

Određivanje citotoksičnosti i protuupalne učinkovitosti liganda na bazi kinolina i kumarina i njihovih renijevih (I) karbonilnih kompleksa in vitro

Pavković, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:152:260329>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



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

Lucija Pavković

ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOSTI I
PROTUUPALNE UČINKOVITOSTI
LIGANADA NA BAZI KINOLINA I
KUMARINA I NJIHOVIH RENIJEVIH (I)
KARBONILNIH KOMPLEKSA *IN VITRO*

Diplomski rad

Osijek, 2024.

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

Lucija Pavković

ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOSTI I
PROTUUPALNE UČINKOVITOSTI
LIGANADA NA BAZI KINOLINA I
KUMARINA I NJIHOVIH RENIJEVIH (I)
KARBONILNIH KOMPLEKSA *IN VITRO*

Diplomski rad

Osijek, 2024.

Rad je izrađen na Medicinskom fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku u Laboratoriju za kulturu stanica i tkiva pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu.

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

Rad ima: 36 listova, 1 tablicu i 12 slika

Za početak, veliko hvala mentorici, prof. dr. sc Ljubici Glavaš-Obrovac, na nesebičnom prenošenju znanja tijekom cijelog trajanja studija te pomoći, vodstvu i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Također, hvala laborantici Ivani Jelavić, mag.med.lab.diag., za pomoć u eksperimentalnom dijelu ovog rada i prenošenje praktičnog znanja.

I za kraj, najveće hvala mojoj obitelji, dečku i svima koji su mi pružali neprestanu podršku i motivaciju za završetak ovog studija.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Tumorske bolesti	1
1.1.1. Razvoj tumora	1
1.1.2. Protutumorski lijekovi	2
1.2. Heterociklički spojevi	3
1.2.1. Kinolinski derivati	3
1.2.2. Kumarin i njegovi derivati	5
1.3. Organometalni spojevi	6
2. HIPOTEZA	8
3. CILJ	9
4. MATERIJAL I METODE	10
4.1. Materijali	10
4.1.1. Ispitivani spojevi	10
4.1.2. Stanične linije	10
4.1.3. Kemikalije	10
4.2. Metode	11
4.2.1. Uzgoj i održavanje kulture stanica <i>in vitro</i>	11
4.2.2. Određivanje broja živih stanice u kulturi	12
4.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT – testom.....	12
4.2.4. Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta ABTS metodom	14
4.2.5. Određivanje NO Griessovim testom	15
4.2.6. Određivanje lipidne peroksidacije TBARS testom	15
4.2.7. Statistička obrada rezultata.....	16
5. REZULTATI	17
5.1. Određivanje citotoksičnog učinka na tumorske stanice (Caco-2, Hela, THP-1, Hut-78, CCRF-CEM) i ne tumorsku staničnu liniju MRC-5	17
5.1.1. Citotoksični učinak na humanu staničnu liniju adenokarcinoma debelog crijeva – Caco-2 stanice	17
5.1.2. Citotoksični učinak na humanu staničnu liniju adenokarcinoma vrata maternice – HeLa stanice	18
5.1.3. Citotoksični učinak na humanu staničnu liniju akutne monocitne leukemije – THP stanice	18
5.1.4. Citotoksični učinak na humanu staničnu liniju limfoma T-satnica – HuT-78 stanice	19
5.1.5. Citotoksični učinak na humanu staničnu liniju akutne limfoblastične leukemije - CCRF-CEM stanice.....	20
5.1.6. Citotoksični učinak na humanu staničnu liniju fetalnih plućnih fibroblasta – MRC-5	21
5.1.7. Citotoksični učinak na staničnu liniju mišjih makrofaga – RAW 264.7	22
5.2. Određivanje antioksidativnog kapaciteta ispitivanih spojeva ABTS metodom	23

5.3. Učinak ispitivanih spojeva na stvaranje malondialdehida u LPS-om stimulranim RAW 264.7 stanicama <i>in vitro</i>	24
5.4. Određivanje NO Griessovim testom	24
6. RASPRAVA	26
7. ZAKLJUČAK	28
8. SAŽETAK	29
9. SUMMARY	30
10. LITERATURA	32
11. ŽIVOTOPIS	36

POPIS KRATICA

Ab - apsorbancija

ABTS – 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

DMEM – Dulbeccov minimalni esencijalni medij (engl. – *Dulbecco's Minimal Essential Medium*)

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

ELISA – imunoenzimski test (engl. - *The enzyme-linked immunosorbent assay*)

ER- estrogenski receptor

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

HCL – klorovodična kiselina

iNOS – inducibilna sintaza dušikova oksida (engl. – *inducible nitric oxide synthase*)

LPS – lipopolisaharid

MDA – malondialdehid

MTT – 3-(4, {{12 }}dimetil tiazol-2)-2, 5-difenil tetrazolij bromidna sol

NaNO₂ – natrijev nitrit

NO– dušikov oksid (engl. – *nitric oxide*)

OD – optička gustoća (engl. – *optical density*)

Re – renij

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

SAR - odnos strukture i aktivnosti

SDS – natrijev dodecil sulfat

SRA-HX-1 - benzotiazol

SRA-HX-2 - tetrazol

SRA-HX-3 – 1,2,4, triazol

TBA – 2-tiobarbiturna kiselina

TBARS – engl. – *Thiobarbituric acid reactive substances*

TCA – trikloroctena kiselina

TRPV1 - Član 1 podporodice V prolaznog receptijskog potencijala kationskog kanala

WHO –Svjetska zdravstvena organizacija (engl. – *World Health Organisation*)

1. UVOD

1. UVOD

1.1. Tumorske bolesti

Tumorske bolesti su jedna od vodećih bolesti suvremenog društva i javljaju se u svim dobnim skupinama. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. World Health Organisation - WHO), tumorska oboljenja predstavljaju jedan od glavnih uzroka smrti. Procjenjuje se da je 2022. bilo 20 milijuna novih slučajeva raka i 9,7 milijuna smrtnih slučajeva. Procijenjeni broj ljudi koji su preživjeli unutar 5 godina nakon dijagnoze raka bio je 53,5 milijuna. Oko 1 od 5 ljudi tijekom života oboli od raka, otprilike 1 od 9 muškaraca i 1 od 12 žena umre od te bolesti (1). Rak pluća, prostate, debelog crijeva, želuca i jetre najčešće su vrste raka kod muškaraca, dok su rak dojke, debelog crijeva, pluća, vrata maternice i štitnjače najčešći kod žena (2).

1.1.1. Razvoj tumora

Razvoj tumorskih stanica uključuje složene procese, često uzrokovane genetičkim oštećenjima. Tumorske stanice karakterizira brz, abnormalan i nekontroliran stanični rast, praćen povećanom sintezom nukleinskih kiselina, proteina te ubrzanim staničnim metabolizmom. Razvoj tumorskih stanica (tumorigeneza) događa se u najmanje tri koraka: inicijacija, promocija i progresija. Prva dva stadija tumorigeneze podrazumijevaju početak transformacije stanica, a treći stadij određuje transformaciju benignog tumora u njegov maligni oblik.

Stadij inicijacije počinje djelovanjem kancerogena na normalnu stanicu na način da uzrokuje mutaciju na lancu deoksiribonukleinske kiseline (DNK) te stanice, te mijenja njezinu strukturu, ova mutacija ili promjena strukture se može nadalje ili popraviti ili replicirati. Načini popravka stanica uključuju direktni popravak, ekscizijski popravak (izrezivanje baza), popravak izrezivanjem nukleotida, popravak krivo sparene baze te rekombinacijski popravak. Ukoliko je mutacija popravljena, stanica se nastavlja replikaciju bez mutacije, no ako je popravak neuspješan, stanica se replicira s nastalom mutacijom te započinje stadij inicijacije. Kancerogene tvari mogu biti kemijska, biološka ili fizička sredstva, kao što su virusi, okolišni ili genetski faktori te stil života. Nekontrolirani rast stanica uzrokuju dvije glavne promjene koje se javljaju kao posljedica mutacije kao što su aktivacija onkogene poput *Ras* gena i *MYC* gena, te inhibicija tumor supresor gena poput *p53*, *APC*, *BRCA1* i *BRCA2* gena.

