvod:** Zbog sve većeg istraživanja lijekova i farmaceutskih proizvoda, rodanini su se našli kao jedan od bitnijih spojeva pogodnih za manipulaciju u svrhu sinteze derivata sa biološkim učinkom. Derivati rodanina pokazuju velike učinke ponajprije u antitumorskim aktivnostima, zatim u antidijabetičkim, antibakterijskim, antifungalnim, antimikobakterijskim i još mnogim drugim aktivnostima.

**Ciljevi:** Odrediti antiproliferativnu aktivnost derivata rodanina na tri stanične linije (HeLa, Caco-2, MRC-5)

**Materijali i metode:** U radu se ispitao učinak 3- ; 5- supstituiranih derivata rodanina koji su sintetizirani na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku, te su pripremljeni za analizu otapanjem u DMSO-u u koncentraciji od 0,01 mol/L. Konačne koncentracije derivata bile su  $1 \times 10^{-4}$  mol/L i  $1 \times 10^{-5}$  mol/L. Nakon tretiranja staničnih linija spojevima i inkubacije od 72h u inkubatoru, MTT testom je određen antiproliferativni učinak.

**Rezultati:** 3- ; 5- supstituiranih derivata rodanina pokazali su inhibitorni učinak na rast ispitivanih staničnih linija. DR2 pokazao je najveći antiproliferativni učinak na stanicama karcinoma (HeLa i Caco-2 staničnim linijama), sa djelomično manjim učinkom na normalne stanice fibroblasta (MRC-5 stanična linija). Pri nižoj koncentraciji od  $1 \times 10^{-5}$  mol/L, derivat DR2 nije pokazao statistički značajnu inhibiciju.

**Zaključak:** 3- ; 5- supstituiranih derivata rodanina pokazuju djelomični antiproliferativni učinak na testirane stanične linije. Antiproliferativni učinak ovisi o apliciranoj koncentraciji derivata te vrsti stanične linije.

**Ključne riječi:** rodanin; rodaninski derivati; antiproliferativno djelovanje; stanična kultura; tumorske stanice

## 9. SUMMARY

### ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF NEWLY SYNTHESIZED 3- AND 5-SUBSTITUTE RHODANINES ON TUMOR CELLS

**Introduction:** Due to the increasing research of drugs and pharmaceutical products, rhodanines have been found as one of the most important compounds suitable for manipulation for the purpose of synthesizing derivatives with biological effects. Rhodanine derivatives show great effects primarily in antitumor activities, then in antidiabetic, antibacterial, antifungal, antimycobacterial and many other activities.

**Objectives:** To determine the antiproliferative activity of rhodanine derivatives on three cell lines (HeLa, Caco-2, MRC-5).

**Materials and methods:** The paper examined the effect of 3- ; of 5-substituted rhodanine derivatives that were synthesized at the Faculty of Food Technology in Osijek, and were prepared for analysis by dissolving in DMSO at a concentration of 0.01 mol/L. The final concentrations of the derivatives were  $10^{-4}$  mol/L and  $10^{-5}$  mol/L. After treating the cell lines with compounds and incubation for 72 hours in an incubator, antiproliferative effect was determined by the MTT test.

**Results:** : 3- ; 5-substituted rhodanine derivatives showed an inhibitory effect on the growth of the tested cell lines. DR2 showed the greatest antiproliferative effect on cancer cells (HeLa and Caco-2 cell lines), with a partially smaller effect on normal fibroblast cells (MRC-5 cell line). At a lower concentration of  $1 \times 10^{-5}$  mol/L, the DR2 derivative did not show statistically significant inhibition.

**Conclusion:** 3- ; 5-substituted rhodanine derivatives show an antiproliferative effect on cell lines. The antiproliferative effect depends on the applied concentration of the derivative and the type of cell line.

**Key words:** rhodanine; rhodanine derivatives; antiproliferative effect; cell culture; tumor cells

**10. LITERATURA**

1. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 1201546, Rhodanine. Dostupno na adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/rhodanine>. <http://orgsyn.org/demo.aspx?prep=CV3P0763>. Datum pristupa: 01.03.2022.
2. Mousavi, S. M., Zarei, M., Hashemi, S. A., Babapoor, A., & Amani, A. M. (2019). A conceptual review of rhodanine: current applications of antiviral drugs, anticancer and antimicrobial activities. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 1132–1148.
3. Bhatti, R. S., Shah, S., Suresh, Krishan, P., & Sandhu, J. S. (2013). Recent pharmacological developments on rhodanines and 2,4-thiazolidinediones. *International journal of medicinal chemistry*, 2013, 793260.
4. K S, Ali Muhammad & Ravi, Subban & Thangamani, Arumugam. (2016). Synthesis and evaluation of some novel N-substituted rhodanines for their anticancer activity. *Medicinal Chemistry Research*. 25. 10.1007/s00044-016-1545-7.
5. R. I. Freshney. *Culture of animal cells: A manual of basic technique*, 5. izdanje, Wiley, New York (2005)
6. *Cell culture basics handbook*. 2016. Dostupno na adresi: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/CellCultureandTransfection/pdfs/Gibco-Cell-Culture-Basics-HandbookGlobal.pdf>. Datum pristupa: 27.05.2022.
7. G. M. Cooper, R. E. Hausman. *Stanica, molekularni pristup*. 5. izdanje. Medicinska naklada Zagreb. 2010. 725-45.
8. Zhang Y. (2018). Cell toxicity mechanism and biomarker. *Clinical and translational medicine*, 7(1), 34.
9. Mickisch, G., Fajta, S., Keilhauer, G., Schlick, E., Tschada, R., & Alken, P. (1990). Chemosensitivity testing of primary human renal cell carcinoma by a tetrazolium based microculture assay (MTT). *Urological research*, 18(2), 131–136.
10. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2013). *Cell Viability Assays*. In S. Markossian (Eds.) et. al., *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

11. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2019., Bilten 44, Zagreb, 2021.
12. Yin, L. J., Bin Ahmad Kamar, A., Fung, G. T., Liang, C. T., & Avupati, V. R. (2022). Review of anticancer potentials and structure-activity relationships (SAR) of rhodanine derivatives. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 145, 112406.
13. Mech, D., Kurowska, A., & Trotsko, N. (2021). The Bioactivity of Thiazolidin-4-Ones: A Short Review of the Most Recent Studies. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11533.
14. Szczepański, J., Tuszewska, H., & Trotsko, N. (2022). Anticancer Profile of Rhodanines: Structure-Activity Relationship (SAR) and Molecular Targets-A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(12), 3750.

## 11. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Luka Mihaljević

**Datum i mjesto rođenja:** 13. ožujka 2000., Osijek

**Adresa:** Vijenac Paje Kolarića 2, Osijek

**Telefon:** 097 676 1303

**E-mail:** [lukamihaljevic15@gmail.com](mailto:lukamihaljevic15@gmail.com)

### Obrazovanje:

2007. – 2015. Osnovna škola "Dr. Franjo Tuđman", Beli Manastir

2011. – 2015. Umjetnička škola Beli Manastir, smjer tambura

2015. – 2019. Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića Osijek, smjer prirodoslovna gimnazija

2015. – do danas Tamburaška škola Batorek

2019. – 2022. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek, sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

### Popularizacija znanosti:

2022. – sudjelovanje na Festivalu znanosti; radionica pod nazivom „Kako živimo?“