

# Proapoptički učinak novo sintetiziranih 7-kloro-4-aminokinolinskih derivata na tumorske stanice in vitro

---

Jirouš, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:152:622213>

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**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Maja Jirouš**

**PROAPOPTOTIČKI UČINAK NOVO**  
**SINTETIZIRANIH 7-KLORO-4-**  
**AMINOKINOLINSKIH DERIVATA NA**  
**TUMORSKE STANICE *IN VITRO***

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**



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

**Maja Jirouš**

**PROAPOPTOTIČKI UČINAK NOVO**  
**SINTETIZIRANIH 7-KLORO-4-**  
**AMINOKINOLINSKIH DERIVATA NA**  
**TUMORSKE STANICE *IN VITRO***

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

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

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

Rad ima 43 lista, 17 slika i 1 tablicu.

## Zahvala

*Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac na prihvaćenom mentorstvu, predloženoj temi, podršci i vođenju u izradi ovog diplomskog rada. Hvala Vam što ste mi omogućili ulazak u svijet znanosti.*

*Zahvaljujem dr. sc. Marijani Jukić na svojoj velikodušnoj pomoći, strpljenju i prenesenom znanju tijekom izrade ovog rada, kao i na brojnim savjetima, susretljivosti i uvijek ugodnoj atmosferi u laboratorijskom radu.*

*Također želim zahvaliti Ivani Jelavić, univ. bacc .med. lab .diagn. na pristupačnosti i stručnoj pomoći u praktičnom dijelu izrade ovog rada.*

*Hvala mojim roditeljima, bratu, bakama i ostalim članovima obitelji na podršci, razumijevanju, vjeri u mene, i svakoj pomoći koju su mi pružili tijekom studiranja.*

*Hvala Ivanu na svim ohrabrenjima, razumijevanju i podršci onda kada je to bilo najpotrebnije.*

*Na kraju, hvala svim mojim dragim prijateljima koji su bili uz mene te mi uljepšali studentske dane.*

# SADRŽAJ

POPIS KRATICA .....	III
1. UVOD .....	1
1.1. Vrste stanične smrti .....	1
1.1.1. Apoptoza .....	2
1.1.2. Autofagija .....	4
1.1.3 Odnos apoptoze i autofagije.....	6
1.2. Kinolinski spojevi.....	7
1.2.1. Antitumorski potencijal kinolina .....	8
1.2.2. Proapoptotičko djelovanje kinolinskih derivata.....	9
1.2.3. Inhibitorski učinak kinolina na autofagiju.....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	12
3. MATERIJALI I METODE .....	13
3.1. Ustroj studije.....	13
3.2. Materijali .....	13
3.2.1. Ispitivani spojevi .....	13
3.2.2. Stanične linije.....	13
3.2.3. Kemikalije.....	14
3.3. Metode .....	14
3.3.1. Kultivacija i održavanje stanica <i>in vitro</i> .....	14
3.3.2. Određivanje broja vijabilnih stanica u staničnoj kulturi .....	15
3.3.3. Određivanje antiproliferativne aktivnosti MTT testom .....	17
3.3.4. Određivanje udjela stanica u apoptozi protočnom citometrijom .....	18
3.3.5. Određivanje udjela stanica u autofagiji protočnom citometrijom.....	19
3.3.6. Statistička obrada podataka.....	19
4. REZULTATI.....	21
4.1. Određivanje antiproliferativne aktivnosti 7-kloro-4-aminokinolinskih derivata.....	21
4.2. Analiza udjela stanica u apoptozi protočnom citometrijom .....	21
4.3. Analiza udjela stanica u autofagiji protočnom citometrijom.....	26
5. RASPRAVA.....	31
6. ZAKLJUČAK .....	34
7. SAŽETAK.....	35

8. SUMMARY .....	36
9. LITERATURA.....	37
10. ŽIVOTOPIS .....	43



## POPIS KRATICA

Apaf-1	aktivirajući faktor-1 apoptozne proteaze (eng. <i>apoptotic protease activating factor 1</i> )
Atg	eng. <i>Autophagy related gene</i>
Bax	eng. <i>BCL-2-associated X protein</i>
Bcl	eng. <i>B-cell lymphoma 2</i>
dATP	deoksiadenozin trifosfat
DISC	signalni kompleks koji inducira smrt (eng. <i>death inducing signalling complex</i> )
DMEM	Dulbecco modificirani Eagle medij
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EDTA	etilendiaminotetraoctena kiselina (eng. <i>ethylenediaminetetraaceticacid</i> )
FBS	fetalni goveđi serum (eng. <i>fetal bovine serum</i> )
FDA	američka Agencija za hranu i lijekove (eng. <i>Food and Drug Administration</i> )
FITC	fluorescein izotiocijanat
HEPES	natrijeva sol 4-(2-hidroksietil)piperazin -1-etanol sulfatne kisleline
HuT-78	humani limfom T – stanica
IC <sub>50</sub>	koncentracija koja inhibira rast 50 % stanica (eng. <i>The half maximal inhibitory concentration</i> )
K-562	stanice humane kronične mijeloidne leukemije u blastičnoj krizi
LC3 protein	eng. <i>light chain 3 protein</i>
MDA-MB-231	stanice trostruko negativnog adenokarcinoma dojke
MDCK 1	epitelne stanice bubrega psa (eng. <i>Madin-Darby Canine Kidney</i> )
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolium bromid
mTOR	ciljna molekula rapamicina u sisavaca (eng. <i>mammalian target of rapamycin</i> )
NCCD	Odbor za nomenklaturu stanične smrti (eng. <i>Nomenclature Committee on Cell Death</i> )

NK stanice	prirodnoubilačke stanice (eng. <i>natural killer</i> )
PBS	(eng. <i>phosphate-buffered saline</i> ) fosfatni pufer
PI	propidij jodid
PS	fosfatidilserin (eng. <i>phosphatidylserine</i> )
Puma	eng. <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute medij
TNFR1	receptor faktora tumorske nekroze 1 (eng. <i>tumor necrosis factor receptor</i> )
TRAIL-R	receptor za ligand koji inducira apoptozu povezan s TNF (eng. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand- receptor</i> )
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (eng. <i>vascular endothelial growth factor</i> )

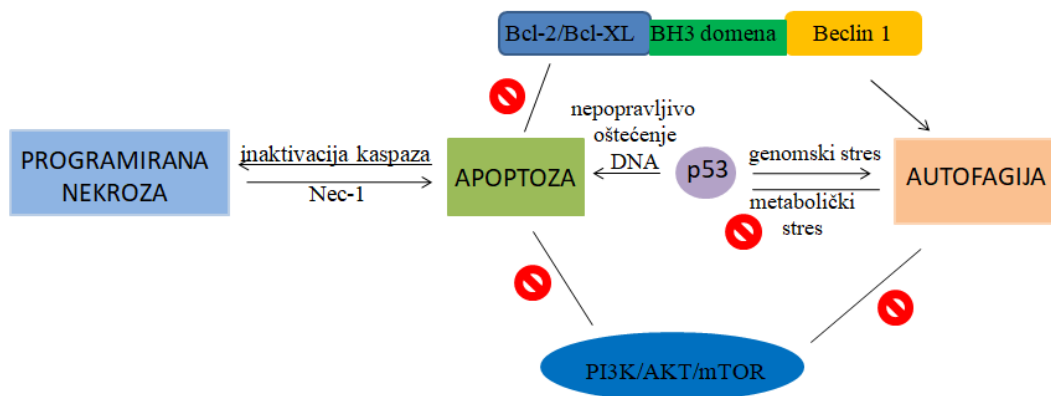
## 1. UVOD

### 1.1. Vrste stanične smrti

Stanični stresori, kao što su hipoksija, mehaničko oštećenje, reaktivne kisikove vrste te oštećenje molekule DNA mogu uzrokovati različite oblike stanične smrti. Stanična smrt može biti strogo uređen i reguliran proces u kojem se aktivacijom određenih molekularnih puteva događa tzv. samoubojstvo stanice ili može biti nereguliran proces kao posljedica vanjskog staničnog oštećenja. Godine 1972. Kerr i suradnici uvode pojam apoptoze, kao prvi model programirane stanične smrti koji se razlikovao od do tada poznate, neprogramirane nekroze (1). Sljedećih 30-ak godina mehanizam apoptoze detaljno je istražen te se ona, stoga, danas smatra najiscrpnije istraženim mehanizmom stanične smrti. Prvotno razlikovanje vrsta programirane stanične smrti temeljilo se na morfološkim karakteristikama koje su bile svojstvene apoptozi (tip I), autofagiji (tip II) ili programiranoj nekrozi (tip III) (2).

Tijekom posljednjeg desetljeća, brojna su istraživanja provedena na području modela stanične smrti, stoga je 2018. godine Odbor za nomenklaturu stanične smrti (eng. *Nomenclature Committee on Cell Death*, NCCD) objavio nove smjernice za definiciju i interpretaciju stanične smrti (3). Prema najnovijim smjernicama razlikujemo sljedeće vrste regulirane stanične smrti s obzirom na molekularne pokazatelje: intrinzična apoptoza, ekstrinzična apoptoza, nekroptoza, ferroptoza, piroptoza, partanatoza, nekroza posredovana mitohondrijskom permeabilnošću, entotička stanična smrt, NETotična stanična smrt, lizosomom posredovana stanična smrt, autofagijom posredovana stanična smrt, imunogenična stanična smrt, mitotička katastrofa i stanično starenje (3, 4).

Koji će tip stanične smrti nastupiti ovisi o signalima koji ju aktiviraju, kao i o brojnim ostalim signalima koji su dio molekularnih puteva drugih vrsta stanične smrti (Slika 1). Bilo kakav defekt u procesu stanične smrti može uzrokovati razne bolesti, a posebice različite vrste raka (5). Iz tog razloga, nameće se sve veća potreba za boljim razumijevanjem različitih vrsta programirane stanične smrti, kao i njihove međusobne povezanosti.



**Slika 1.** Odnosi između apoptoze, autofagije i programirane nekroze.

### 1.1.1. Apoptoza

Apoptoza je strogo reguliran, energetski ovisan model stanične smrti, vrlo važan u kontroli proliferacije te održavanju homeostaze eliminacijom oštećenih te potencijalno štetnih stanica (6). U našem organizmu apoptoza je regulirana brojnim genima i staničnim proteinima, a ukoliko dođe do disfunkcije u njoj regulaciji vrlo je izgledan razvoj neurodegenerativnih i autoimunih, kao i malignih bolesti. Inhibicija molekularnih mehanizama apoptoze ključno je svojstvo koje omogućuje nekontroliran rast tumorskih stanica, dok primjerice prekomjerna aktivacija apoptoze može dovesti do razvoja degenerativnih bolesti. Proces apoptoze započinje i izvršava se pomoću kaspaza, unutarstaničnih cisteinskih proteaza koje aktiviraju ireverzibilnu kaskadnu proteolizu ključnih staničnih proteina, kao što su proteini citoskeleta te proteini za popravak DNA (6, 7). Aktivacija apoptoze, kao i samih kaspaza, može započeti izvanstanično, vezanjem liganda za tzv. receptore smrti (eng. *death receptors*), ili unutarstanično, signalnim molekulama povezanim s oštećenjem molekule DNA, manjkom faktora rasta ili hipoksijom (7, 8). Unutarnji, o mitohondriju ovisan, put aktivacije započinje otpuštanjem citokroma c iz međumembranskog prostora mitohondrija nakon migracije pro-apoptotskog citoplazmatskog proteina Bax (eng. *Bcl-2-associated X protein*) do mitohondrijske membrane gdje inhibira protektivno djelovanje anti-apoptotskog BCL 2 proteina. Naime, Bax stvara rupturu u vanjskoj mitohondrijskoj membrani te omogućava izlazak citokroma c u citoplazmu. Nadalje, citokrom c stvara kompleks s Apaf-1 proteinom, nakon čega slijedi konformacijska promjena, vezanje dATP-a te oligomerizacija Apaf-1 proteina. Kompleks od 7 podjedinica Apaf-1 proteina s citokromom c veže te aktivira prokaspazu-9, nakon čega nastaje struktura poznata pod nazivom apoptosom. Unutarstanični regulatori apoptoze proteini su iz Bcl-2 (eng. *B-cell lymphoma 2*)