Tumorski promotori mijenjaju ekspresiju genetske informacije stanice te inhibiraju programiranu smrt stanice (3). Promotori tumora koji mogu biti specifični za tkivo, uključuju

1. UVOD

kemijske iritanse, mehaničke ozljede, ultraljubičasto zračenje, infekciju/upalu i endogene faktore rasta i citokine (4). Neke od molekula koje posreduju u promociji tumora uključuju protein kinazu C, receptor epidermalnog faktora rasta, inzulinu sličan faktor rasta-1, transformirajući faktor rasta- β , faktor tumorske nekroze- α , nekoliko interleukina i prostaglandine izvedene iz ciklooksigenaze (engl. *Cyclooxygenase* - COX). Signalni putevi koje ovi promotori aktiviraju i njihova regulacija genske ekspresije rezultira poticanjem proliferacije i angiogeneze, okupljanje upalnih stanica, inhibicija apoptoze, smanjeni imunološki nadzor i/ili stvaranje prooksidativnog stanja (4). S obzirom da promotori ne mijenjaju DNK sekvencu, stadij promocije je epigenetski proces. Također, ukoliko u nekom stadiju promocije nestane primjerenog tumorskog promotora, proces promocije je reverzibilan. Stadij progresije uključuje već nastali tumor te moguće metastaziranje primarnih kancerogenih stanica na druge lokacije u tijelu.

Kronična upala ima ključnu ulogu u razvoju i progresiji mnogih kroničnih bolesti uključujući autoimune, metaboličke i tumorske bolesti. Iako sama proliferacija stanica sama po sebi ne uzrokuje rak, kontinuirana proliferacija stanica u okruženju bogatom upalnim stanicama, faktorima rasta, aktiviranom stromom i agentima koji promiču oštećenje DNK svakako potiče neoplastični rizik. Subverzija stanične smrti i/ili programa popravka događa se u kronično upaljenim tkivima, što rezultira replikacijom DNK i proliferacijom stanica koje su izgubile normalnu kontrolu rasta (5). Za razliku od normalnog upalnog procesa gdje proizvodnja protuupalnih citokina prati proupalne citokine, kroničnu upalu zbog stalne prisutnosti inicirajućih faktora ili zbog nedostatnih mehanizama za rješavanja upalnog procesa prati prekomjerna proizvodnja proupalnih citokina koja može dovesti do razine upale koja potencira angiogenezu, pogodujući tako neoplastičnom rastu.

1.1.2. Protutumorski lijekovi

Liječenje tumora je kompleksan proces. Konvencionalne terapije uključuju operaciju, kemoterapiju i zračenje. Razvoj rezistencije na više lijekova i značajne nuspojave glavni su uzročnici smrtnosti povezane s rakom, što uzrokuje hitnu potrebu za novim lijekovima s poboljšanom učinkovitošću protiv raka i smanjenim nuspojavama (6). Zadnjih nekoliko godina napravljeni su veliki pomaci u načinu liječenja tumora. Neki od modernih načina liječenja tumora uključuju terapiju matičnim stanicama, ciljanu terapiju, ablacijsku terapiju, nanočestice, prirodne antioksidanse, radioniku, kemodinamičku terapiju, sonodinamičku terapiju i terapiju

1. UVOD

temeljenu ne ferroptozu (7). Trenutne metode liječenja baziraju se na razvoju sigurnih i učinkovitih nanolijekova za liječenje tumora (7).

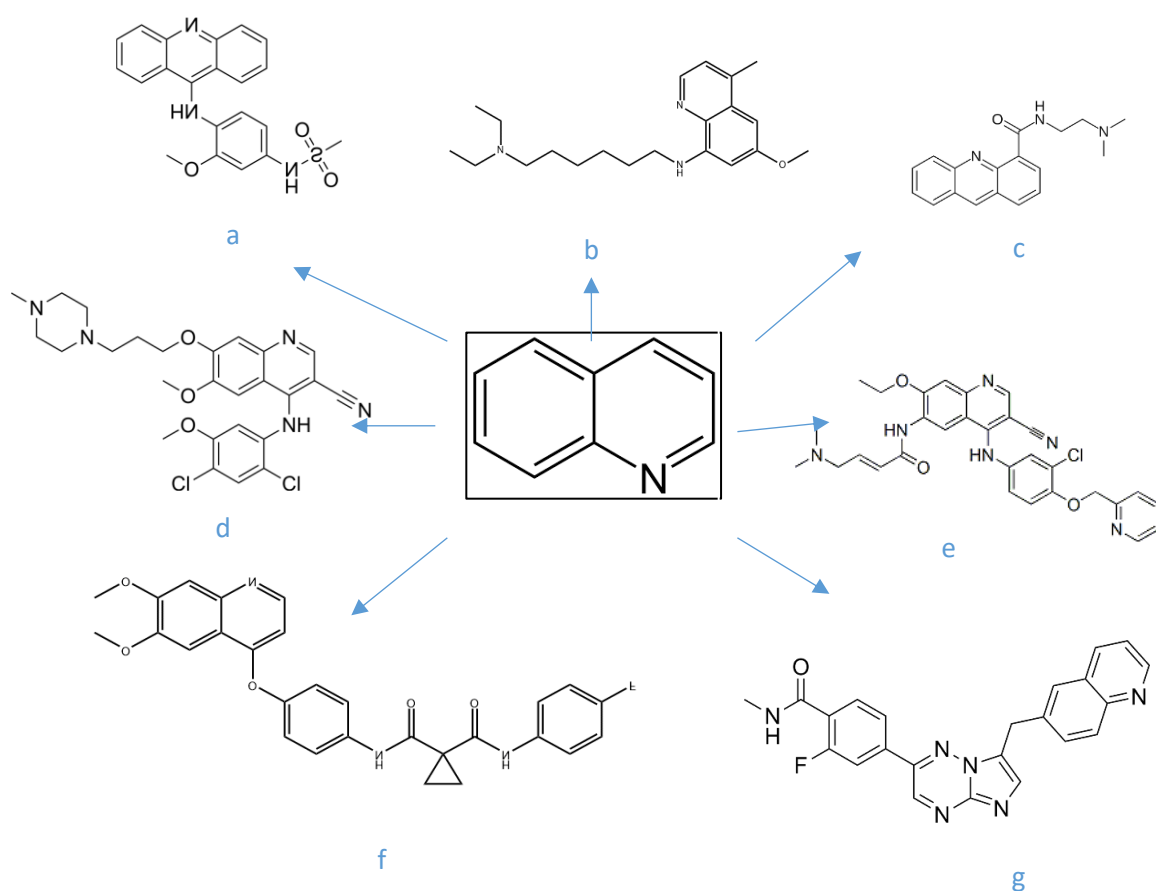
1.2. Heterociklički spojevi

Heterociklički spojevi su ciklički spojevi s pet ili šest prstenova koji sadrže ugljik i druge elemente - heteroatome dušika (N), kisika (O) ili sumpora (S) (8). Među raznim kliničkim primjenama, heterociklički spojevi imaju značajnu ulogu kao antibakterijski, antivirusni, antigljivični, protuupalni i protutumorski lijekovi.

1.2.1. Kinolinski derivati

Kinolinski derivati su heterociklički aromatski spojevi koji u svom prstenu osim ugljika (C) sadržavaju i dušik (N). Kinolin i kinolinski derivati posjeduju različita farmakološka djelovanja, uključujući antimikrobna, antimalarijska, antivirusna, antitumorska i protuupalna (9). Na slici 1 prikazani su neki od protutumorskih lijekova koji kao osnovu imaju kinolin. Amsakrin (a) se koristi kao lijek za liječenje akutne leukemije. Sitamaquine (b) se koristi za liječenje raka dojke, akridin karboksamid (c) je lijek za rak pluća, bosutin (d) koristi se za liječenje kronične mijeloičnu leukemije dok se, neratinib (e) koristi u liječenju raka dojke. Kabozatinib (f) se koristi u liječenju hepatocelularnog karcinoma i raka štitnjače, a kapmatinib (g) za liječenje raka dojke (9).

1. UVOD



Slika 1. Kinolinski derivati kao protutumorski lijekovi. Izradila: autorica rada.

a: amsakrin; b: sitamaquine; c: karboksamid; d: bosutin; e: neratinib; f: kabozatinib; g: kapmatinib

Kinolini djeluju antitumorski kroz razne mehanizme, kao što je zaustavljanje staničnog ciklusa u G2 fazi, inhibicija topoizomeraze i inhibicija tirozin kinaze. Na osnovi objavljenih rezultata studija njihova antitumorska aktivnost temelji se na sposobnosti umetanja između parova baza i interferiranju s normalnom funkcijom enzima topoizomeraze II, koja sudjeluje u lomljenju i otpuštanju lanaca DNK (10). Nedavno su sintetizirani novi spojevi - azolalkilkinolini na bazi kinolina koji nose različite azolne skupine, kao što su benzotiazol (SRA-HX-1), tetrazol (SRA-HX-2) i 1,2,4-triazol (SRA-HX-3) i pokazali su se kao snažni antitumorski agensi u pokusima na stanicama raka dojke *in vitro* (11). Studije o odnosu strukture i aktivnosti (engl. *Structure-activity relationship* - SAR) otkrile su da farmakološke aktivnosti i ciljne specifičnosti ovih derivata kinolina uglavnom ovise o prirodi i položaju supstituenata prisutnih na kinolinskom

1. UVOD

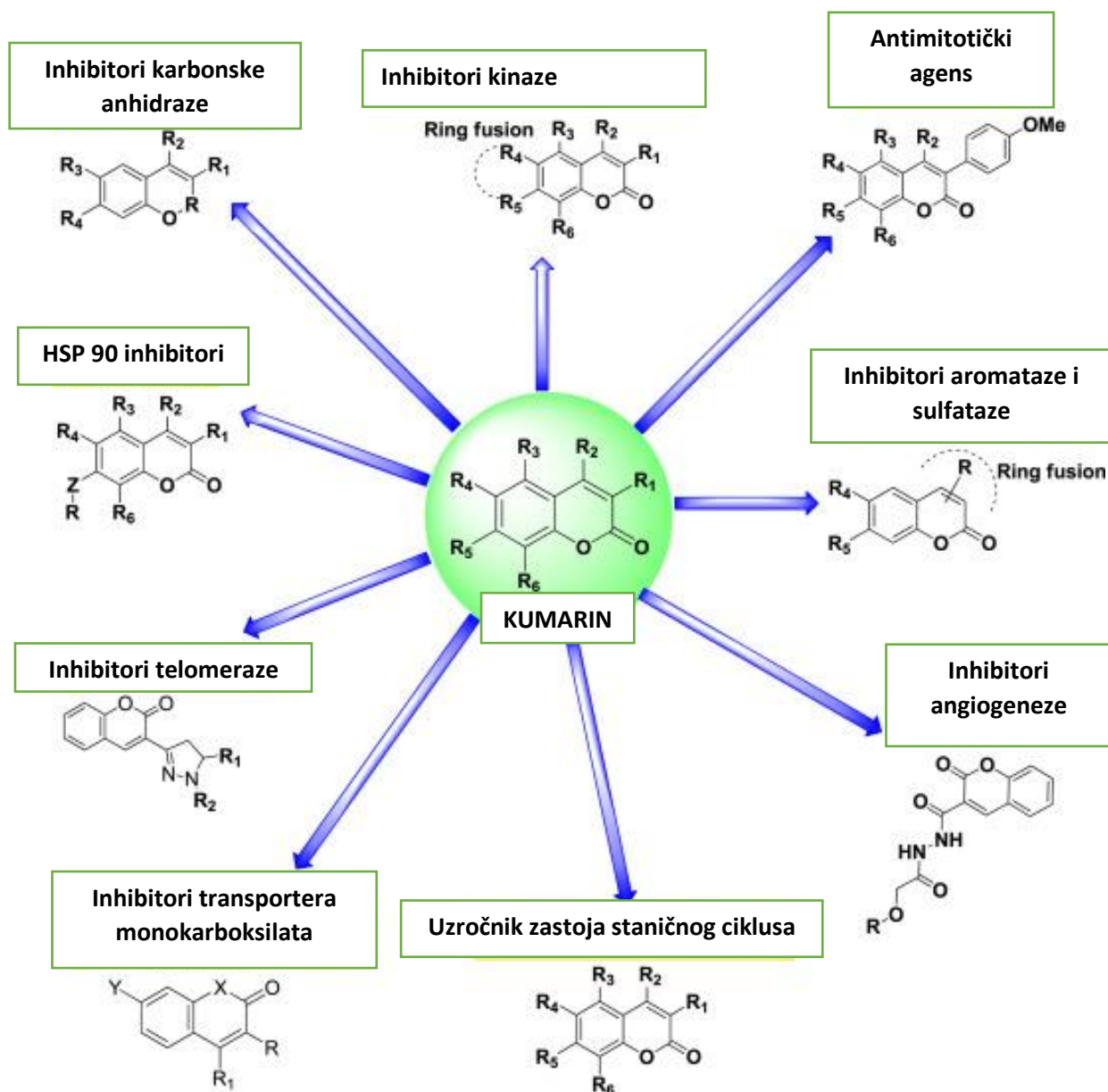
prstenu. Na primjer, kinolini koji imaju karboksamidni dio pokazuju antagonizam TRPV1 (Član 1 podporodice V prolaznog receptijskog potencijala kationskog kanala), dok oni s karboksilnom kiselinom pokazuju COX-inhibiciju. Svi ovi napori rezultirali su otkrićem nekoliko protuupalnih sredstava na bazi kinolina za potencijalno liječenje akutnih kao i kroničnih upalnih bolesti (12). Također, istraživano je i svojstvo interkalativnog vezanja na DNK u raznim spojenim sustavima kinolina. Rezultati tih istraživanja pokazuju da je u ovom slučaju antitumorska aktivnost posljedica interkalacije između parova baza DNK i interferencije s normalnim funkcioniranjem enzima topoisomerase II, koji je uključen u kidanje i otpuštanje DNK lanca (10).

Zbog njihove velike farmakološke aktivnosti provedena su mnoga istraživanja tijekom godina za pripremu kinolina i njegovih derivata, no iako je nekoliko metoda pripreme molekula kinolina i njegovih derivata razvijeno one imaju svoja ograničenja te je potreban daljnji razvoj za neke učinkovitije metode. Također, razvijene su različite molekule koje kao osnovu imaju kinolin, ali one se obično povezuju s rezistencijom na lijekove, citotoksičnošću, zbog čega postoji potreba za razvojem učinkovitijih antivirusnih lijekova .

1.2.2. Kumarin i njegovi derivati

Kumarin je aromatski organski spoj čija se molekula može opisati kao molekula benzena s dva susjedna atoma vodika zamijenjena nezasićenim laktonskim prstenom, tvoreći pri tome drugi šesteročlani heterocikl koji dijeli dva ugljika s benzenskim prstenom (slika 2). Kao što je slučaj s kinolinima, kumarini pokazuju mnoštvo bioloških aktivnosti uključujući antikoagulacijsku, antimikrobno, antiinflamatorno i antitumorsko djelovanje. Kumarini su pokazali antitumorsko djelovanje u različitim fazama nastanka raka putem različitih mehanizama, kao na primjer blokiranjem staničnog ciklusa, indukcijom stanične apoptoze, modulacijom estrogenskog receptora (ER) ili inhibicijom enzima povezanih s DNK, kao što je topoisomeraza (13). Pokazali su se kao inhibitori stanične proliferacije kod stanica želučanog karcinoma, a već je dokazana aktivnost kumarina protiv raka prostate, malignog melanoma i metastatskog renalnog staničnog karcinoma (14).

1. UVOD



Slika 2. Mogući mehanizmi djelovanja derivata kumarina. Preuzeto i djelomično izmjenjeno (15).