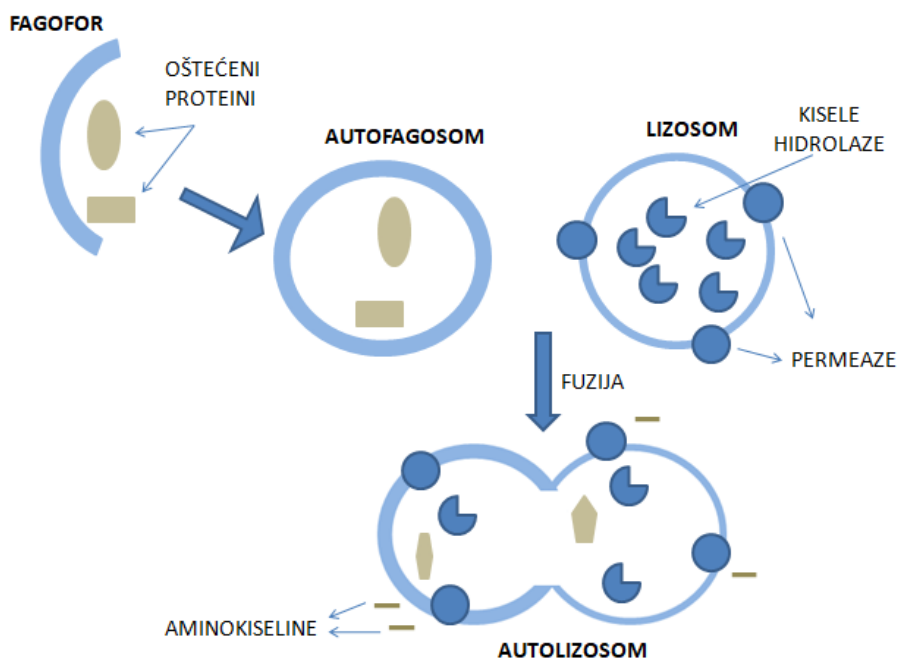
porodice, a dijele se na pro-apoptotičke (Bax, Bak, Puma, Noxa, Bim, Bad) te anti-apoptotičke proteine (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, Bcl-B), čija je funkcija vezana uz permeabilizaciju membrane mitohondrija. Naime, pro-apoptotički proteini potiču, dok anti-apoptotički proteini blokiraju oslobađanje citokroma c i ostalih proteina iz mitohondrija, kao što je prethodno objašnjeno na primjeru proteina Bax i Bcl-2 (9, 10). U tumorskih stanica otpor prema apoptozi postiže se prekomjernom ekspresijom anti-apoptotičkih proteina kao što je Bcl-2, i/ili smanjenom ekspresijom pro-apoptotičkih proteina, kao što je Bax. S obzirom da je regulacija pro- i anti-apoptotičkih proteina ovisna o p53 tumor-supresorskom proteinu, oštećenje njegove funkcije uvelike doprinosi inhibiciji apoptoze (11). Osim toga, oštećenje receptora smrti također dovodi do stanične rezistencije na apoptozu (8). Vanjski put apoptoze počinje izvanstaničnim vezanjem liganda na transmembranski receptor smrti (npr. Fas, TRAIL-R, TNFR1) nakon kojeg slijedi regrutacija staničnih „adapter“ proteina na unutarstanični slijed receptora smrti te formiranja DISC (eng. *Death inducing signaling complex*) kompleksa koji pomaže aktivaciju kaspaze-8 i/ili kaspaze-10. Nakon što je aktivirana, kaspaza-8 može pocijepati izvršnu prokaspazu-3 do njenog aktivnog oblika, ili na indirektan način potaknuti unutarnji put apoptoze cijepanjem Bid proteina, što uzrokuje permeabilizaciju mitohondrijske membrane (9). Osim navedena dva najčešća puta aktivacije apoptoze (intrinzični i ekstrinzični), postoji i treći put svojstven citotoksičnim limfocitima i NK (eng. *Natural killer*) stanicama. Neovisno kojim putem je započela apoptoza, nakon aktivacije inicijatorskih kaspaza -8 ili -9, slijedi izvršna faza apoptoze u kojoj aktivirane izvršne kaspaze -3, -6 i -7 dovode do kidanja staničnih komponenti (12). Morfološki se djelovanje kaspaza očituje smanjivanjem stanice zbog razgradnje citoskeleta, bubrenjem stanične membrane, kondenzacijom kromatina, fragmentacijom DNA te u konačnici formacijom apoptotičkih tjelešaca; fragmenata stanice okruženih membranom (11, 13). Ključan događaj u apoptozi je translokacija fosfatidilserina s citoplazmatske na vanjsku površinu plazma membrane, što predstavlja signal makrofagima za fagocitozu apoptotičkih tjelešaca (11). Disregulacija apoptoze omogućava nekontroliran rast i preživljenje tumorskih stanica, kao i rezistenciju na mnoge lijekove. Iz tog razloga, velik je fokus stavljen na sintezu spojeva koji će djelovati na oštećeni apoptotički put tumorskih stanica na način da povrate normalnu aktivaciju apoptoze, potičući sintezu proapoptotičkih proteina i aktivaciju kaspaza, ili blokiranje ekspresije antiapoptotičkih proteina (8, 14, 15).

### 1.1.2. Autofagija

Pojam autofagija dolazi od grčkih riječi "auto-" i "phagein", što u doslovnom prijevodu znači "jesti samoga sebe" (16, 17). Iako je otkrivena još 1960-ih godina, molekularna podloga autofagije dugi je niz godina bila nepoznata, sve do 1990-ih kada se područje proučavanja autofagije počelo znatno razvijati unaprjeđenjem novih molekularnih, kao i mikroskopskih metoda (18). Za otkriće kataboličkog mehanizama autofagije, znanstvenik Yoshinori Ohsumi dobio je 2016. godine Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu (19). Često se u znanstvenim radovima pojam "autofagija" odnosi na "makroautofagiju", međutim osim makroautofagije, s obzirom na put dostave materijala u lizosom razlikujemo i mikroautofagiju te šaperonima-posredovanu autofagiju (20). Autofagija označava kompleksan i dinamičan proces dostavljanja staničnih komponenti putem autofagosoma u lizosom radi njihove razgradnje. Najčešće se autofagijom razgrađuju patogeni, dugoživući oštećeni stanični proteini, ali i dotrajale i suvišne organele kao što su mitohondriji, endoplazmatski retikulum i peroksisomi (21, 22). Svrha autofagije je osiguravanje izvora energije za stanice u stanju gladovanja, s obzirom da se razgradnjom oštećenih i suvišnih proteina pomoću kiselih proteaza, iz lizosoma oslobađaju aminokiseline koje su, između ostalog, potrebne za sintezu esencijalnih proteina (23). Osim toga, autofagija osigurava normalno funkcioniranje i preživljenje stanica sprječavajući nakupljanje proteinskih agregata te oštećenih organela koji mogu dovesti do brze stanične smrti (16, 24). Osobit primjer održavanja stanične ravnoteže je mitofagija, razgradnja oštećenih mitohondrija. Na taj način autofagija prevenira staničnu smrt, međutim brojna istraživanja u posljednjih desetak godina ukazuju na upravo suprotno djelovanje autofagije koje se očituje u procesu autofagijom-posredovane stanične smrti (25, 26). Morfološki, proces autofagije započinje formiranjem fagofora, strukture s dvostrukom membranom koja odjeljuje materijal za razgradnju. Zaokruživanjem se fagofor razvija do strukture autofagosoma koji prenosi materijal za razgradnju do lizosoma, nakon čega fuzijom autofagosoma i lizosoma nastaje autolizosom (Slika 2). U autolizosomu se pomoću kiselih lizosomskih enzima odvija hidroliza proteina, lipida, šećera i nukleinskih kiselina dostavljenih putem autofagosoma (20, 24, 27). Sekvestriranje staničnih proteina ili organela koji su obilježeni za razgradnju odgovara selektivnoj autofagiji, dok se neselektivnom autofagijom sekvestriraju nasumične molekule i organele. Slično apoptozi, autofagija je genetski reguliran proces, posredovan *Atg* (eng. *autophagy related genes*) genima koji su prvotno otkriveni u plijesni, dok su njihovi homolozi u višestaničnih eukariota otkriveni kasnije (28). Brojni proteini sudjeluju u procesu regulacije autofagije. Primjerice, u procesu stvaranja autofagosoma za inicijaciju je potreban Ulk 1 (*Atg*

1 u plijesni) protein, nukleaciju potiče kompleks proteina Beclin1 i Vps34, dok su proteini LC3 i kompleks Atg12-Atg15 važni u procesu elongacije. Da autofagija ima važnu ulogu u očuvanju staničnog integriteta, pokazuju primjeri humanih tumora u kojih je zabilježena delecija gena *BECN1*, *Atg5* ili *Atg12* (29 - 31). Nadalje, kompleks mTORC1 ima važnu ulogu u regulaciji inhibicije autofagije na način da sprječava formaciju fagofora (21, 27, 32). Naime, mTOR je protein koji potiče anaboličke procese kao što su sinteza proteina i transkripcija, a inhibira kataboličke procese poput razgradnje mRNA i autofagije. S druge strane, induktori autofagije kao što su oksidativni stres i manjak nutrijenata inhibitorno će djelovati na mTOR (33).

Uloga autofagije u tumorskim stanicama je dvostruka, a ovisi o vrsti stanica, stadiju tumora, kao i učinkovitosti apoptoze. Ona može biti protektivna i osigurati tumorskim stanicama preživljenje u stanjima niske razine kisika i nutrijenata, kao i rezistenciju na citotoksične tvari. S druge strane, djelovanje autofagije u nekim tumorima i više je nego poželjno obzirom da ona može dovesti do autofagijom-posredovane stanične smrti. Nadalje, potvrđeno je da inhibicija autofagije u bilo kojoj fazi uzrokuje genetsku nestabilnost, kao i pojačan oksidativni stres, što pospješuje onkogenezu (17, 25, 33 - 36).



**Slika 2.** Stvaranje autolizosoma.

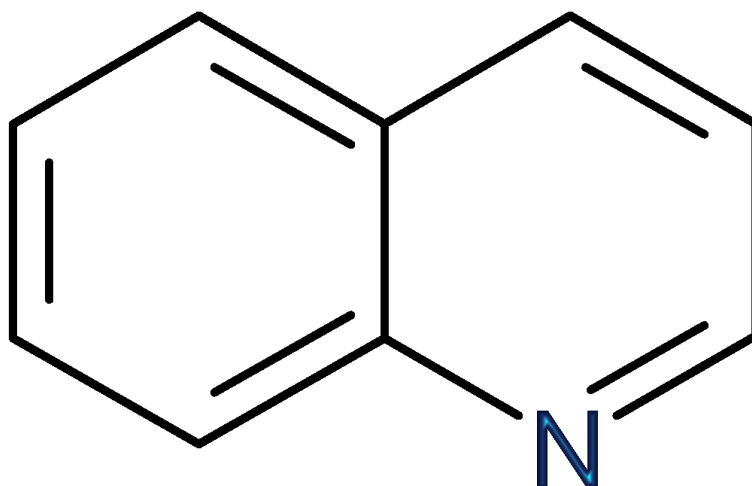
### 1.1.3. Odnos apoptoze i autofagije

Prema jednoj od prvih klasifikacija stanične smrti koja se temeljila na morfološkim karakteristikama, apoptoza je predstavljala tip I stanične smrti, autofagijom-posredovana stanična smrt tip II, dok je nekroza klasificirana kao tip III stanične smrti. Iako se na morfološkoj, kao i na molekularnoj razini apoptoza i autofagijom-posredovana stanična smrt vrlo razlikuju, u zadnjih nekoliko godina sve se više pažnje pridaje međudjelovanju ovih dvaju vrsta stanične smrti (37, 38). Mnogo dokaza upućuje na to kako su apoptoza i autofagija međusobno isključivi procesi. Primjerice, autofagija uklanjajući toksične proteinske agregate i oštećene organele sprječava nastanak signala koji bi potaknuli apoptozu (39). Ipak, sve više novijih istraživanja potvrđuje istovremenu aktivaciju apoptoze i autofagije te je otkriveno kako apoptoza i autofagija posjeduju zajedničke regulatorne molekule (37, 38). Na primjer, anti-apoptotički, kao i pro-apoptotički proteini iz Bcl porodice ne djeluju samo na aktivaciju apoptoze, već i autofagije. Naime, anti-apoptotički protein Bcl-2 veže se za regulatorni protein autofagije Beclin1 te na taj način inhibira njegovo vezanje s Vps34 te posljedično sprječava formaciju autofagosoma. S druge strane, pro-apoptotički proteini, kao što su Puma i Noxa, ometaju interakciju Bcl-2 proteina s Beclin1 te dovode do aktivacije autofagije. Nadalje, primijećeno je kako se autofagija i apoptoza odvijaju u istoj stanici, najčešće u slijedu u kojem autofagija prethodi apoptozu. Razlog tome je što se kao odgovor na stres u stanici prvo aktivira autofagija. Međutim, kada je stanični stres preintenzivan, dolazi do aktivacije apoptoze te inaktivacije autofagije zbog destruktivnog djelovanja kaspaza na ključne proteine autofagije. Na primjer Beclin1 supstrat je kaspazi-3 (38, 40). S druge strane, autofagija može pospješiti staničnu smrt razgradnjom nezamjenjivih staničnih dijelova, te na taj način aktivirati apoptozu. Proučavanjem uloge autofagije u tumorskim stanicama, došlo se do zaključaka kako je njeno djelovanje dvojako. Naime, autofagija najčešće djeluje na način da potiče proliferaciju tumorskih stanica osiguravajući im izvore energije u stanjima gladovanja, dok je primijećeno i suprimirajuće djelovanje na tumore koje se očituje u interakciji s ostalim signalizacijskim i metaboličkim putevima u stanici (37). Klorokin se kao inhibitor autofagije, u određenim slučajevima, koristi sinergistički s ostalim antitumorskim lijekovima jer se inhibicijom autofagije pospješuje osjetljivost tumorskih stanica na terapiju (39, 41). S druge strane, u tumorima u kojih postoji teški defekt u procesu apoptoze, upravo je aktivacija autofagije ključna kako bi se promovirala stanična smrt. Zaključno, odnos autofagije i apoptoze je kompleksan, a ovisi o signalizaciji, uvjetima u kojima se stanice nalaze te samoj vrsti stanica (37).



## 1.2. Kinolinski spojevi

Kinolin je heterociklički aromatski organski spoj dušika kemijske formule  $C_9H_7N$ , građen od jednog benzenskog i jednog piridinskog prstena (Slika 3). Nekoliko prirodnih spojeva, poglavito alkaloida, sadržavaju kinolinsku jezgru, a opisani su i brojni protokoli za sintezu različito supstituiranih derivata kinolina. Prva primjena kinolina u medicini bila je u liječenju malarije pomoću kinina izoliranog iz kore drveta kininovca. Na temelju strukture kinolinskog prstena kasnije su sintetizirani novi antimalarični lijekovi, među kojima su klorokin, amodiakin, meflokin i ostali (42). Osim antimalaričnog, derivati kinolina posjeduju širok spektar farmakoloških svojstava, među kojima su: inhibicija proliferacije tumorskih stanica i angiogeneze te, antimikrobno, antiviralno, anestetičko, antifungalno, protuupalno i kardiotonično djelovanje (43). S obzirom da se radi o visoko stabilnim spojevima široke bioaktivnosti, a posebice zbog njihove protutumorske aktivnosti, sintetizirani su mnogi derivati, od kojih se neki, kao što su kampotekin, irinotekan i topotekan, već godinama koriste u kliničkom liječenju karcinoma.



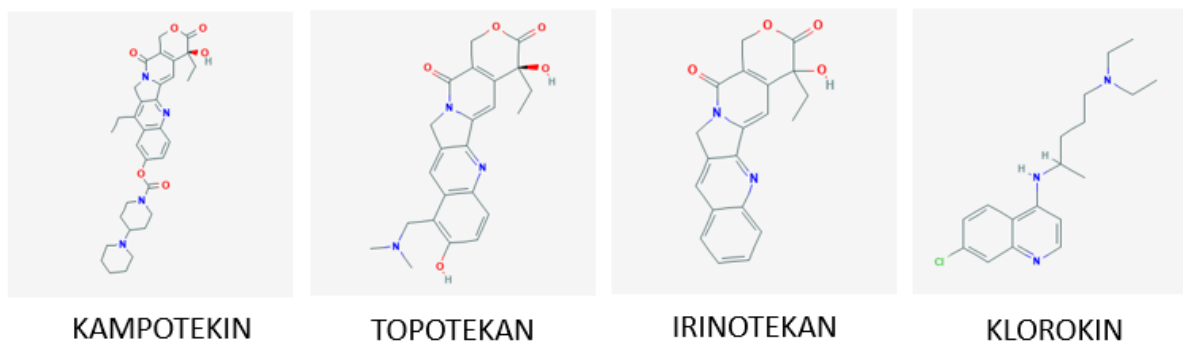
**Slika 3.** Strukturna formula kinolina.