1.3. Organometalni spojevi

Kovalentna veza između atoma ugljika (C) i atoma metala čini organometalne spojeve. Posjeduju veliki broj različitih kemijskih i strukturnih formi te imaju aktualnu i potencijalnu praktičnu primjenu u području stvaranja spojeva s antitumorskim i antibiotskim djelovanjem. Među ionima prijelaznih metala koji su istraživani u te svrhe, renij zauzima posebnu ulogu. Njegovi tri- i dikarbonilni kompleksi posebno privlače stalnu pozornost zbog svoje relativno lake pripreme, stabilnosti i jedinstvenih fotofizičkih i luminiscentnih svojstava koja omogućuju njihovu upotrebu u dijagnostičke i terapijske svrhe (16).

1. UVOD

Organometalni spojevi nude nove mogućnosti u dizajnu novih kandidata za lijekove protiv raka zbog svojih sposobnosti interakcije s različitim molekulama u živim stanicama (17). Među različitim kompleksima prijelaznih metala koji se primjenjuju u različite terapijske svrhe kompleksi s platinom, rutenijem, baksom, cinkom, niklom, renijem i kobaltom pokazuju obećavajuće antiproliferativne učinkovitosti (18).

Renij je metal iz grupe prijelaznih metala koji se često koristi u kemiji, posebno u sintezi organometalnih spojeva. Takvi novosintetizirani spojevi uključuju različite tipove kompleksa u kojima renij sudjeluje u kemijskim reakcijama s organskim ligandima. Ligandi na bazi kinolina i kumarina i njihovi renijevi (I) karbonilni kompleksi mogu imati različite biološke aktivnosti kao što su antimikrobna, antitumorska ili protuupalna. Također, mogu utjecati na interakciju liganda u kompleksu s biološkim sustavima doprinoseći pri tome njihovim terapijskim ili dijagnostičkim svojstvima. Konkretno, kompleksi na bazi renija nedavno su privukli interes, uglavnom zbog svoje sposobnosti da moduliraju redoks status tumorskih stanica (16), nudeći tako različite mehanizme djelovanja kao što su fotoaktivnost, redoks aktivnost, izmjena liganda i katalitička aktivnost.

2. HIPOTEZA

2. HIPOTEZA

Polazna pretpostavka je da skupina liganada na bazi kinolina i kumarina i njihovih renijevih (I) karbonilnih kompleksa *in vitro* pokazuje antitumorsku aktivnost na panelu tumorskih stanica i protuupalnu aktivnost u induciranim RAW 264.7 mišjim makrofagima.

3. CILJ

3. CILJ

Ciljevi istraživanja su:

1. ispitati antitumorsku aktivnost kinolinskih i kumarinskih liganada i njihovih kompleksa s renijem na panelu tumorskih stanica
2. ispitati protuupalnu aktivnost kinolinskih i kumarinskih liganada i njihovih kompleksa s renijem određivanjem dušikovog oksida i malonilaldehida u liposaharidima induciranim RAW 264.7 stanicama
3. odrediti antioksidativni kapacitet kinolinskih i kumarinskih liganada i njihovih kompleksa s renijem

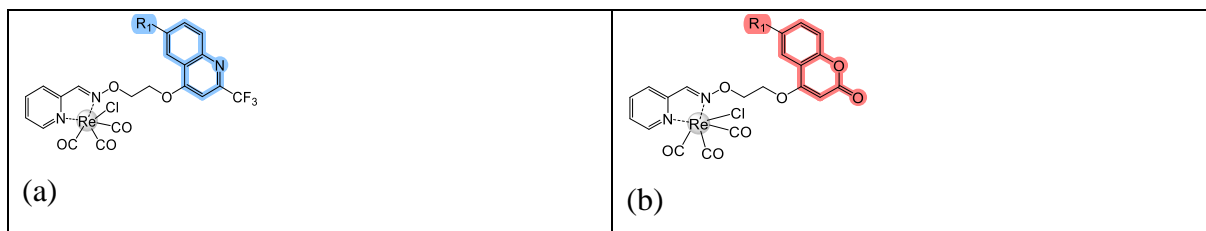
4. MATERIJALI I METODE

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Ispitivani spojevi

Ligandi na bazi kinolina i kumarina i njihovih renijevih (I) karbonilnih kompleksa koji su sintetizirani su na Fakultetu za kemijsko inženjerstvo i tehnologiju Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 3. Renijev (I) karbonilni kompleks na (a) bazi kinolina i (b) na bazi kumarina

4.1.2. Stanične linije

Odabrane, komercijalno dostupne humane normalne i tumorske stanične linije, kao i kultura mišjih makrofaga tretirani su ligandima na bazi kinolina i kumarina i njihovih renijevih (I) karbonilnih kompleksa koji su sintetizirani na Fakultetu za kemijsko inženjerstvo i tehnologiju Sveučilišta u Zagrebu.

Učinci liganada i njihovih kompleksa s renijem ispitani su na kulturi normalnih stanica MRC-5 (ljudskim fibroblastima izoliranim iz pluća fetusa), na tumorskim staničnim kulturama : ljudskim stanicama raka vrata maternice - HeLa, ljudskim stanicama adenokarcinoma debelog crijeva (Caco-2), stanicama akutne monocitne leukemije (THP-1), T-stanicama limfoma Hut-78), stanicama akutne limfoblastične leukemije (CCRF-CEM) i na kulturi stanica mišjih makrofaga (RAW 264.7).

4.1.3. Kemikalije

1. DMEM, s visokim udjelom glukoze (4,5 g/L) i L-glutaminom, Capricorn Scientific GmbH (Slough, Velika Britanija)
2. Roswell Park Memorial Institute medij (RMPI 1640), Lonza (Basel, Switzerland)

4. MATERIJALI I METODE

3. Fetalni goveđi serum (FBS), Na-piruvat i antibiotik-antimikotik (penicilin-streptomycin) 100x, GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija)
4. Amonijev persulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
5. Dimetil sulfoksid (AppliChem, Darmstadt, Njemačka)
6. 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) (Merck, New Jersey, SAD)
7. Tripansko modriilo 0.4% (Sigma-Aldrich, VB)
8. 2,2'-azino-bis(3-ethybenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
9. Lipopolisaharid (LPS iz *Escherichia coli* O111:B4) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
10. Natrijev nitrit (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
11. Griessov reagens (1% sulfanilamid u 5% fosfornoj kiselini, i 0,1% naftiletilediamid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
12. Malondialdehid (MDA) (Acros Organics, Geel, Belgija)
13. Trikloroctena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
14. TBA (2-tiobarbiturna kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
15. 1,1,3,3- Tetraetoksipropan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

4.2. Metode

4.2.1. Uzgoj i održavanje kulture stanica *in vitro*

Uzgajanje stanica odvija se u aseptičnim uvjetima unutar sigurnosnog kabineta.

Stanične linije koje rastu u suspenziji (THP-1, Hut-78 i CCRF-CEM) su nakon odmrzavanja stanice prebačene u RPMI 1640 medij koji je bio obogaćen s 10% fetalnim goveđim serumom (FSB), 2mM glutaminom i 100 U/0,1 mg penicilina/streptomicina, Nakon centrifugiranja pri 1000 rpm uklonjen je medij i stanice su resuspendirane u svježem mediju te premještene u T-bočicu za kultivaciju koja je zatim pohranjena u inkubator s CO₂ (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) na 37°C/5% CO₂ uz visoku vlažnost kako bi im bili osigurani uvjeti što sličniji njihovom fiziološkom okruženju.

Stanice koje rastu u monosloju (HeLa, MRC-5 i Caco-2) kultivirane su u DMEM mediju s dodatkom 10%-tnog FBS-a, 2 mM L-glutamina i 1%-tnog penicilina/streptomicina. Održavanje ovih stanica provedeno je tako da su odvajane od podloge tripsinizacijom, skupljane u epruvete

4. MATERIJALI I METODE

i zatim nasađivane u T-bočice. Adherentne stanice se također uzgajaju u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pri 37°/5% CO₂ uz visoku vlažnost.

RAW 264.7 adherentna stanična linija kultivirana je u RPMI 1640 mediju uz dodatak 10% FBS-a, 2 mM glutamina i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomicina. Konfluentnost stanica provjeravala se svakodnevno pomoću invertnog mikroskopa (Zeiss Axiovert 25, Njemačka). Za odvajanje adherentnih stanica od podloge koristio se 0,25 % tripsin/EDTA. Stanice su se tripsinizirale 6 min u CO₂ inkubatoru nakon čega je tripsin inaktiviran dodatkom medija za uzgoj. Stanice su se inkubirale u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pri 37°C/5% CO₂ uz visoku vlažnost.

4.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi

Stanična suspenzija obojana je triptan plavilom pomoću kojega određujemo broj i vijabilnost stanica. Na 50 µL resuspendirane stanične suspenzije dodana je boja triptan plavilo (100 µL). Stanična suspenzija s bojom nanosi se na Bürker-Türkovu komoricu pomoću koje brojimo žive stanice. Žive stanice ostaju neobojane zbog svoje neoštećene stanične membrane koja aktivno izbacuje boju van, dok mrtve stanice propuštaju boju. Stanice se broje uz pomoć invertnog mikroskopa unutar 4 kvadranta komorice.

Broj živih stanica izračunat je formulom:

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

N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – faktor razrijeđenja

4.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT – testom

Citotoksičnost spojeva ispitivana je MTT testom (test redukcije tetrazolijumom) na kulturi normalnih stanica MRC-5 (ljudskim fibroblastima izoliranim iz pluća fetusa), na tumorskim staničnim kulturama: ljudskim stanicama raka vrata maternice - HeLa, ljudskim stanicama

4. MATERIJALI I METODE

adenokarcinoma debelog crijeva (Caco-2), stanicama akutne monocitne leukemije (THP-1), T-stanicama limfoma Hut-78), stanicama akutne limfoblastične leukemije (CCRF-CEM) i na kulturi stanica mišjih makrofaga (RAW 264.7).

MTT test je kolorimetrijska metoda, koja se bazira na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije topljive žute MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan. Rezultate apsorbancije dobiju se pomoću čitača mikroploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) mjerenjem na 595 nm. Očitana apsorbancija proporcionalna je broju živih stanica u uzorku, pri čemu se preživljenje stanica izražava kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica.

Adherentne stanične linije nasadene su na mikrotitarske ploče sa 96 jažica u koncentraciji 2×10^4 st/mL u ukupnom volumenu od 200 μ L. Nasađuje se 180 μ L smjese stanične suspenzije i medija. Uz stanične linije nasađuju se i kontrole koje se ne tretiraju. Kontrole početnog broja stanica pohranjuju se u dvije epruvete od 1 mL koje se zamrzavaju na -20 °C do kraja testa i služe nam kao optička gustoća (engl. *Optical density* - OD). Stanice se inkubiraju u već spomenutom inkubatoru. Drugi dan tretiramo stanice testnim spojevima (20 μ L) koje smo pripremili serijskim razrjeđenjima te ih vraćamo u inkubator. Nakon 72 sata izbacujemo medij iz jažica okretanjem ploče i dodajemo 40 μ L 1x MTT-a kojega smo dobili iz 10x MTT-a. MTT se razrjeđuje s PBS-om. Ploče vraćamo u inkubator na 4sata nakon čega u svaku jažicu dodajemo 160 μ L DMSO-a. Rezultati se očitavaju na 570 nm valne duljine pomoću čitača mikroploča (iMark microplate reader).

Stanice koje rastu u suspenziji kultivirane su u mikrotitarskim pločama s okruglim dnom, a ukupni volumen u jažicama bio je 100 μ L. Nasađeno je 1×10^5 stanica po mL. Volumen stanica bio je 90 μ L. Isti dan dodano je 10 μ L testnih spojeva. Također, odvojimo 90 μ L stanične suspenzije u dvije epruvete od 1 mL za mjerenje optičke gustoće (OD) i zamrzemo ih. Ploče se inkubiraju 72 sata u inkubatoru. Nakon 72 sata u svaku jažicu se dodaje 10 μ L 10x MTT. Odmrzne se OD i doda u njega 10 μ L 10x MTT, resuspendira i stavi u jažice za OD. U blank jažicu stavljamo 90 μ L RPMI za pokus i 10x MTT. Ploče se inkubiraju 4 sata te se na njih dodaje 10% SDS otopljen u 0,01 M HCL-a. Ploče se vraćaju u inkubator preko noći. Zadnji dan se očitavaju rezultati na čitaču mikroploča.

Stanice RAW264.7 nasadene su u ploče s 96-mikrotitarske ploče u koncentraciji od 2×10^4 stanica/ml i tretirane 10 μ M testnim spojevima tijekom 2 sata i zatim stimulirane s LPS-om (1 μ g/mL) tijekom 24 sata. Nakon inkubacije, medij je uklonjen i 5 mg/mL MTT otopine

4. MATERIJALI I METODE

(Merck, New Jersey, SAD) je dodana u svaku jažicu i inkubirana 4 sata u CO₂ inkubatoru. Zatim je u svaku jažicu dodan DMSO da se otope kristali MTT-formazana netopljivi u vodi. Čitač mikropločica (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, SAD) korišten je za mjerenje apsorbancije pri 595 nm. Svi pokusi izvedeni su najmanje tri puta u triplikatu. Postotak rasta stanica (PG) izračunat je pomoću sljedeće jednadžbe:

$$\text{vijabilnost (\%)} = \frac{A_{\text{tretman}} - A_{\text{background}}}{A_{\text{tretman}} - A_{\text{background}}} \times 100$$

4.2.4. Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta ABTS metodom

Kod određivanja ukupnog antioksidativnog kapaciteta ABTS metodom ABTS 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) kao radikal koristi plavo-zelenu obojeni radikal-kation 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske) kiseline (ABTS radikal) koji se formira oksidacijom otopine ABTS-a. Dodatak antioksidansa izaziva gubitak boje, a ta se promjena detektira spektrofotometrijski pri valnoj duljini 734 nm.

ABTS⁺ radikal se priprema miješanjem 7 mM ABTS otopljenog u vodi sa 2,45 mM amonijevim persulfatom ((NH₄)₂S₂O₈) (1:1). Pripremljena otopina ostavljena je 12-16 sati u mraku na sobnoj temperaturi. Treba se razviti plava boja. Otopina se potom razrijedi miješanjem ABST otopine i MetOH kao bi se dobila apsorbancija 0,700 ± 0,02 na 734nm.

Otpipetira se 50 μM tesiranog spoja i pomiješa sa ABST otopinom u MetOH u istom volumnom omjeru. Standardni spojevi, Eskuletin i Trolox aplicirani su u istoj koncentraciji.

Reakcijska smjesa se inkubirala u mraku kroz 30 i 60 min te je mjerena apsorbancija pri 750 nm na mikročitaču (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA)

Sva mjerenja su izvedena u triplikatu. Postotak inhibicije apsorbance na 750 nm je izračunat preko formule :

ABTS⁺ + učinak uklanjanja radikala

$$(\%) = 100 - ((A_s/A_b) * 100)$$

gdje je, A_b apsorbancija ABTS radikala + metanol; A_s je apsorbancija ABTS radikala + testirani hibrid/standard.

4. MATERIJALI I METODE

4.2.5. Određivanje NO Griessovim testom

Griessov test koristi se za mjerenje koncentracije dušikovog oksida u tekućim otopinama nakon reakcije u nitrit (19). Koncentracija nitrita kao mjera unutarstanične koncentracije NO mjerena je u supernatantu RAW 264.7 stanica.

Stanice u koncentraciji 5×10^5 stanica/ml nasađene su na ploču sa 24 jažice i inkubirane preko noći u CO₂ inkubatoru. Stanice su potom tretirane sa 10 μM testnim hibridima ili Troloxom tijekom 2 sata. Po isteku vremena inkubacije na stanice se dodao lipopolisaharid (LPS) (1 μg/mL) kojim su stanice kontinuirano stimulirane kroz 24 sata. Nakon 24 sata stanični supernatant pomiješao se 1:1 sa Griess-ovim reagensom (1% sulfanilamid u 5% fosfornoj kiselini, i 0.1 % naftiletiledamid) otopljenim u vodi. Mješavina je inkubirana 15 min u mraku prije mjerenja te je apsorbancija očitana na ELISA čitaču mikroploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) na 515 nm. Slijepa proba bila je Griess-ovog reagens i deH₂O u omjeru 1:1. Koncentracija nitrita (μM) izračunata je pomoću NaNO₂ standardne krivulje.