### 1.2.1. Antitumorski potencijal kinolina

Otkrićem kampotekina 1966. godine te pojavom njegovih strukturnih analoga, topotekana i irinotekana, intenzivno se započelo razvijati područje sinteze i proučavanja antitumorskih svojstava spojeva s kinolinskom okosnicom (44). Veliki broj do danas novo sintetiziranih kinolinskih derivata dokaz je kako antiproliferativna aktivnost kinolina pokazuje velik potencijal u razvoju novih antitumorskih lijekova, što je potvrđeno na brojnim tumorskim staničnim linijama, kao i na *in vivo* modelima. Osim toga, neki kinolinski derivati, kao bosutinib i lenvatinib, u fazi su kliničkog ispitivanja kao novi protutumorski lijekovi (45). Protutumorska aktivnost kinolinskih derivata bazira se na raznim mehanizmima, među kojima se mogu izdvojiti interakcije sa staničnim proteinima, kao što su topoizomeraza i telomeraza, vezanje s DNA te aktivacija kaspaza (46 - 48). Nadalje, u liječenju tumora vrlo je važna njihova antiangiogena aktivnost inhibicijom VEGF signalnog puta, antimitotičko djelovanje, kao i zaustavljanje staničnog ciklusa (45, 49, 50). Antitumorski potencijal određenih kinolinskih derivata, kao i najznačajniji mehanizmi djelovanja, bit će prikazani u nekoliko sljedećih primjera.

Kampotekin, izoliran iz kore drveta *Camptotheca acuminata*, svoje djelovanje temelji na planarnoj pentacikličkoj strukturi zbog koje postiže mogućnost inhibicije topoizomerase. Nadalje, interkalaciju s molekulom DNA pokazali su brojni derivati kinolina s planarnom strukturom koji se ugrađuju između parova baza DNA i ondje zadržavaju interakcijama kao što su van der Waalove sile i vodikove veze (51). Veliku važnost imaju inhibitori topoizomerase, kao i spojevi koji aktiviraju apoptozu putem reaktivnih kisikovih vrsta ili još važnije, modulacijom Bcl pro- i anti- apoptotičkih proteina (52).

Kako bi se poboljšala učinkovitost djelovanja na multirezistentne stanične linije, odnosno kako bi se pojačao selektivan citotoksičan učinak kinolina, a smanjile toksične nuspojave, u zadnjih nekoliko godina sve se veći potencijal vidi u sintezi hibridnih kinolinskih molekula, koje osim kinolinske, sadrže i okosnicu drugih spojeva s dokazanim antitumorskim djelovanjem (53).



**Slika 4.** Strukturne formule kinolinskih derivata s proapoptotičkim djelovanjem (preuzeto (54) i prilagođeno).

### 1.2.2. Proapoptotičko djelovanje kinolinskih derivata

Brojni derivati s kinolinskom okosnicom pokazuju proapoptotičko djelovanje, koje je dokazano na širokom rasponu tumorskih staničnih linija *in vitro*, kao i na tumorima životinjskih modela.

Klorokin (7-kloro-4-aminokinolin) i njegovi sintetski analozi jedan su od najznačajnijih kinolinskih derivata s velikim potencijalom u liječenju tumora, čije se djelovanje temelji na aktivaciji apoptoze te inhibiciji autofagije. Proapoptotičko djelovanje klorokina temelji se na interakciji s DNA, koja onemogućuje sintezu i popravak DNA molekule, što posljedično inducira signale za aktivaciju apoptoze. Izrazito inhibitorno djelovanje klorokinskih derivata na rast tumorskih stanica zainteresiralo je mnoge znanstvenike koji su u svojim istraživanjima dokazali raznolike mehanizme proapoptotičkog djelovanja ovih derivata. Primjerice, rezultati istraživanja Jia i sur. (55) pokazali su kako inhibitor autofagije klorokin, upravo zbog prekomjernog nakupljanja oštećenih i razgrađenih proteina u citoplazmi, dovodi do razvoja stresa endoplazmatskog retikuluma, što je usko povezano s aktivacijom apoptoze. Nadalje, Zheng i sur. (56) dokazali su aktivaciju apoptoze *in vitro*, kao i *in vivo* u tumorskih stanica kolorektalnog karcinoma nakon tretmana klorokinom. Osim ovog, brojni znanstveno-istraživački radovi potvrdili su proapoptotički učinak klorokina na tumorskim stanicama (57 - 60). Osim što potiču aktivaciju kaspaza, brojni dokazi upućuju na klorokinsku aktivaciju apoptoze putem p53 tumor supresorskog proteina (60, 61).

Osim klorokinskih, velik interes pokazuje se i za ostale kinolinske derivate, koji pokazuju širok raspon načina indukcije apoptoze u tumorskih stanica. Primjerice, Tong i sur. sintetizirali su nove derivate koji u stanicama kolorektalnog karcinoma *in vitro* induciraju

apoptozu, koja nije bila povezana s aktivacijom kaspaza, kao ni s p53 tumor supresorskim proteinom (62). S druge strane, spojevi 1-benzoil-3-cijanopirolo[1,2-a]kinolina u istraživanju Williama Kemnitzera i suradnika inducirali su apoptozu povezanu s aktivacijom kaspaza (63). Nadalje, pojačanom regulacijom pro-apoptotičkih proteina Bad i Bid te inhibicijom anti-apoptotičkih proteina XIAP i survivin BPIQ derivat doveo je do stanične smrti tumorskih stanica pluća (64).

Navedeni primjeri kinolinskih derivata samo su neki od mnogih primjera različito supstituiranih heterocikličkih derivata kinolina koji pokazuju proapoptotičko djelovanje (55, 65, 66), koje je upravo temelj za sve opsežnija istraživanja i veliko zanimanje za sintezu novih kinolinskih molekula.

### 1.2.3. Inhibitorni učinak kinolina na autofagiju

Zbog najčešće protektivnog djelovanja autofagije u tumorskim stanicama, u zadnje je vrijeme sve više stavljen fokus na pronalazak terapeutika koji će zbog inhibitornog djelovanja na autofagiju pospješiti liječenje raka konvencionalnim terapijama ili će pak biti dostatni u liječenju, kao samostalni agensi.

Klorokin i njegov derivat hidroksiklorokin odobreni su od strane američke Agencije za hranu i lijekove, FDA (eng. *Food and Drug Administration*) kao lijekovi u kliničkim istraživanjima namijenjeni liječenju tumora putem inhibicije autofagije (67). Inhibicija autofagije postiže se na način da se blokira fuzija autofagosoma s lizosomom, što kao posljedicu ima sprječavanje protektivnog djelovanja autofagije i smanjenje preživljenja tumorske stanice (68). U istraživanju Ganguli i suradnika (69) ovo svojstvo klorokina iskorišteno je za indukciju apoptoze jer je zbog nemogućnosti uklanjanja oštećenih mitohondrija došlo do otpuštanja citokroma c iz međumembranskog prostora mitohondrija te posljedično aktivacije kaspaze-3. Golden i suradnici ispitali su djelovanje ostalih kinolina s antimalaričnim djelovanjem te utvrdili kako kinin, kinakrin te meflokin pokazuju izraženo citotoksično djelovanje s inhibitornim djelovanjem na autofagiju (70).

Klorokin i njegovi derivati nisu jedini kinolinski spojevi koji imaju sposobnost inhibicije autofagije. Primjerice, Bosc i suradnici sintetizirali su kinolinski derivat koji je pokazao sposobnost inhibicije autofagije molekularnom interakcijom s ATG4B enzimom koji je ključan za formaciju i sazrijevanje autofagosoma (71). Nadalje, Lys05, dimer 7-kloro-4-

aminokinolina pokazuje inhibitorno djelovanje na autofagiju (72).

Inhibitorno djelovanje kinolina na autofagiju u tumorskim stanicama vrlo je poželjno zbog smanjenja količine energije koju dobivaju putem autofagije, kao i zbog povećane osjetljivosti tumorskih stanica na kemoterapiju. Međutim, važno je uočiti kako inhibitorno djelovanje na autofagiju u normalnih stanica nije poželjno s obzirom da ono dovodi do njihovog oštećenja i uranjene smrti (73). Između ostalog, najveći broj ovih istraživanja potvrđen je *in vitro*, te se iščekuju rezultati kliničkih istraživanja kako bi se utvrdio mehanizam djelovanja kinolinskih derivata *in vivo*, na organizam u cijelosti.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog istraživanja ispitati djelovanje novo sintetiziranih 7-kloro-4-aminokinolinskih derivata na rast tumorskih stanica u uvjetima *in vitro*, te odrediti način umiranja stanica tretiranih ispitivanim derivatima određivanjem aktivnosti apoptoze i autofagije protočnom citometrijom.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ustroj studije

Ovaj rad osmišljen je kao pokusno (eksperimentalno) istraživanje (74). Provedeno je u Laboratoriju za kulturu tkiva pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku u periodu od travnja do lipnja 2019. godine.

#### 3.2. Materijali

##### 3.2.1. Ispitivani spojevi

7-kloro-4-aminokinolinski derivati pripremljeni su na Zavodu za organsku kemiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Derivati su sintetizirani s ciljem inhibicije rasta tumorskih stanica aktivacijom apoptoze, u obliku hibridne molekule koja osim aminokinolinske, sadržava i benzimidazolsku skupinu. Derivati su dobiveni u obliku praha, otopljeni u DMSO-u (dimetilsulfoksid) kao koncentrirane stock otopine (konc.  $1 \times 10^{-2}$  mol/L) i pohranjene na  $-20^{\circ}\text{C}$  do daljnje uporabe. Za potrebe ovog istraživačkog rada pripremljeni su i korišteni u finalnoj koncentraciji od  $5 \times 10^{-6}$  M razrjeđivanjem stock otopine u DMSO-u.

##### 3.2.2. Stanične linije

Učinak 7-kloro-4-aminokinolinskih derivata ispitan je na panelu humanih tumorskih stanica te na jednoj normalnoj animalnoj staničnoj liniji.

##### Tumorske stanice:

- trostruko negativnog adenokarcinoma dojke; MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™),
- T-staničnog limfoma; HuT 78 (ATCC® TIB-161™),
- limfoblasta kronične mijeloidne leukemije u blastičnoj krizi; K-562 (ATCC® CCL-243™)

##### Normalne stanice:

- epitelne stanice bubrega psa; MDCK 1 (ATCC® CRL-2935™)

### 3.2.3. Kemikalije

Kemikalije i reagensi korišteni tijekom eksperimentalnog rada su sljedeći:

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) medij s L-glutaminom, kompletiran 10 % -tnim FBS-om (fetalni goveđi serum), 1 % -tnim anti-anti (antimikotik, antibiotik) te 1 % -tnim glutamaxom, Capricorn scientific (Slough, Velika Britanija)
- RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute) medij s L-glutaminom, kompletiran 10 % -tnim inaktiviranim FBS-om, 1 % -tnim anti-anti (antibiotik, antimikotik), 10 mM HEPES-a te 1 % -tnim glutamaxom (2 mM glutamine), Capricorn scientific (Slough, Velika Britanija)
- Natrijev piruvat (100 mM) Lonza (Verviers, Belgija)
- HEPES (4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etanesulonična kiselina) pufer, Sigma-Aldrich (St.Louis, SAD)
- PBS pufer - izotonična otopina; fosfatom puferirana otopina soli
- DMSO, dimetilsulfoksid 99,8 %, Acros organics (New Jersey, SAD)
- Tripan plavilo 0,4 %; 0,85 % NaCl, Lonza (Basel, Švicarska)
- Tripsin / EDTA, tripsin 0.25 %, 1Mm EDTA-Na4 u HBSS s phenol red, Panbiotech (Aidenbach, Njemačka)
- MTT, (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid) Merck (Darmstadt, Njemačka)
- AlexaFluor 488, Annexin V/ Dead cell apoptosis kit, Life Technologies GmbH / ThermoFisher Scientific (Darmstadt, Njemačka)
- Acridine Orange otopina, Sigma Aldrich, (St. Louis, SAD).

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Kultivacija i održavanje stanica *in vitro*

Kultura stanica odvija se u laboratoriju za uzgoj stanica u kojem se primjenjuju aseptični postupci i uvjeti, što podrazumijeva rad u sterilnim kabinetima s laminarnim protokom zraka, upotreba sterilnih medija i kemikalija te sterilne tehnike rukovanja, kao što je svakodnevno korištenje UV lampi te detaljna dezinfekcija radnog prostora 70 %-tnim etanolom.



Tumorske stanice kultivirane su u inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pri temperaturi od 37°C i atmosferi s 5 %-tnim CO<sub>2</sub> u bočicama za uzgoj stanica površina 25 cm<sup>2</sup> i 75 cm<sup>2</sup> (Nunc™ EasYFlask™ Cell Culture Flasks, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

MDA-MB-231 i MDCK 1 stanične linije održavane su presađivanjem postupcima: uklanjanja starog medija, odvajanjem stanica od površine bočice, dodatkom tripsina te inkubacijom pri sobnoj temperaturi tijekom 5-6 minuta, prikupljanjem stanica za pokus u Falcon epruvetu ili pasažom, te dodatkom svježeg DMEM medija.

HuT 78 te K-562 stanične linije održavane su oduzimanjem dijela volumena stanica i dodavanjem svježeg RPMI 1640 medija.

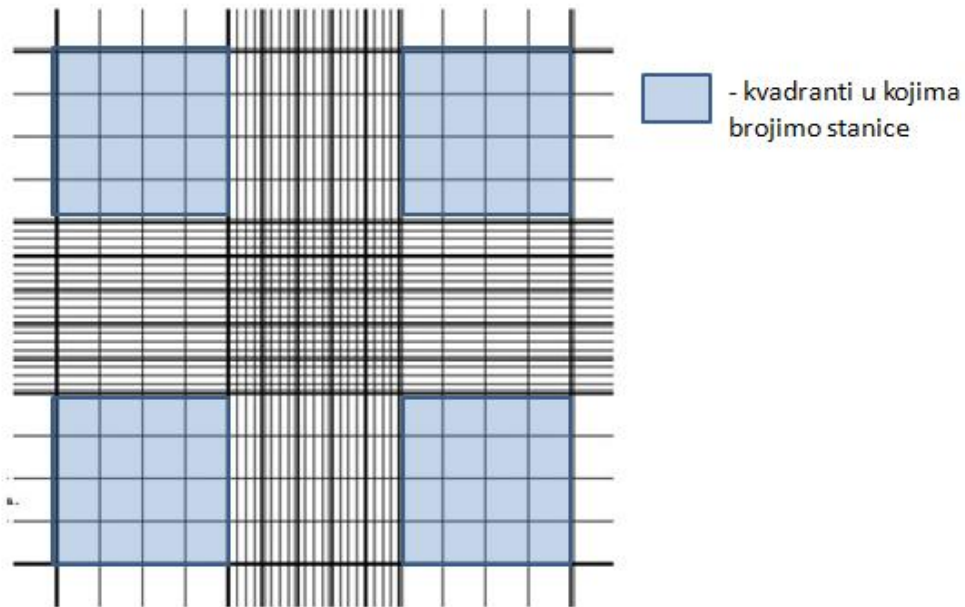
Za održavanje adherentnih staničnih linija (MDA-MB-231 i MDCK 1) korišten je DMEM medij s dodatkom 10 %-tnog FBS-a, 2 mM L-glutamina i 1 %-tnog anti-anti (penicilin/streptomycin). RPMI 1640 medij obogaćen 10 %-tnim FBS-om, 2 mM L-glutaminom, 1 mM natrij-piruvat, 10mM HEPES-om te 1 %-tnim penicilinom/streptomycinom korišten je za uzgoj stanica u suspenziji (K-562 i HuT 78). DMEM medij, kao i RPMI 1640 medij korišteni u daljnjem radu sa stanicama nisu sadržavali dodatak antimikotika/antibiotika.

### **3.3.2. Određivanje broja vijabilnih stanica u staničnoj kulturi**

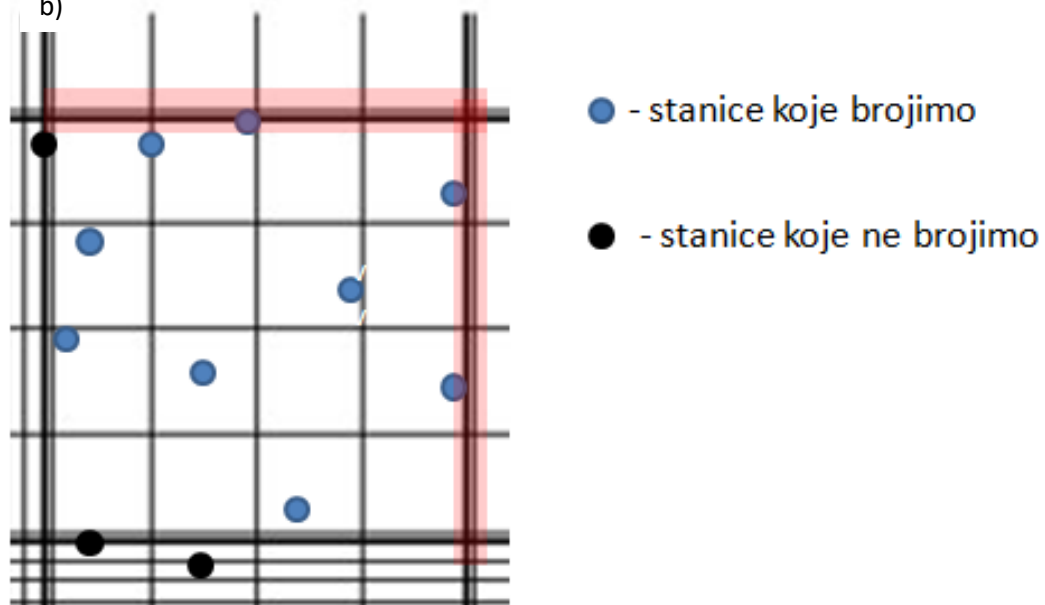
Određivanje broja vijabilnih stanica izvedeno je uz korištenje bojanja stanične suspenzije tripan plavilom. Naime, tripan plavilo ima mogućnost ulaska u mrtve stanice zbog njihove oštećene membrane, dok se u živim stanicama s očuvanim integritetom membrane neće zadržati jer ga one aktivno izbacuju. Iz tog razloga, gledajući stanice pomoću invertnog mikroskopa, razlikujemo žive nebojene i plavo obojene mrtve stanice koje ne brojimo. Postupak je sljedeći: u 50 µl stanične suspenzije dodano je 100 µl 0,4 %-tne otopine tripan plavila, resuspendirano te otpipetirano ispod pokrovnog stakalca u Bürker-Türk-ovu komoricu. U Bürker-Türk-ovoj komorici stanice se broje u 4 vanjska kvadranta (Slika 5a), pri čemu se poštuje pravilo slova L koje podrazumijeva da se prema vlastitom izboru odaberu dvije vanjske stranice kvadranta (primjerice gornja i desna), te se broje one stanice koje se nalaze na tim vanjskim linijama (Slika 5b). Broj živih stanica u 1 mL određen je pod invertnim mikroskopom (Zeiss, Axiovert 25, Njemačka), prema sljedećoj formuli:

$\frac{N}{3} \times 4 = X \times 10^4 / mL$ , pri čemu N označava broj stanica, 4 je broj kvadranta u kojima su stanice brojane, a 3 predstavlja faktor razrjeđenja.

a)



b)



**Slika 5.** a) Mikroskopski prikaz Bürker-Türk-ove komorice, b) pravilo brojanja stanica.

### 3.3.3. Određivanje antiproliferativne aktivnosti MTT testom

MTT test kolorimetrijska je metoda kojom se procjenjuje metabolička aktivnost stanice, odnosno aktivnost mitohondrijskih NADPH dehidrogenaza, koja odgovara vijabilnosti same stanice. Naime, mitohondrijske NADPH dehidrogenaze u živim stanicama reduciraju žute tetrazolijeve soli iz MTT reagensa do netopljivog formazana koji formira kristaliće u stanicama te je ljubičasto obojen. NADPH dehidrogenaze u mrtvim su stanicama neaktivne te u ovom slučaju neće doći do redukcije tetrazolija i promjene boje. Kristalići formazana topljivi su u DMSO-u i SDS-u, a intenzitet obojenja mjeri se na 595 nm, pri čemu je intenzitet obojenja proporcionalan broju živih stanica. Intenzitet je određen spektrofotometrijski korištenjem automatskog čitača mikropločica (iMark, BIO RAD, Hercules CA, USA).

**Postupak:** Adherentne stanice MDA-MB-2311 i MDCK 1 nasadene su na mikrotitarske pločice s 96 jažica u koncentraciji od  $2 \times 10^4$  stanica/ml. Stanice su ostavljene u CO<sub>2</sub> inkubatoru na temperaturi od 37 °C tijekom noći kako bi se prihvatile za podlogu. Nakon toga tretirane su derivatima (MB-132, MB-133, MB-173) u koncentraciji od  $1 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M i  $1 \times 10^{-6}$  M tijekom 72 sata. Po isteku vremena inkubacije, sa stanica je uklonjen medij te je dodan MTT reagens u koncentraciji od 5 mg/ml te je uslijedila inkubacija u trajanju od 4 sata nakon koje su kristalići formazana otopljeni u DMSO-u uz trešnju na tresilici (OS-10 Orbital Shaker, Biosan, Latvia). Intenzitet obojenja (apsorbancija) izmjeren je u triplikatu na automatskom čitaču mikroploča na 595 nm.

Stanice u suspenziji K-562 i HuT 78 nasadene su na mikrotitarske pločice s 96 jažica u koncentraciji od  $1 \times 10^5$  stanica/ml. Isti dan izvršeno je tretiranje stanica derivatima u koncentraciji od  $1 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M i  $1 \times 10^{-6}$  M, nakon čega su stanice inkubirane tijekom 72 h u CO<sub>2</sub> inkubatoru (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Nakon završene inkubacije na stanice je dodano 5 mg/ml MTT-a te je uslijedila inkubacija s MTT-em u trajanju od 4 sata. Formirani tetrazolijevi kristalići otopljeni su u 10 %-tnom SDS-u tijekom noći u CO<sub>2</sub> inkubatoru. Čitač mikroploča korišten je za mjerenje intenziteta obojenja (apsorbancije) na 595 nm, a mjerenja su izvedena u triplikatu.

Na temelju očitanih rezultata apsorbcije određen je udio živih stanica pomoću sljedeće formule:

$$\% = \frac{A_{\text{uzorka}} - A_{\text{slijepa kontrola}}}{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{slijepa kontrola}}} \times 100, \text{ pri čemu je slijepa proba za adherentne stanice bio}$$

DMSO s MTT-em, a za stanice u suspenziji SDS u HCL-u s medijem i MTT-em.

### 3.3.4. Određivanje udjela stanica u apoptozi protočnom citometrijom

Kako bi se utvrdilo je li inhibitorno djelovanje ispitivanih derivata povezano s indukcijom apoptoze, urađeno je bojanje stanica Annexin V FITC-om (AlexaFluor 488, Annexin V/ Dead cell apoptosis kit) te propidij jodidom (PI) nakon tretmana derivatima u finalnoj koncentraciji od  $5 \times 10^{-6}$  M tijekom 24 sata. Nakon što su stanice obojane, protočnim citometrom izvršena je daljnja analiza.

Ova metoda temelji se na selektivnom vezanju Annexina V na fosfatidilserin te propidij jodida (PI) na DNA. Fosfatidilserin se u normalnih stanica nalazi s unutarnje strane plazma membrane, dok se njegova translokacija na vanjsku stranu membrane događa u tijeku apoptoze te se smatra markerom rane faze apoptoze. Annexin V je protein koji se veže za fosfatidilserin (PS) izložen na površini stanica u apoptozi, a fluorokrom FITC omogućuje detekciju stanica u apoptozi pri analizi protočnim citometrom s obzirom da u pobuđenom stanju fluoresciraju u zelenoj boji. Budući samo obilježavanje Annexin V FITC-om nije dostatno kako bi se razlikovale stanice u ranoj i kasnoj apoptozi te u nekrozi, stanice su bojane i propidij jodidom. Naime, propidij jodid ulazi u stanice s oštećenom membranom, veže se za molekulu DNA te fluorescira crveno. Zbog toga će stanice u ranoj apoptozi biti obilježene samo Annexin-V FITC-om, stanice u kasnoj apoptozi i nekrozi bit će obilježene dualno, Annexin-V FITC-om i PI, a žive stanice će ostati nebojene.

**Postupak:** Adherentne stanice MDA-MB-231 nasađene su u ploče sa 6 jažica u koncentraciji od  $3 \times 10^5$  stanica/jažici, volumena 3 mL u jažici, te su ostavljene preko noći u CO<sub>2</sub> inkubatoru. Nakon toga stanice su tretirane MB-132, MB-133 i MB-173 derivatima u finalnoj koncentraciji od  $5 \times 10^{-6}$  M te je nastavljena inkubacija u trajanju od 24 h. Nakon inkubacije stanice su pomoću tripsina odvojene od podloge te zajedno s medijem prebačene u Falcon epruvete od 15 mL, isprane PBS-om te centrifugirane 5 minuta na 3000 rpm kako bi se isprale od medija te slegle na dno epruvete. Supernatant je odbačen dekantiranjem, a stanice su resuspendirane u 100 µL pufera za vezivanje Annexina (Annexin binding buffer) i prebačene u epruvete za protočnu citometriju, nakon čega je dodano 5 µL Annexina te 1 µL PI. Slijedila je inkubacija u trajanju od 15 minuta te dodatak 400 µL pufera za vezivanje Annexina, nakon čega su stanice stavljene na led. Analiza protočnim citometrom (FascCanto II, BD Bioscience) izvršena je u duplikatu na 50.000 stanica. Kao pozitivna kontrola korišten je doksorubicin u finalnoj koncentraciji od  $1 \times 10^{-6}$  M. Dvije su bile negativne kontrole – nebojana i kontrolne netretirane stanice.

Za stanice u suspenziji (K-562 i HuT 78) postupak se razlikovao u tome što su stanice

nasadene u koncentraciji od  $5 \times 10^5$  stanica/jažici, tretiranje stanica derivatima izvršeno je isti dan, a doksorubicin je dodavan u koncentraciji od  $3 \times 10^{-7}$  M.

### 3.3.5. Određivanje udjela stanica u autofagiji protočnom citometrijom

Utjecaj novo sintetiziranih 7-kloro-4-aminokinolinskih derivata istražen je s obzirom na zanimljivu interakciju između apoptoze i autofagije, kao i samog svojstva autofagije da inducira staničnu smrti ili pak potiče stanično preživljenje. Učinak derivata na autofagiju ispitivan je nakon tretmana u trajanju od 24 sata. Prikupljene stanice bojane su Acridine Orange bojom koja ulazi u kisele vakuole u stanici, kao što je autolizosom, marker autofagije. Acridine Orange biva protonirana kada uđe u kisele vakuole te fluorescira crveno, što se detektira na protočnom citometru, pri čemu je intenzitet obojenja proporcionalan broju kiselih vakuola (lizosoma, autolizosoma) u stanici.

**Postupak:** Kao i u svrhu analize udjela stanica u apoptozi, adherentne stanice su nasadene u koncentraciji od  $3 \times 10^5$  stanica/jažici u volumenu 3 mL/jažici, dok su suspenzijske stanične linije nasadene u koncentraciji od  $5 \times 10^5$  stanica/jažici u volumenu od 3 mL/jažici. MDA-MB-231 stanice su preko noći inkubirane u CO<sub>2</sub> inkubatoru te nakon toga tretirane derivatima, dok su stanice K-562 i HuT 78 tretirane na dan nasađivanja. Tretman derivatima MB-132, MB-133 i MB-173 u koncentraciji od  $5 \times 10^{-6}$  M trajao je 24 sata, nakon čega je medij sa stanicama prikupljen u Falcon epruvete, pri čemu su MDA-MB-231 stanice prethodno odvojene od podloge tripsinizacijom. Stanice su zatim isprane PBS-om, centrifugirane 5 minuta na 3000 rpm kako bi se spustile na dno epruvete, a supernatant je odbačen. Nakon toga slijedio je još jedan postupak ispiranja PBS-om te centrifugiranje kako bi se isprao medij. Supernatant je odbačen, dodano je 500 µL prethodno pripremljene otopine Acridine Orange boje u finalnoj koncentraciji od 1 µg/mL te su stanice prebačene u tubice za protočnu citometriju. Slijedila je inkubacija na 37°C u trajanju od 30 minuta, prebacivanje tubica u led, te analiza protočnim citometrom, pri čemu je ona izvedena u duplikatu na 50.000 stanica.