4.2.6. Određivanje lipidne peroksidacije TBARS testom

Metoda se temelji na mjerenju koncentracije reaktivnih spojeva tiobarbiturne kiseline (TBARS), uglavnom MDA.

RAW 264.7 stanice u koncentraciji od 5×10^5 stanica/mL nasađene su na ploču s 24 jažice i inkubirane preko noći u CO₂ inkubatoru. Stanice su tretirane sa 10 μM testnih hibrida ili Troloxom tijekom 2 sata. Po isteku inkubacije na stanice se dodao LPS (1 μg/ml). Stanični supernatant je pokupljen nakon 24 sata stimulacije sa LPS-om te pomiješan u omjeru 1:2 s 30% trikloroocetnom kiselinom (TCA) i centrifugiran na 3500xg 10 min. Nakon centrifugiranja, supernatant je pomiješan sa otopinom tiobarbiturne kiseline (TBA) (1:1). Pomiješane otopine zagrijavane su 30 min na 95°C. Tijekom zagrijavanja kisele reakcijske smjese lipidni peroksidi se raspadaju te nastali MDA reagira s TBA. Kao posljedica te reakcije nastaje crveno obojenje. Nakon inkubacije reakcijska smjesa se hladila 15 min. Apsorbancija kompleksa TBA-MDA određena je spektrofotometrijski na 532 nm UV/VIS spektrofotometrom (Lambda 25 UV/VIS, PerkinElmer, USA). Količina TBARS-a odnosno MDA, izračunala se pomoću jednadžbe pravca standardnog dijagrama pripremljenog s 1,1,3,3- tetrametoksiopropanom kao standardom te su TBARS vrijednosti izražene kao μM malondialdehid (MDA) ekvivalenta.

4. MATERIJALI I METODE

4.2.7. Statistička obrada rezultata

Svi pokusi napravljeni su u triplikatu. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost (\bar{X}) i standardna devijacija ($\pm SD$) za tri neovisna mjerenja. Normalnost raspodjele podataka dobivenih testovima citotoksičnosti određena je Kolmogorov-Smirnovim testom. Primijenjen je neparametrijski test Mann-Whitney uz statističku značajnost $p < 0.05$. Statistička analiza podataka provela se pomoću statističkog programa XLSTAT u sklopu Microsoft Excel-a.

5. REZULTATI

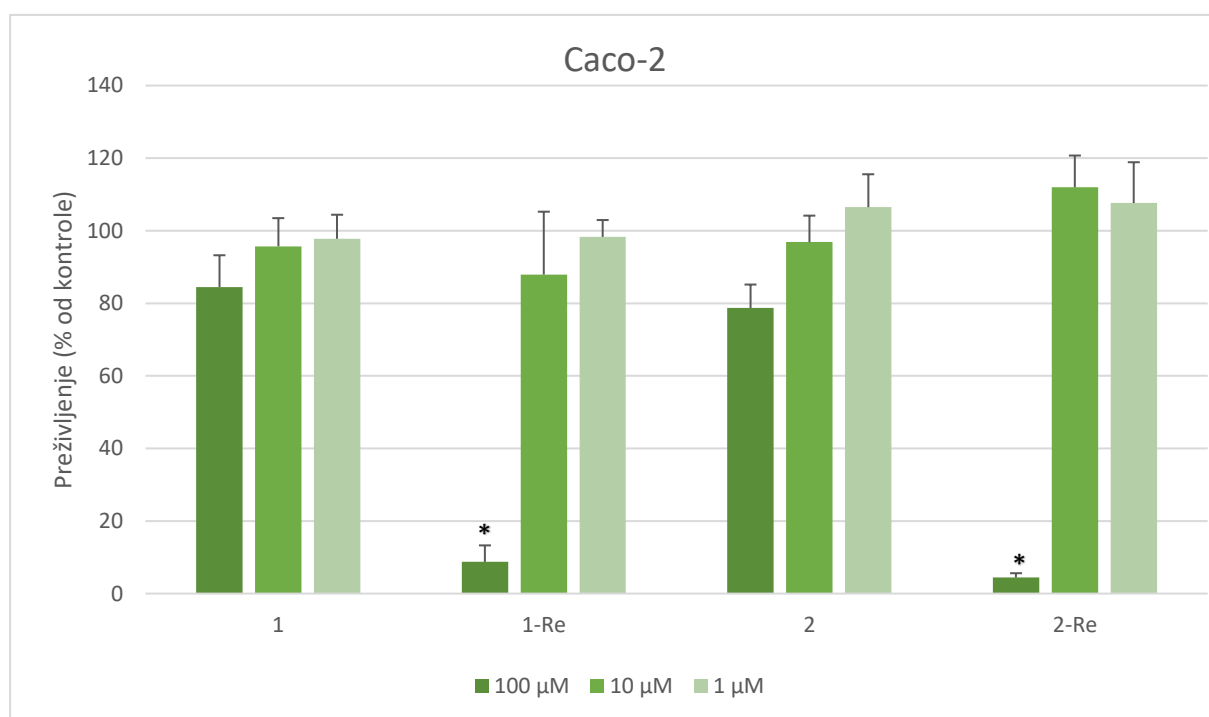
5. REZULTATI

5.1. Određivanje citotoksičnog učinka na tumorske stanice (Caco-2, Hela, THP-1, Hut-78, CCRF-CEM) i ne tumorsku staničnu liniju MRC-5

5.1.1. Citotoksični učinak na humanu staničnu liniju adenokarcinoma debelog crijeva – Caco-2 stanice

Citotoksični učinak ispitivanih spojeva testiran na staničnoj liniju Caco-2 prikazan je kao postotak u odnosu na rast netretiranih (kontrolnih) stanica (Slika 4.) Statistički značajni učinak na rast stanica imali su spojevi s renijem **1-Re** i **2-Re** u odnosu na ligande i kontrolne netretirane stanice pri primijenjenoj koncentraciji pri koncentraciji od 100 μM gdje je rast stanica inhibiran za 90 %.

Spojevi **1** i **2** pokazuju blagu citotoksičnost pri apliciranoj koncentraciji od 100 μM . Svi ispitivani spojevi primijenjeni u koncentracijama od 10 i 1 μM nisu pokazali inhibitorne učinke ili su učinci bili neznatni.

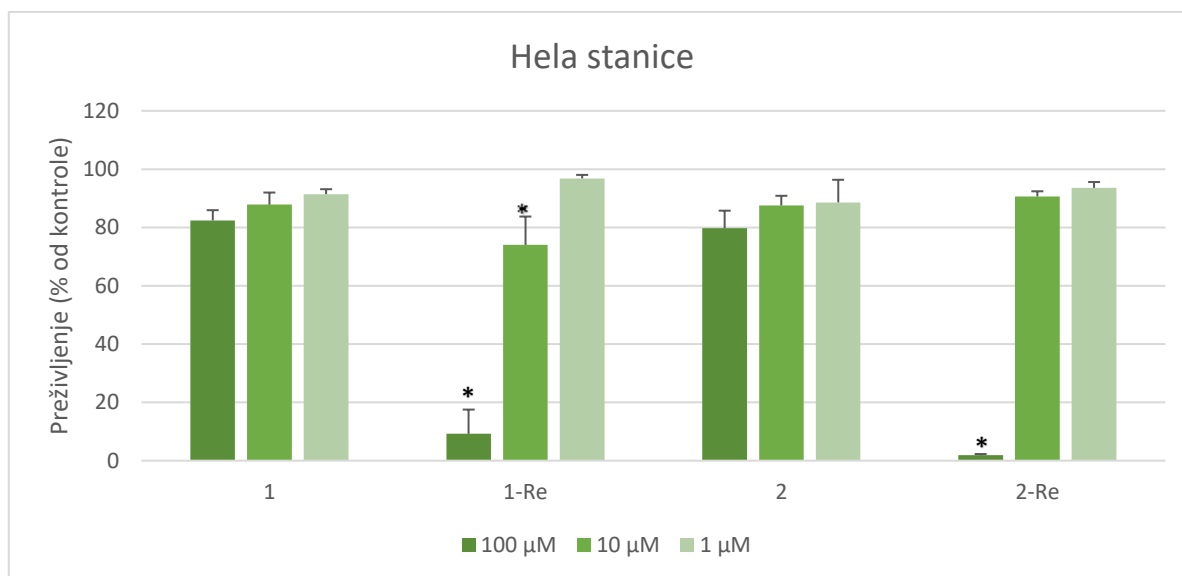


Slika 4. Antiproliferativni učinci spojeva **1**, **2**, **1-Re** i **2-Re** na Caco-2 stanice. Stanice su izložene spojevima u koncentracijama od 1, 10, 100 μM tijekom 72 sata. *Statistički značajna p vrijednost definirana je kao $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne ne tretirane stanice.