### 3.3.6. Statistička obrada podataka

MTT test citotoksičnosti izveden je u triplikatu kroz tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja IC<sub>50</sub> vrijednost sa standardnim devijacijama. Određivanje udjela stanica

u apoptozi te udjela stanica u autofagiji izveden je u duplikatu. Rezultati analize udjela stanica u apoptozi prikazani su kao postotak populacije uz koeficijent varijacije, dok su rezultati analize udjela stanica u autofagiji izraženi kao vrijednost intenziteta fluorescencije sa standardnim devijacijama. Ovakav prikaz rezultata dobiven je pomoću statističke funkcije za analizu podataka i obrade rezultata protočne citometrije. Statistička obrada podataka određena je u XLSTAT 2019 programu, pri čemu su podaci za udio stanica u apoptozi te udio stanica u autofagiji analizirani ANOVA testom s Bonferroni korekcijom. Rezultati protočnog citometra analizirani su računalnim programom Flow Jo software (v10.4.2., LLC, Data Analysis Software).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Određivanje antiproliferativne aktivnosti 7-kloro-4-aminokinolinskih derivata

Antiproliferativna aktivnost derivata MB-132, MB-133 i MB-173 ispitana je MTT testom na tumorskim staničnim linijama MDA-MB-231 (adenokarcinom dojke), K-562 (kronična mijeloidna leukemija) te HuT 78 (T-stanični limfom), kao i na normalnoj MDCK 1 (Madin-Darby epitelne stanice psa) staničnoj liniji. Navedene stanične linije tretirane su derivatima u koncentraciji od  $1 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M i  $1 \times 10^{-6}$  M te je antiproliferativna aktivnost određena nakon 72 sata. Rezultati su pokazali da ispitivani kinolinski derivati pokazuju pošteno djelovanje na normalnu (MDCK 1) staničnu liniju u odnosu na tumorske stanice, od kojih su veću osjetljivost pokazale stanice leukemije (K-562) i limfoma (HuT 78) u usporedbi sa stanicama adenokarcinoma dojke. Usporedbom djelovanja derivata na pojedinu staničnu liniju uočeno je da je derivat MB-173 imao najizraženije djelovanje u inhibiciji rasta staničnih linija MDA-MB-231 te HuT 78, dok je derivat MB-132 najuspješnije inhibirao rast K-562 stanica (Tablica 1).

**Tablica 1. Osjetljivost normalnih i tumorskih stanica prema ispitivanim derivatima.** IC<sub>50</sub> - koncentracija derivata pri kojoj je inhibirano 50 % staničnog rasta. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina IC<sub>50</sub> (μM) vrijednosti ± standardna devijacija od tri nezavisna ponavljanja.

Derivati	IC <sub>50</sub> (μM)			
	MDCK 1	MDA-MB-231	K-562	HUT 78
MB-132	71,3 ± 14,5	55,9 ± 30,1	0,9 ± 0,2	9,2 ± 3,1
MB-133	>100	62,8 ± 21,6	4,8 ± 3,4	11,0 ± 6,7
MB-173	100	19,5 ± 15,2	21,2 ± 2,0	3,5 ± 1,5

### 4.2. Analiza udjela stanica u apoptozi protočnom citometrijom

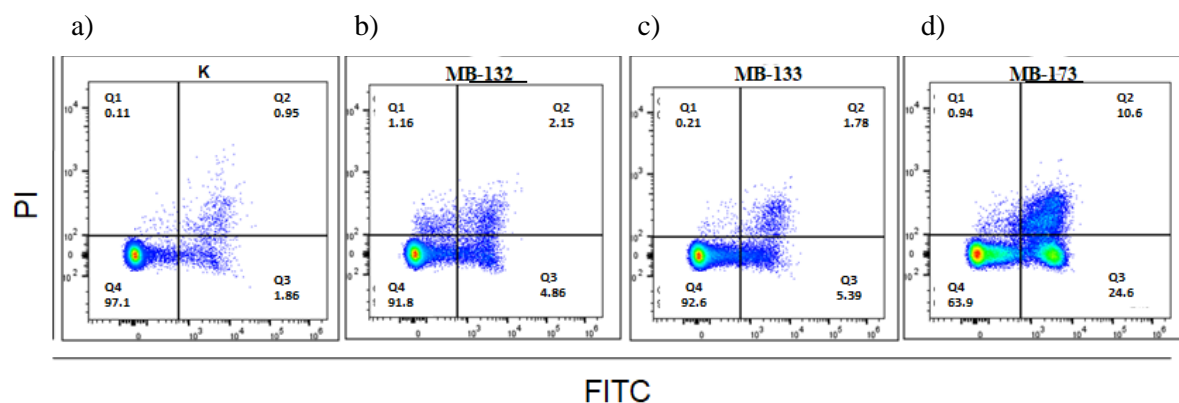
S obzirom na prethodne rezultate antiproliferativne aktivnosti 7-kloro-4-aminokinolinskih derivata (MB-132, MB-133 i MB-173), bilo je potrebno utvrditi način umiranja stanica. U tu svrhu, tumorske su stanice (MDA-MB-231, K-562, HuT 78) tretirane

## Rezultati

derivatima u finalnoj koncentraciji od  $5 \times 10^{-6}$  M tijekom 24 h, prikupljene te bojane Annexin V FITC-om (AlexaFluor 488, Annexin V/ Dead cell apoptosis kit) te propidij jodidom (PI).

Rezultati su prikazani kao točkasti dijagrami podijeljeni u kvadrante Q1-Q4 koji prikazuju udio stanica u kasnoj apoptozi/nekrozi (Q2), udio stanica u ranoj apoptozi (Q3) te udio živih stanica (Q4), te grafički prikazom udjela stanica u apoptozi u kontrolnih te tretiranih stanica. Sva mjerenja izvedena su u duplikatu.

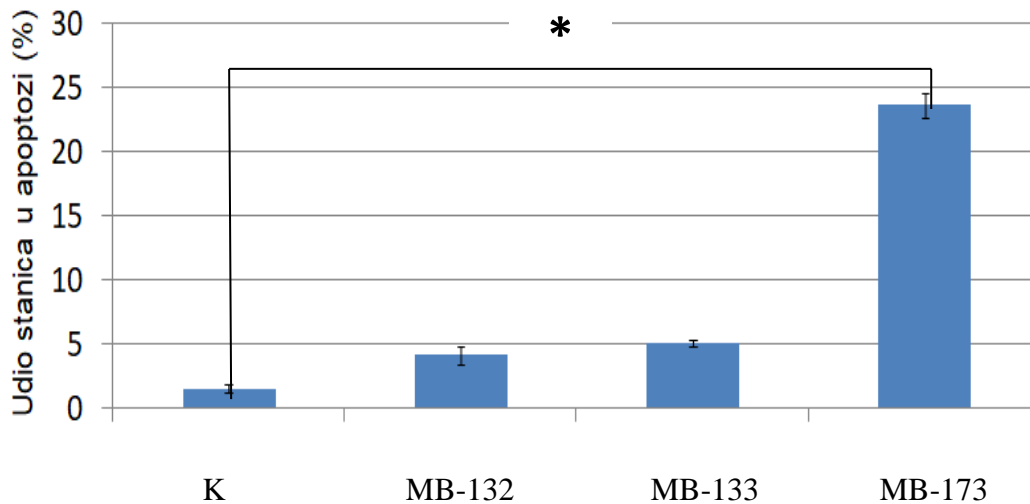
Tretman K-562 stanica derivatom MB-132, kao i derivatom MB-133 pokazao je blago povećan udio stanica u apoptozi u odnosu na kontrolne stanice. Naime, u kontrolnih stanica udio stanica u apoptozi iznosio je  $1,56 \pm 0,31$  %, dok je taj udio iznosio  $4,16 \pm 0,71$  % nakon tretmana MB-132, odnosno  $5,13 \pm 0,27$  % nakon tretmana derivatom MB-133. Nadalje, statistički značajna razlika ( $P < 0,05$ ) udjela stanica u apoptozi primjećena je nakon tretiranja stanica derivatom MB-173, pri čemu je udio stanica u apoptozi iznosio  $23,6 \pm 1$  % (Slike 6 i 7).



**Slika 6.** Indukcija apoptoze u K-562 stanica tretiranih derivatima MB-132, MB-133, MB-173 u koncentraciji  $5 \times 10^{-6}$  M tijekom 24 sata. Slika prikazuje točkaste dijagrame a) kontrolne, netretirane stanice, b) stanice nakon tretmana MB-132 derivatom, c) stanice nakon tretmana derivatom MB-133, te d) stanice nakon tretmana derivatom MB-173, pri čemu su stanice u kvadrantu Q2 dvostruko pozitivne, u kvadrantu Q3 Annexin V FITC pozitivne, a u kvadrantu Q4 dvostruko negativne.



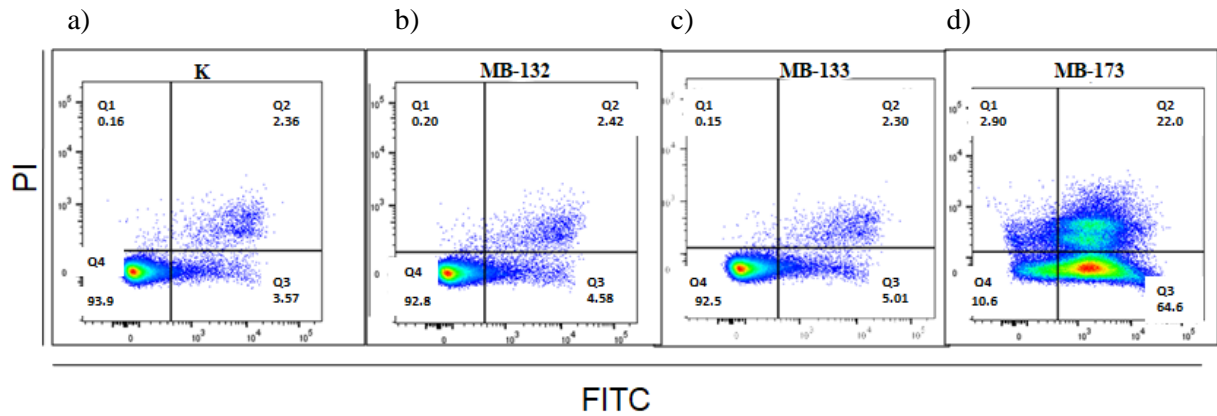
## Rezultati



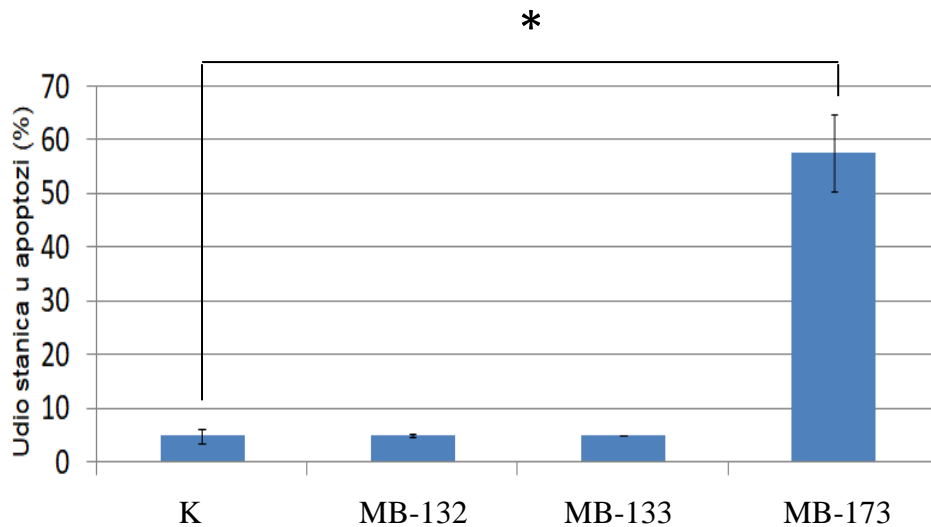
**Slika 7.** Grafički prikaz udjela K-562 stanica u apoptozi, stupci su formirani od aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama; "\*" označava statistički značajnu P vrijednost, koja je definirana kao  $P < 0,05$ .

Djelovanje derivata na MDA-MB-231 staničnu liniju pokazao je sličan proapoptotički učinak onom na K-562 staničnoj liniji. Indukcija apoptoze statistički je značajna bila samo nakon tretmana derivatom MB-173, koji je doveo do povećanja udjela stanica u ranoj apoptozi za više od 60 % u odnosu na kontrolne stanice (Slika 9). Naime, udio stanica u apoptozi kontrolnih stanica iznosio je  $4,45 \pm 0,88$  %, a nakon tretmana derivatom MB-173 bio je  $57,55 \pm 7,05$  %. Povećan udio stanica u kasnoj apoptozi/nekrozi također je uočen u stanica tretiranih derivatom MB-173. Derivati MB-132 i MB-133 nisu značajno inducirali apoptozu; udio stanica u apoptozi tretiranih MB-132 je  $4,96 \pm 0,38$  %, a tretiranih MB-133  $4,95 \pm 0,06$  % (Slika 8).

## Rezultati



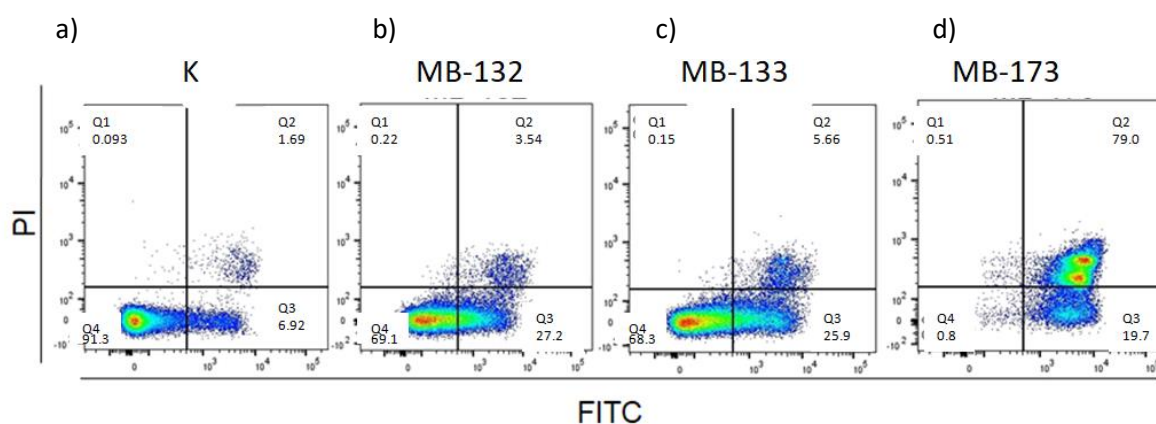
**Slika 8.** Indukcija apoptoze u MDA-MB-231 stanica tretiranih derivatima MB-132, MB-133, MD-173 u koncentraciji  $5 \times 10^{-6}$  M tijekom 24 sata. Slika prikazuje točkaste dijagrame a) kontrolne, netretirane stanice, b) stanice nakon tretmana MB-132 derivatom, c) stanice nakon tretmana derivatom MB-133, te d) stanice nakon tretmana derivatom MB-173, pri čemu su stanice u kvadrantu Q2 dvostruko pozitivne, u kvadrantu Q3 Annexin V FITC pozitivne, a u kvadrantu Q4 dvostruko negativne.



**Slika 9.** Grafički prikaz udjela MDA-MB-231 stanica u apoptozi, stupci su formirani od aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama; "\*" označava statistički značajnu P vrijednost, koja je definirana kao  $P < 0,05$ .

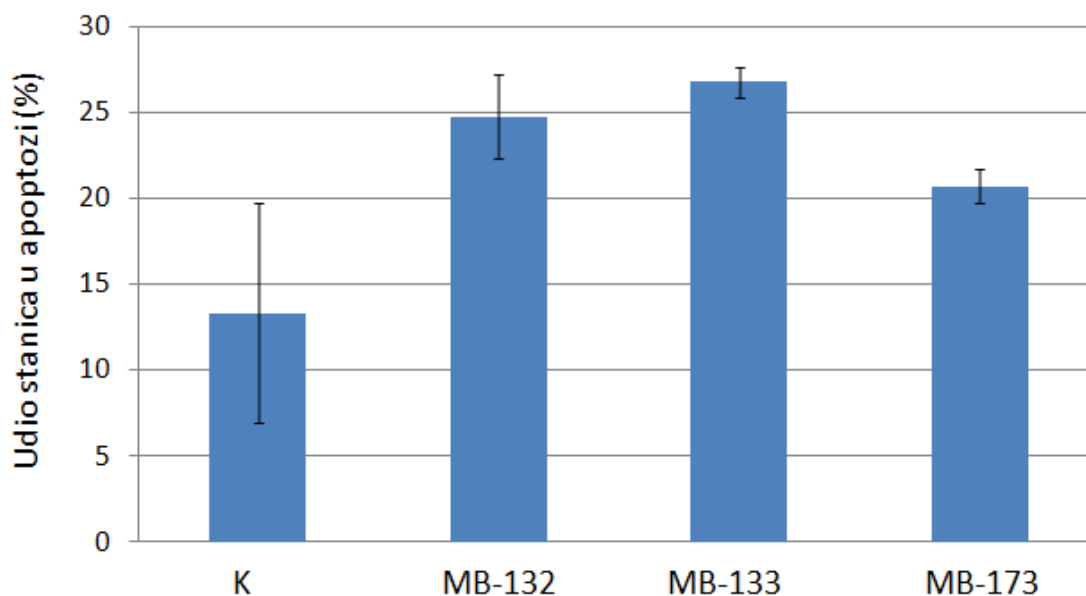
## Rezultati

U HuT 78 stanicama derivat MB-133 pokazao je najizraženije proapoptotičko djelovanje. Naime, udio stanica u apoptozi kontrolnih stanica bio je  $13,31 \pm 6,39 \%$ , u stanica tretiranih MB-132  $24,75 \pm 2,45 \%$ , u stanicama tretiranim derivatom MB-133 bio je  $26,8 \pm 0,9 \%$ , a nakon tretmana derivatom MB-173  $20,7 \pm 1 \%$  (Slika 10). Nakon tretmana derivatom MB-173 primjećuje se vrlo mali broj živih stanica (samo  $0,715 \pm 0,085 \%$ ), dok je visok udio stanica u kasnoj apoptozi/nekrozi ( $78,3 \pm 0,7 \%$ ). Aktivacija apoptoze u HuT 78 stanicama nije bila statistički značajna (Slika 11), pri čemu se navedeno može pripisati velikom udjelu stanica u apoptozi u kontrolnim stanicama.



**Slika 10.** Indukcija apoptoze u HuT 78 stanica tretiranih derivatima MB-132, MB-133, MB-173 u koncentraciji  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$  tijekom 24 sata. Slika prikazuje točkaste dijagrame a) kontrolne, netretirane stanice, b) stanice nakon tretmana MB-132 derivatom, c) stanice nakon tretmana derivatom MB-133, te d) stanice nakon tretmana derivatom MB-173, pri čemu su stanice u kvadrantu Q2 dvostruko pozitivne, u kvadrantu Q3 Annexin V FITC pozitivne, a u kvadrantu Q4 dvostruko negativne.

## Rezultati



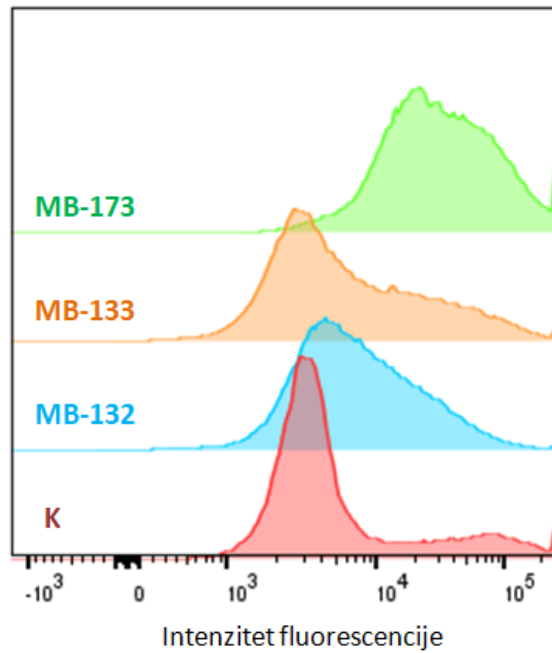
**Slika 11.** Grafički prikaz udjela HuT 78 stanica u apoptozi, stupci su prikazani kao aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama.

### 4.3. Analiza udjela stanica u autofagiji protočnom citometrijom

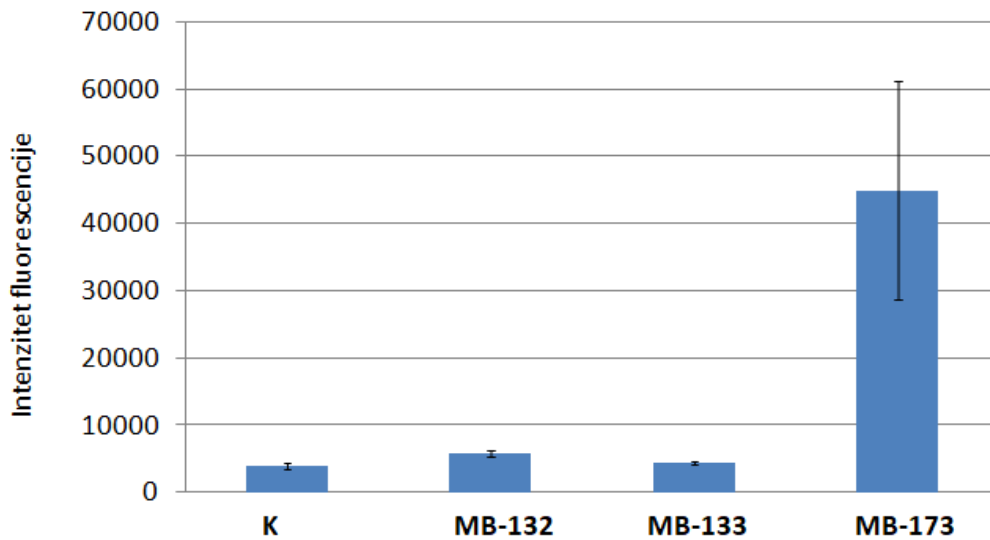
Udio stanica u autofagiji određen je na tumorskim stanicama (MDA-MB-231, K-562 i HuT 78) tretiranim 24 sata derivatima MB-132, MB-133 i MB-173 u koncentraciji od  $5 \times 10^{-6}$  M. Nakon tretmana stanice su bojane Acridine Orange bojom, koja fluorescira crveno kada uđe u kisele vakuole kao što je autolizosom, tako da je intenzitet fluorescencije proporcionalan količini autolizosoma u stanicama. Budući da K predstavlja kontrolne, odnosno netretirane stanice, signal dobiven iz tih stanica predstavlja bazalnu razinu autofagije u stanica s kojim su uspoređeni intenziteti fluorescencije tretiranih stanica. Rezultati su prikazani histogramima koji su dobiveni analizom rezultata FlowJo softwareom te grafički prikazom udjela stanica u autofagiji.

Stanična linija HuT 78 pokazala je porast u intenzitetu fluorescencije apsorbirane Acridine Orange boje nakon tretmana svim derivatima, međutim niti jedan derivat nije uzrokovao statistički značajnu razliku između kontrolnih i tretiranih stanica (Slike 12 i 13). Najveći porast fluorescencije bilježi se nakon tretmana derivatom MB-173, ali zbog znatne varijacije u mjerenjima taj porast nije bio statistički značajan (Slika 13).

## Rezultati



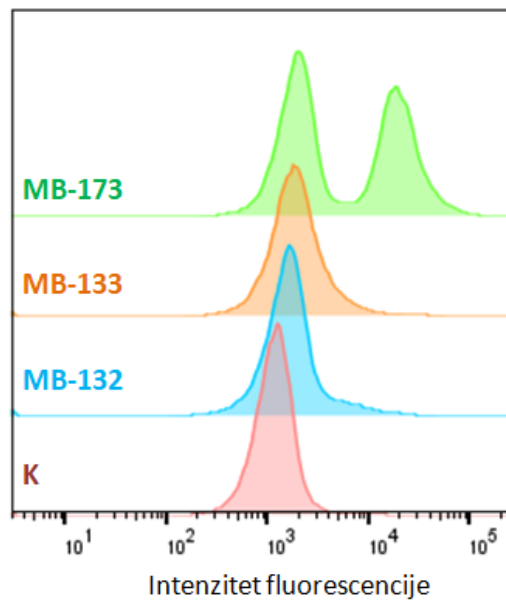
**Slika 12.** Histogramski prikaz usporedbe djelovanja kinolinskih derivata na autofagiju HuT 78 stanične linije. Slika prikazuje odnos intenziteta fluorescencije između kontrolne i populacija tretiranih stanica.



**Slika 13.** Grafički prikaz učinka kinolinskih derivata na autofagiju HuT 78 stanične linije, stupci su prikazani kao aritmetičke sredine dvaju ponavljanja sa standardnim devijacijama.

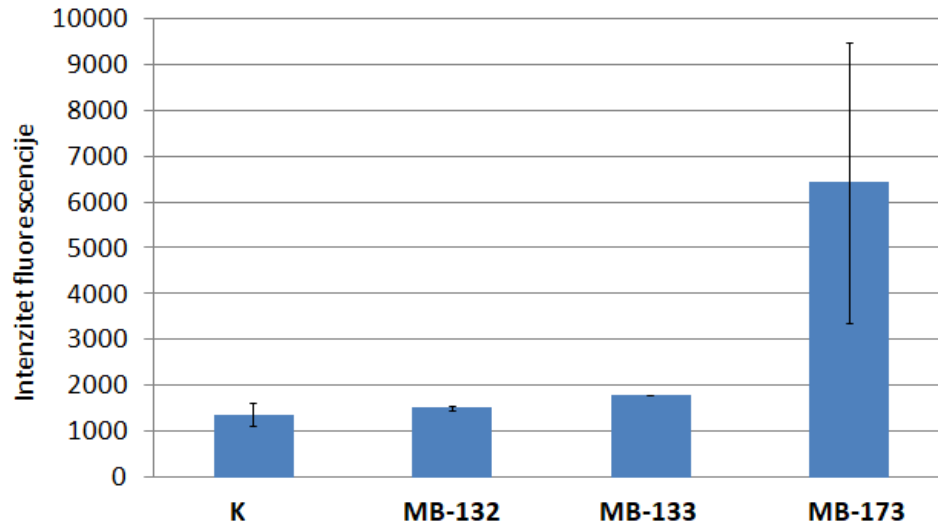
## Rezultati

Slika 14 prikazuje odnos intenziteta fluorescencije Acridine Orange boje u K-562 staničnoj liniji, iz čega je vidljivo da nema veće razlike između netretiranih stanica i onih tretiranih derivatima MB-132 i MB-133. S druge strane, dualan signal uočava se nakon tretmana derivatom MB-173, što ukazuje na dvije populacije stanica – one u kojima nema promjene u sintezi autofagosoma te one u kojima je znatno veći udio autofagosoma u odnosu na kontrolne stanice. Iako je nakon tretmana derivatom MB-173 velik broj stanica fluorescirao crveno, zbog dualnog signala i varijacija u mjerenju, razlika nije bila statistički značajna (Slika 15).



**Slika 14.** Histogramski prikaz usporedbe djelovanja kinolinskih derivata na autofagiju K-562 stanične linije. Slika prikazuje odnos intenziteta fluorescencije između kontrolne i populacija tretiranih stanica.

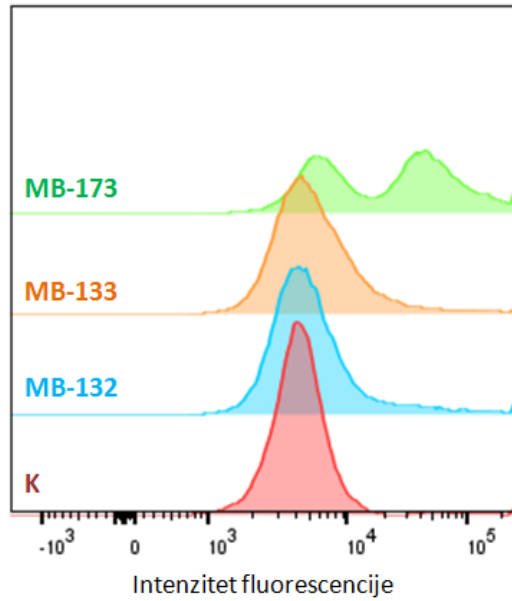
## Rezultati



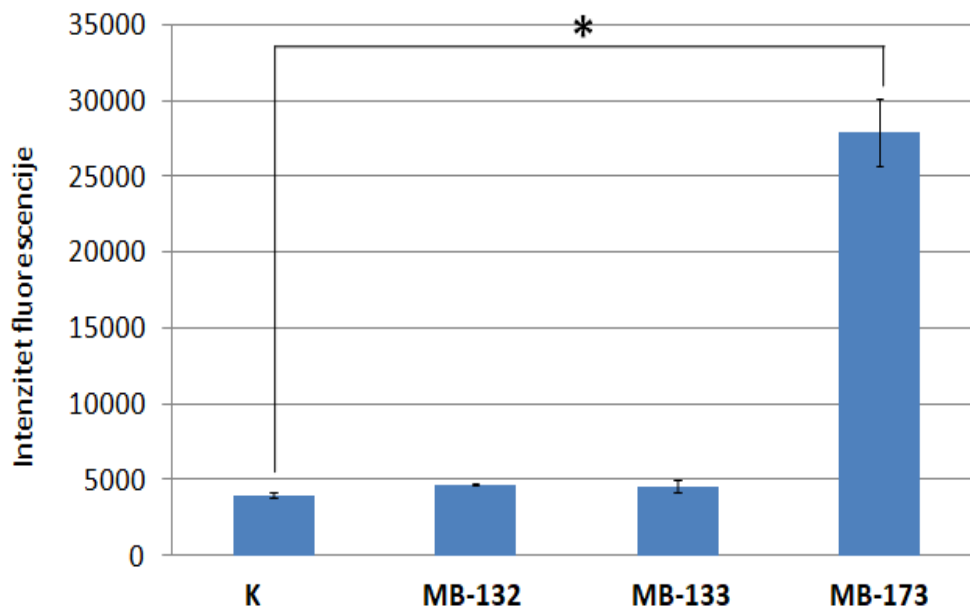
**Slika 15.** Grafički prikaz učinka kinolinskih derivata na autofagiju stanične linije K-562, stupci su prikazani kao aritmetičke sredine dvaju ponavljanja sa standardnim devijacijama.