5. REZULTATI

5.1.2. Citotoksični učinak na humanu staničnu liniju adenokarcinoma vrata maternice – HeLa stanice

Citotoksični učinak ispitivanih spojeva testiran na HeLa stanicama prikazan je kao postotak u odnosu na rast netretiranih (kontrolnih) stanica (Slika 5.). Slično kao i kod Caco-2 stanica ligandi **1** i **2** imaju slabije antiproliferativne učinke u odnosu na njihove komplekse s renijem (**1-Re** i **2-Re**) koji pri najvećoj testiranoj koncentraciji (100 μ M) inhibiraju rast tretiranih stanica za više od 90 % u odnosu na kontrolne stanice. Najslabije citotoksične učinke imaju ispitivani spojevi pri najnižoj primjenjenoj koncentraciji od 1 μ M.

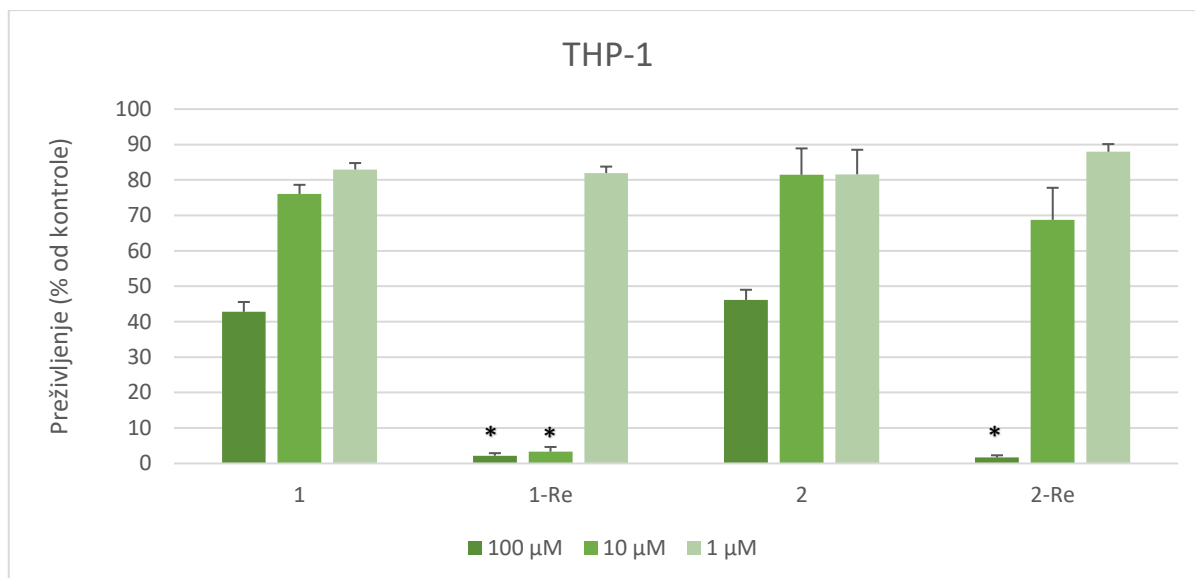


Slika 5. Antiproliferativni učinci spojeva **1**, **2**, **1-Re** i **2-Re** na HeLa stanice. Stanice su bile izložene spojevima u koncentracijama od 1, 10 i 100 μ M tijekom 72 sata. *Statistički značajna p vrijednost definirana je kao $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

5.1.3. Citotoksični učinak na humanu staničnu liniju akutne monocitne leukemije – THP stanice

Citotoksični učinak ispitivanih spojeva testiranih na THP stanicama prikazan je kao postotak preživjelih u odnosu na rast netretiranih (kontrolnih) stanica (Slika 6.) Organometalni spojevi **1-Re** i **2-Re** su u koncentraciji od 100 μ M gotovo u potpunosti inhibirali rast THP stanica. Spoj **2-Re** inhibirao je gotovo u potpunosti rast ovih stanica i u primjenjenoj koncentraciji od 10 μ M. Ligandi **1** i **2** u primjenjenim koncentracijama od 10 μ M podjednako su inhibirali rast stanica za oko 20%, a spoj **2-Re** za 30% u odnosu na rast kontrolnih stanica. U primijenjenoj koncentraciji od 1 μ M spojevi ne pokazuju antiproliferativne učinke na ove stanice.

5. REZULTATI

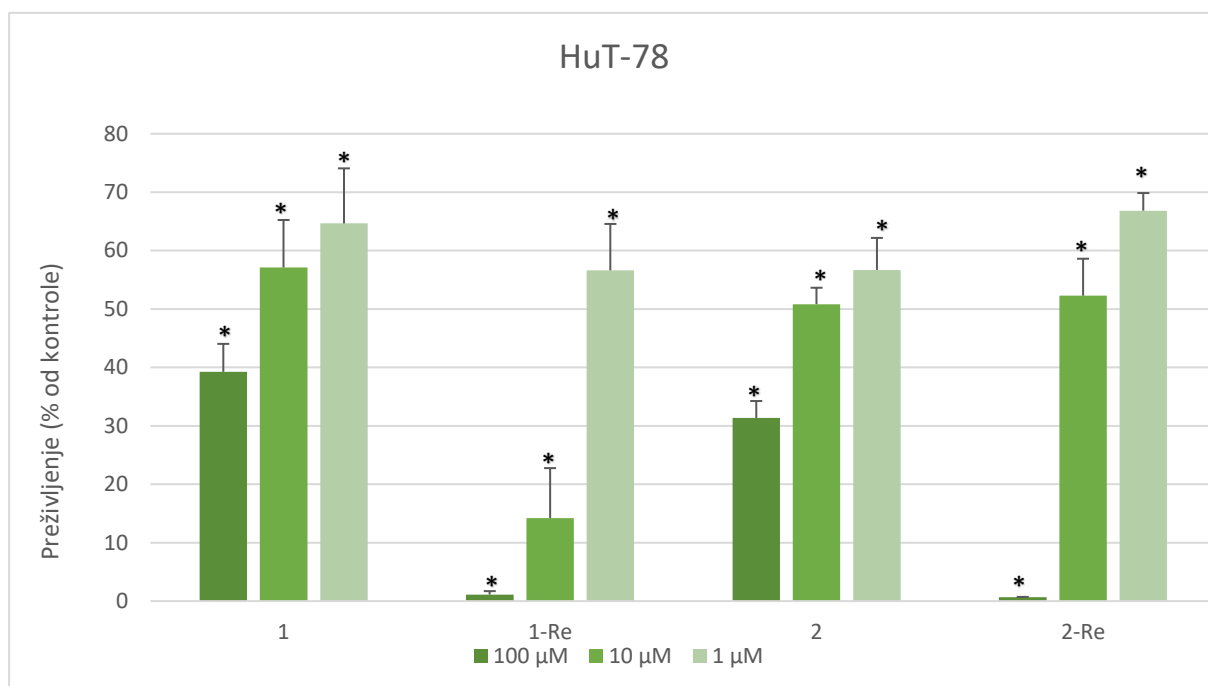


Slika 6. Antiproliferativni učinci spojeva **1**, **2**, **1-Re** i **2-Re** na THP-1 staničnoj liniji. Stanice su bile izložene spojevima u koncentracijama od 1, 10 i 100 μM tijekom 72 sata. *Statistički značajna p vrijednost definirana je kao $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