Iz slike 16 možemo iščitati kako nije bilo značajne razlike u MDA-MB-231 staničnoj liniji između stanica tretiranih derivatima MB-132 i MB-133 te onih koje nisu bile tretirane. Kao i u K-562 stanica, opet se uočava dualan signal nakon tretmana MB-173 derivatom, što govori u prilog dvama populacijama stanica. Intenzitet fluorescencije Acridine Orange boje u stanicama tretiranim MB-173 statistički je značajno ( $P < 0,05$ ) bio veći u odnosu na kontrolne stanice (Slika 17).

## Rezultati



**Slika 16.** Histogramski prikaz usporedbe djelovanja kinolinskih derivata na autofagiju MDA-MB-231 stanične linije. Slika prikazuje odnos intenziteta fluorescencije između kontrolne i populacija tretiranih stanica.



**Slika 17.** Grafički prikaz učinka kinolinskih derivata na autofagiju stanične linije MDA-MB-231, stupci su formirani od aritmetičke sredine dvaju ponavljanja sa standardnim devijacijama; "\*" označava statistički značajnu P vrijednost, koja je definirana kao  $P < 0,05$ .



## 5. RASPRAVA

Zbog pojave rezistencije tumorskih stanica na trenutno korištene protutumorske lijekove, kao i zbog nuspojava koje su prisutne uz korištenje terapije, javlja se sve veća potreba za sintezom novih derivata s ciljem selektivne inhibicije rasta tumorskih stanica. S obzirom da je u velikoj većini tumorskih stanica upravo oštećena regulacija apoptoze odgovorna za nekontroliranu proliferaciju, zahtjeva se pristup sintezi derivata s proapoptotičkim djelovanjem. Derivati s kinolinskom okosnicom pokazuju značajno protutumorsko djelovanje te se vidi veliki potencijal u korištenju ovih derivata u terapiji tumora (42, 43). Na temelju toga, u ovom je radu na tumorskim stanicama ispitano antiproliferativno i proapoptotičko djelovanje triju novo sintetiziranih 7-kloro-4-aminokinolinskih derivata (MB-132, MB-133, MB-173), kao i njihov utjecaj na autofagiju. 7-Kloro-4-aminokinolinski derivati sintetizirani su u obliku hibridne molekule građene od dva farmakofora - kinolinske i benzimidazolske okosnice. Ovakva sinteza hibridnih molekula nov je i vrlo obećavajući pristup u stvaranju protutumorskih lijekova nove generacije jer se na taj način povećava učinkovitost, a smanjuje rizik od toksičnosti terapije (53, 75, 76). Derivati su sintetizirani s ciljem inhibicije proliferacije tumorskih stanica aktivacijom apoptoze obzirom da su prethodno poznati mehanizmi djelovanja aminokinolinskih spojeva kao aktivatora apoptoze i inhibitora autofagije (43, 56 - 66), te proapoptotički učinak benzimidazola (78). Krstulović i suradnici prethodno su objavili postupak sinteze sličnih hibridnih molekula s kinolinskom i arilaminskom (fenilbenzimidazolil-amidin) okosnicom koje pokazuju potencijal vezanja za DNA, antiproliferativan učinak te zastoj u staničnom ciklusu (53).

Analizom citotoksičnosti testiranih kinolinskih derivata uočeno je da pokazuju poštedno djelovanje prema normalnoj staničnoj liniji (MDCK 1) u odnosu na tumorske stanične linije (HuT 78, K562, MDA-MB-231), na čiji su rast djelovali inhibitorno. Ovakvo poštedno djelovanje na normalnu staničnu liniju je vrlo poželjno, s obzirom na traženu selektivnost inhibicije rasta prema tumorskim stanicama. Rezultati su pokazali raznolik inhibitorni učinak između derivata, koji je bio ovisan o vrsti stanica, primijenjenoj koncentraciji, kao i samoj strukturi derivata. Derivat MB-173 pokazao je izrazitu citotoksičnost prema MDA-MB-231 te HuT 78 staničnim linijama, a rast K-562 stanične linije je najuspješnije inhibirao derivat MB-132.

Shodno tim rezultatima, slijedilo je daljnje istraživanje kako bi se utvrdio mehanizam indukcije stanične smrti. Određivanjem udjela stanica u apoptozi protočnim citometrom

utvrđeno je kako je na staničnim linijama K562 te MDA-MB-231 najizraženije proapoptotičko djelovanje pokazao derivat MB-173. Nadalje, rezultat analize apoptoze bio je statistički značajan ( $P < 0,05$ ), što ukazuje na visoku učinkovitost ovog derivata u indukciji apoptoze. Isti je efekt aktivacije apoptoze na MDA-MB-231 staničnoj liniji pokazao derivat sa 7-klorokinolinskom okosnicom iz istraživanja Begnini i suradnika, što potvrđuje zaključak kako derivati ovakve strukture pokazuju protutumorski potencijal prema trostruko negativnim stanicama adenokarcinoma dojke (66). Na HuT 78 staničnoj liniji najizraženije proapoptotičko djelovanje pokazao je derivat MB-133, međutim ono nije bilo statistički značajno ( $P > 0,05$ ), što se može pripisati vrlo velikom udjelu stanica u apoptozi u populaciji netretiranih stanica. Zanimljivo djelovanje na HuT 78 liniju primijećeno je nakon tretmana derivatom MB-173. Naime, analizom protočnim citometrom uočeno je kako je visok udio stanica u kasnoj apoptozi/nekrozi ( $78,3 \pm 0,7 \%$ ), uz nizak udio živih stanica ( $0,715 \pm 0,085 \%$ ), što ukazuje na to da je ovaj derivat učinkovito uzrokovao smrt tumorskih stanica, iako ne nužno putem aktivacije apoptoze. Nadalje je potrebno odrediti točan mehanizam aktivacije apoptoze detaljnijim metodama, jer se konkretan zaključak o indukciji apoptoze ne može temeljiti samo na rezultatima ove analize protočnim citometrom.

Odnos apoptoze i autofagije je kompleksan. Najčešće djeluju na način da se međusobno isključuju, iako u pojedinim slučajevima djeluju sinergistički u indukciji stanične smrti te je pojava istovremeno aktivne apoptoze i autofagije vrlo rijetko uočena (25). Na temelju rezultata analize udjela broja stanica u apoptozi te pokazanog proapoptotičkog djelovanja derivata, i u skladu s poznatim činjenicama, bilo je najizglednije kako će ispitivani derivati inhibirati proces autofagije, s obzirom da ona najčešće djeluje protektivno te omogućuje tumorskim stanicama rezistenciju na citostatike (37). Suprotno, analizom udjela stanica u autofagiji uočeno je kako je veći broj stanica u autofagiji nakon tretmana derivatima, što je statistički značajno ( $P < 0,05$ ) bilo za MDA-MB- 231 staničnu liniju. Kako bi se pravilno interpretirali ovakvi rezultati, pogotovo s obzirom na rezultate apoptoze, treba uzeti u obzir više faktora. Jedan od njih je što korištena metoda bojanja acidotropnom Acridine Orange bojom i analiza protočnim citometrom nisu dovoljno specifične, kao što ukazuju rezultati dosadašnjih istraživanja (78) te bi se za potvrdu cjelovitog procesa autofagije trebale koristiti dodatne metode. Naime, Acridine Orange boja lizosome, a pojačan intenzitet je uočljiv i kod povećanog broja ili volumena lizosoma, kao i autolizosoma. Nadalje, s obzirom na poznato inhibitorno djelovanje klorokina na autofagiju koje se postiže prevencijom fuzije autofagosoma s lizosomom ili sprječavanjem razgradnje materijala uz pojavu prekomjernog nakupljanja autolizosoma, upravo je taj povećan

udio autofagosoma/autolizosoma mogući uzrok pojačanog signala fluorescencije u stanica tretiranim kinolinskim derivatima (68). Kao što navode autori Shen i Codogno, povećan broj autofagosoma nije nužno znak autofagijom-posredovane stanične smrti, već izglednije znak blokiranog puta autofagije zbog spriječenog sazrijevanja autofagosoma, a također veća je šansa da je inducirana autofagija protektivna (26). Osim toga, kako bi se utvrdilo je li u ovom slučaju pojačana aktivacija autofagije promovirala staničnu smrt ili ju je pokušala inhibirati, potrebno je provesti ispitivanje s inhibitorima autofagije (farmakološkim i genetičkim) te nakon toga utvrditi je li inhibicija autofagije pojačala antitumorsku aktivnost ovih derivata ili ju je pak smanjila (27).

S obzirom na navedeno, potrebno je daljnje istraživanje protutumorskog potencijala ovih derivata kinolina zbog obećavajućih rezultata testa citotoksičnosti, s naglaskom na potvrdu rezultata autofagije te otkrivanje mehanizma aktivacije apoptoze.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja utjecaja 7-kloro-4-aminokinolinskih derivata na inhibiciju rasta, apoptozu te autofagiju tumorskih stanica može se zaključiti sljedeće:

- ispitivani derivati inhibiraju rast tumorskih stanica, uz pošteditno djelovanje na normalnu staničnu liniju
- stanične linije HuT 78 i K-562 pokazuju veću osjetljivost prema kinolinskim derivatima od MDA-MB-231 stanica
- najveću citotoksičnost pokazao je derivat MB-173 na staničnim linijama MDA-MB-231 i HuT 78, dok je na staničnoj liniji K-562 najveću citotoksičnost pokazao derivat MB-132
- derivat MB-173 značajno inducira apoptozu u MDA-MB-231 te u K-562 staničnoj liniji
- derivat MB-173 pokazao je najveći učinak na autofagiju stanične linije MDA-MB-231
- djelovanje testiranih kinolinskih hibrida na tumorske stanice potrebno je detaljnije istražiti, posebice djelovanje derivata MB-173.

## 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Ispitati djelovanje novo sintetiziranih 7-kloro-4-aminokinolinskih derivata na rast tumorskih stanica te odrediti način umiranja stanica tretiranih ispitivanim derivatima određivanjem aktivnosti apoptoze i autofagije protočnom citometrijom.

**Nacrt studije:** Istraživanje je osmišljeno kao pokusno (eksperimentalno).

**Materijal i metode:** Učinak 7-kloro-4-aminokinolinskih derivata ispitan je na tumorskim stanicama (MDA-MB-231, K-562, HuT 78) te na normalnoj staničnoj liniji (MDCK 1). Inhibitorno djelovanje kinolinskih derivata na rast tumorskih stanica utvrđeno je MTT metodom. Proapoptotičko djelovanje kinolina na tumorske stanice određeno je protočnom citometrijom uz prethodno bojanje stanica Annexin V FITC-om te propidij jodidom. Utjecaj kinolina na autofagiju određen je na protočnom citometru na stanicama obilježenim Acridine Orange bojom. Za analizu apoptoze i autofagije stanice su tretirane derivatima u koncentraciji od  $5 \times 10^{-6}$  M.

**Rezultati:** Testirani kinolinski derivati pokazuju citotoksično djelovanje na tumorske stanice, uz poželjno pošteđeno djelovanje na normalnu staničnu liniju. Određivanjem udjela stanica u apoptozi protočnim citometrom utvrđeno je kako je na staničnim linijama K-562 te MDA-MB-231 statistički značajno ( $P < 0,05$ ) proapoptotičko djelovanje pokazao derivat MB-173. Analizom djelovanja na autofagiju uočeno je da je derivat MB-173 statistički značajno ( $P < 0,05$ ) utjecao na autofagiju MDA-MB-231 stanične linije.

**Zaključak:** Ispitivani derivati pokazuju pošteđeno djelovanje na normalnu staničnu liniju, a inhibiraju rast tumorskih stanica, pri čemu stanične linije HuT 78 i K-562 pokazuju veću osjetljivost prema kinolinskim derivatima od MDA-MB-231 stanica. Od ispitivanih derivata MB-173 je značajno inducirao apoptozu u K-562 staničnoj liniji te apoptozu i autofagiju u MDA-MB-231 staničnoj liniji. Daljnje istraživanje testiranih kinolinskih derivata potrebno je za bolje razumijevanje njihovog protutumorskog mehanizma djelovanja.

Ključne riječi: apoptoza; autofagija; kinolini; protočna citometrija

## 8. SUMMARY

### **Proapoptotic potential of newly synthesized 7-chloro-4-aminoquinoline derivatives on tumor cells in vitro**

**Objectives:** The aim of this study was to test the effect of newly synthesized 7-chloro-4-aminoquinoline derivatives on tumor cell growth and to determine the mechanisms by which treated cells die by investigating apoptosis and autophagy activity with flow cytometry.

**Study Design:** The study was designed as a trial (experimental).

**Materials and Methods:** The effect of 7-chloro-4-aminoquinoline derivatives was tested on tumor cells (MDA-MB-231, K-562, HuT 78) and on a normal cell line (MDCK 1). The inhibitory effect of quinoline derivatives on tumor cell growth was determined by the MTT assay. The proapoptotic potential of quinolines on tumor cells was determined by flow cytometry with prior staining of the cells with Annexin V FITC and propidium iodide, while their effect on autophagy was determined by flow cytometry on Acridine Orange-stained cells. For apoptosis and autophagy analysis, cells were treated with derivatives at a concentration of  $5 \times 10^{-6}$  M.

**Results:** The tested quinoline derivatives showed cytotoxic effects on tumor cells, with a desirable relenting effect on normal cell line. By determining the proportion of cells in apoptosis by a flow cytometer, it was determined that the derivative MB-173 showed statistically significant ( $P < 0,05$ ) proapoptotic effect on K-562 and MDA-MB-231 cell lines. The analysis of the effect of derivatives on autophagy revealed that the MB-173 derivative had a statistically significant ( $P < 0,05$ ) effect on the autophagy of the MDA-MB-231 cell line.

**Conclusion:** The tested derivatives showed a diminished effect on the normal cell line while inhibiting tumor cell growth, with HuT 78 and K-562 cell lines showing greater sensitivity to quinoline derivatives than MDA-MB-231 cells. Of the derivatives tested, MB-173 significantly induced apoptosis in the K-562 cell line and induced both apoptosis and autophagy in the MBA-MB-231 cell line. For better understanding of the antitumor mechanism of action of the tested quinoline derivatives, further research is needed.

Key words: apoptosis; autophagy;flow cytometry; quinolines

## 9. LITERATURA

1. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26(4) :239–57.
2. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang F-T, Zhou T-T, Liu B, i sur. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*. 2012; 45(6): 487–98.
3. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, i sur. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018; 25(3): 486–541.
4. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res*. 2019; 29(5): 347–64.
5. Sun Y, Peng Z-L. Programmed cell death and cancer. *Postgrad Med J*. 2009; 85(1001): 134–40.
6. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol*. 2011; 3(4): 279–96.
7. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5(4): a008656–a008656.
8. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D’Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*. 2016; 8(4): 603–19.
9. Movassagh M, Foo RS-Y. Simplified apoptotic cascades. *Heart Fail Rev*. 2008; 13(2): 111–9.
10. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019; 20(3): 175–93.
11. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4): 495–516.
12. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. *Asian Pac J Cancer P*. 2015; 16(6): 2129–44.
13. Vermes I, Haanen C. Apoptosis and Programmed Cell Death in Health and Disease. U: *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier; 1994. str. 177–246. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242308603364>
14. Fulda S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Semin Cancer Biol*. 2015; 31: 84–8.
15. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and Molecular

- Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Res Int.* 2014; 2014:1–23.
16. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell.* 2004; 6(4): 463–77.
  17. Manic G, Obrist F, Kroemer G, Vitale I, Galluzzi L. Chloroquine and hydroxychloroquine for cancer therapy. *Mol Cell Oncol.* 2014 ;1(1): e29911.
  18. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* 2014; 24(1): 9–23.
  19. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2016. NobelPrize.org. Dostupno na adresi: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2016/press-release/>. Datum pristupa: 25.06.2019.
  20. Eskelinen E-L, Saftig P. Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1793(4): 664–73
  21. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010; 221(1): 3–12.
  22. Okamoto K. Organellophagy: Eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *J Cell Biol.* 2014; 205(4), 435–445
  23. Anding AL, Baehrecke EH. Autophagy in Cell Life and Cell Death. *Curr Top Dev Biol.* 2015; 114:67–91.
  24. Yonekawa T, Thorburn A. Autophagy and cell death. *Essays Biochem.* 2013; 55: 105–17.
  25. Wu WKK, Coffelt SB, Cho CH, Wang XJ, Lee CW, Chan FKL, i sur. The autophagic paradox in cancer therapy. *Oncogene.* 2012; 31(8): 939–53.
  26. Fitzwalter BE, Thorburn A. Recent insights into cell death and autophagy. *FEBS J.* 2015; 282(22): 4279–88.
  27. Shen H-M, Codogno P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy.* 2011; 7(5): 457–65.
  28. Tsukada M, Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters.* 1993; 333(1–2), 169–174.
  29. Li B-X, Li C-Y, Peng R-Q, Wu X-J, Wang H-Y, Wan D-S, i sur. The expression of beclin 1 is associated with favorable prognosis in stage IIIB colon cancers. *Autophagy.* 2009; 5(3): 303–6.
  30. Jiang Z-F, Shao L-J, Wang W-M, Y X-B ,Liu R-Y. Decreased expression of Beclin-1 and LC3 in human lung cancer. *Mol Biol Rep.*2012; 39: 259-67.
  - 31.Liu H, He Z, von Rütte T, Yousefi S, Hunger RE, Simon H. Down-Regulation of Autophagy-Related Protein 5 (ATG5) Contributes to the Pathogenesis of Early-Stage Cutaneous Melanoma.*Sci Transl Med.* 2013; 5(202): 202ra123–202ra123.



32. Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ, Codogno P. Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death Differ.* 2009; 16(1): 12–20.
33. Diaz-Troya S, Perez-Perez ME, Florencio FJ, Crespo JL. The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy.* 2008; 4: 851–865.
34. Chen N, Karantza-Wadsworth V. Role and regulation of autophagy in cancer. *BBA-Mol Cell Res.* 2009; 1793(9): 1516–23.
35. Wilson EN, Bristol ML, Di X, Maltese WA, Koterba K, Beckman MJ, i sur. A Switch Between Cytoprotective and Cytotoxic Autophagy in the Radiosensitization of Breast Tumor Cells by Chloroquine and Vitamin D. *HORM CANC.* 2011; 2(5): 272–85.
36. Kuo H-H, Kakadiya R, Wu Y-C, Su T-L, Lee T-C, Lin Y-W, i sur. Derivatives of 6-cinnamamido-quinoline-4-carboxamide impair lysosome function and induce apoptosis. *Oncotarget.* 2016; 7(25).
37. Fimia GM, Piacentini M. Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67(10): 1581–8.
38. Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(2): 81–94.
39. Fitzwalter BE, Thorburn A. Recent insights into cell death and autophagy. *FEBS J.* 2015; 282(22): 4279–88.
40. Zhu Y, Zhao L, Liu L, Gao P, Tian W, Wang X, i sur. Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. *Protein Cell.* 2010; 1:468–477.
41. Jain MV, Paczulla AM, Klonisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K, i sur. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med.* 2013; 17(1): 12–29.
42. Navneetha O, Deepthi K, Rao AM, Jyostna TS. A review on chemotherapeutic activities of quinoline. *IJPCBS.* 2017; 7(4): 364-372.
43. Kumar S, Bawa S, Gupta H. Biological Activities of Quinoline Derivatives. *MRMC.* 2009; 9(14): 1648–54.
44. Njaria PM, Okombo J, Njuguna NM, Chibale K. Chloroquine-containing compounds: a patent review (2010 – 2014). *Expert Opin Ther Pat.* 2015; 25(9): 1003–24.
45. Jain S, Chandra V, Kumar Jain P, Pathak K, Pathak D, Vaidya A. Comprehensive review on current developments of quinoline-based anticancer agents. *Arab J Chem.* 2016. Dostupno na:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535216301897>.
46. Khan MTH. Quinoline Analogs as Antiangiogenic Agents and Telomerase Inhibitors. U: Khan MTH, urednik. *Bioactive Heterocycles V.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007; str. 213–29.
47. Afzal O, Kumar S, Haider MR, Ali MR, Kumar R, Jaggi M, i sur. A review on anticancer

- potential of bioactive heterocycle quinoline. *Eur J Med Chem.* 2015; 97: 871–910.
48. J. Sharma. Use of quinoline derivatives in cancer. *IJPRBS.* 2015; 4: 130-148.
49. Lam K-H, Lee KK-H, Kok SH-L, Wong RS-M, Lau F-Y, Cheng GY-M, i sur. Antiangiogenic activity of 2-formyl-8-hydroxy-quinolinium chloride. *Biomed Pharmacother.* 2016; 80: 145–50.
50. Iqbal J, Ejaz SA, Khan I, Ausekle E, Miliutina M, Langer P. Exploration of quinolone and quinoline derivatives as potential anticancer agents. *DARU J Pharm Sci.* 2019;
51. Afzal O, Kumar S, Haider MR, Ali MR, Kumar R, Jaggi M, i sur. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. *Eur J Med Chem.* 2015; 97: 871–910.
52. Cheng K-C, Hung C-T, Chen K-J, Wu W-C, Suen J-L, Chang C-H, i sur. Quinoline-Based Compound BPIQ Exerts Anti-Proliferative Effects on Human Retinoblastoma Cells via Modulating Intracellular Reactive Oxygen Species. *Arch Immunol Ther Exp.* 2016; 64(2): 139–47.
53. Krstulović L, Stolić I, Jukić M, Opačak-Bernardi T, Starčević K, Bajić M, i sur. New quinoline-arylamidine hybrids: Synthesis, DNA/RNA binding and antitumor activity. *Eur J Med Chem.* 2017; 137: 196–210.
54. PubChem. Dostupno na adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Datum pristupa: 15.07.2019.
55. Jia B, Xue Y, Yan X, Li J, Wu Y, Guo R, i ostali. Autophagy inhibitor chloroquine induces apoptosis of cholangiocarcinoma cells via endoplasmic reticulum stress. *Oncol Lett.* 2018.
56. Zheng Y, Zhao Y-L, Deng X, Yang S, Mao Y, Li Z, i ostali. Chloroquine Inhibits Colon Cancer Cell Growth *In Vitro* and Tumor Growth *In Vivo* via Induction of Apoptosis. *CANCER INVEST.* siječanj 2009.;27(3):286–92.
57. Fan C, Wang W, Zhao B, Zhang S, Miao J. Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells. *Bioorg Med Chem.* 2006.;14(9):3218–22
58. Mohamed MM. Anti-malarial chloroquine stimulate p53-apoptotic pathway in rat hepatocytes. *J Egypt Soc Parasitol.* travanj 2005.;35(1):19–32.
59. Potvin F, Petitclerc E, Marceau F, Poubelle PE. Mechanisms of action of antimalarials in inflammation: induction of apoptosis in human endothelial cells. *J Immunol.* 1997;158(4):1872–9.
60. Ding Y, Nguyen TA. PQ1, a quinoline derivative, induces apoptosis in T47D breast cancer cells through activation of caspase-8 and caspase-9. *Apoptosis.* 2013;18(9):1071–82.
61. Kim EL, Wustenberg R, Rubsam A, Schmitz-Salue C, Warnecke G, Bucker E-M, i sur. Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro-Oncology* 2010.;12(4):389–400.
62. Su T, Zhu J, Sun R, Zhang H, Huang Q, Zhang X, i sur. Design, synthesis and biological evaluation of new quinoline derivatives as potential antitumor agents. *Eur J Med Chem.*

2019; 178: 154–67.

63. Kemnitzer W, Kuemmerle J, Jiang S, Zhang H-Z, Sirisoma N, Kasibhatla S, i sur. Discovery of 1-benzoyl-3-cyanopyrrolo[1,2-a]quinolines as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay. Part 1: Structure–activity relationships of the 1- and 3-positions. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008; 18(23): 6259–64.
64. Chiu C-C, Chou H-L, Chen B-H, Chang K-F, Tseng C-H, Fong Y, i sur. BPIQ, a novel synthetic quinoline derivative, inhibits growth and induces mitochondrial apoptosis of lung cancer cells in vitro and in zebrafish xenograft model. *BMC Cancer*. 2015; 15(1): 962.
65. Liu C-Y, Wu P-T, Wang J-P, Fan P-W, Hsieh C-H, Su C-L, i ostali. An indolylquinoline derivative promotes apoptosis in human lung cancer cells by impairing mitochondrial functions. *Apoptosis*. 2015; 20(11): 1471–82.
66. Begnini KR, Duarte WR, da Silva LP, Buss JH, Goldani BS, Fronza M, i ostali. Apoptosis induction by 7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides in triple negative breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2017; 91: 510–6.
67. Manic G, Obrist F, Kroemer G, Vitale I, Galluzzi L. Chloroquine and hydroxychloroquine for cancer therapy. *Mol Cell Oncol*. 2014; 1(1): e29911.
68. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema K-J, i sur. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*. 2018; 14(8): 1435–55.
69. Ganguli A, Choudhury D, Datta S, Bhattacharya S, Chakrabarti G. Inhibition of autophagy by chloroquine potentiates synergistically anti-cancer property of artemisinin by promoting ROS dependent apoptosis. *Biochimie*. 2014; 07:338–49.
70. Golden EB, Cho H-Y, Hofman FM, Louie SG, Schönthal AH, Chen TC. Quinoline-based antimalarial drugs: a novel class of autophagy inhibitors. *FOC*. 2015; 38(3): E12.
71. Bosc D, Vezenkov L, Bortnik S, An J, Xu J, Choutka C, i sur. A new quinoline-based chemical probe inhibits the autophagy-related cysteine protease ATG4B. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 11653.
72. Sukhai MA, Prabha S, Hurren R, Rutledge AC, Lee AY, Sriskanthadevan S, i sur. Lysosomal disruption preferentially targets acute myeloid leukemia cells and progenitors. *J Clin Invest*. 2013; 123(1): 315–28.
73. Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Isaka Y. Chloroquine in Cancer Therapy: A Double-Edged Sword of Autophagy. *Cancer Res*. 2013; 73(1): 3–7.
74. Marušić M. Uvod u znanstveni rad u medicini. 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2008
75. Nepali K, Sharma S, Sharma M, Bedi PMS, Dhar KL. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. *Eur J Med Chem*. 2014; 77: 422–87.
76. Fortin S, Bérubé G. Advances in the development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin Drug Dis*. 2013; 8(8): 1029–47.

77. Keri RS, Hiremathad A, Budagumpi S, Nagaraja BM. Comprehensive Review in Current Developments of Benzimidazole-Based Medicinal Chemistry. *Chem Biol Drug Des.* 2015; 86(1):19-65.
78. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, i sur. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016; 12(1): 1–222

## 10. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci:

- Ime i prezime: Maja Jirouš
- Datum i mjesto rođenja: 8. rujna 1995., Virovitica
- e-mail: majajirous@gmail.com

### Obrazovanje:

- 2010.-2014. Gimnazija Petra Preradovića u Virovitici, smjer prirodoslovno-matematička gimnazija
- 2014.-2017. Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku
- 2017.-2019. Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

### Nagrade:

- Rektorova nagrada za akademsku godinu 2017./2018. za izniman uspjeh na studiju

### Članstva:

- 2014.-2019. Aktivno članstvo u Hrvatskoj udruzi studenata medicinsko laboratorijske dijagnostike – CMLDSA

### Aktivno sudjelovanje na kongresima:

- 4. Kongres Strukovnog razreda za medicinsko-laboratorijsku djelatnost Hrvatske komore zdravstvenih radnika (2018.)
- OSCON Osijek Student Congress - International translational medicine congress of students and young physicians (2019.)
- Simpozij „Prvih 10 godina HDIR-a“ (2019.)
- ISABS Conference on Forensic, Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine (2019.)