5.1.4. Citotoksični učinak na humanu staničnu liniju limfoma T-satnica – HuT-78 stanice

Citotoksični učinak ispitivanih spojeva na HuT-78 stanice prikazan je kao postotak u odnosu na rast netretiranih (kontrolnih) stanica (Slika 7.) Najznačajniji inhibicijski učinci uočeni su kod spojeva **1-Re** i **2-Re** pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji od 100 μM gdje je vidljiv u potpunosti inhibiran stanični rast (slika 7.). Ligandi **1** i **2** u istoj koncentraciji izazvali su više od 60 % (Ligand **1**) i 70 % (Ligand **2**) inhibicije rasta stanica. Također, značajno smanjenje rasta (više od 80 %) vidljivo je kod spoja **1-Re** apliciranog u koncentraciji od 10 μM. Ostali spojevi pri koncentraciji od 10 μM inhibirali su rast stanica za oko 50 %. Najmanja primjenjena koncentracija pokazuje inhibiciju rasta za oko 30 do 40 % kod svih spojeva.

5. REZULTATI

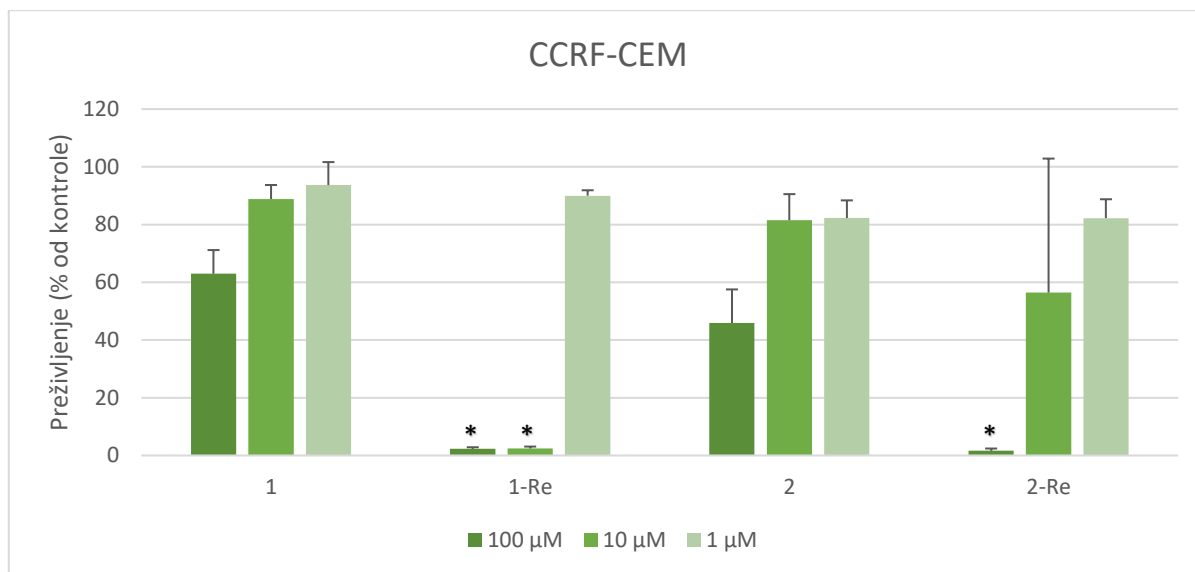


Slika 7. Slika 7. Antiproliferativni učinci spojeva **1**, **2**, **1-Re** i **2-Re** na HuT-78 staničnoj liniji. Stanice su bile izložene spojevima u koncentracijama od 1, 10 i 100 μM tijekom 72 sata. *Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne ne tretirane stanice.

5.1.5. Citotoksični učinak na humanu staničnu liniju akutne limfoblastične leukemije - CCRF-CEM stanice

Citotoksični učinak ispitivanih spojeva testiranih na CCRF-CEM stanicama prikazan je kao postotak u odnosu na rast netretiranih (kontrolnih) stanica. (Slika 8.) Ligandi **1** i **2** statistički značajno usporavaju rast CCRF-CEM stanica za 40% (spoj **1**) i za 45% (spoj **2**) u koncentraciji od 100 μM. Za razliku od njih, njihovi spojevi s renijem (1-Re i 2-Re) su izrazito citotoksični u toj koncentraciji i inhibiraju rast stanica za više od 95%. Nadalje, statistički značajno smanjenje rasta CCRF-CEM stanica uočeno je i kod stanica tretiranih sa spojem **1-Re** (oko 90%) u koncentraciji od 10 μM.

5. REZULTATI

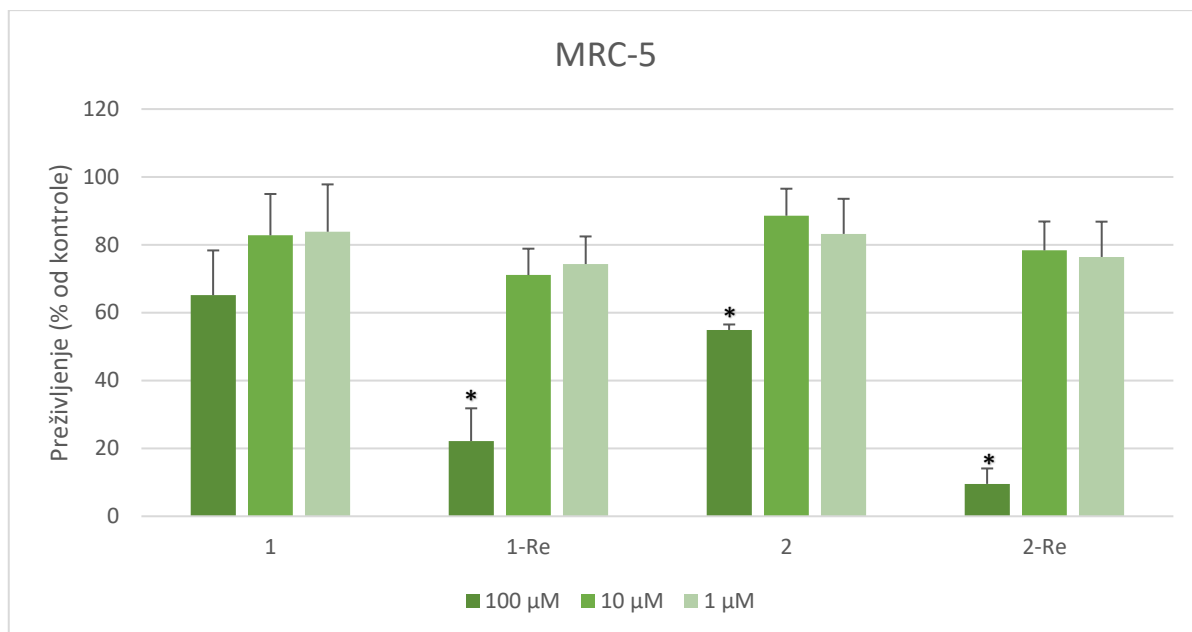


Slika 8. Antiproliferativni učinci spojeva **1**, **2**, **1-Re** i **2-Re** na CCRF-CEM staničnoj liniji. Stanice su bile izložene spojevima u koncentracijama od 1, 10 i 100 µM tijekom 72 sata. *Statistički značajna p vrijednost definirana je kao $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

5.1.6. Citotoksični učinak na humanu staničnu liniju fetalnih plućnih fibroblasta – MRC-5

Citotoksični učinak ispitivanih spojeva testiranih na MRC-5 stanice prikazan je kao postotak u odnosu na rast netretiranih (kontrolnih) stanica (Slika 9.) Najveću inhibiciju rasta ovih stanica pokazali su organometalni spojevi **1-Re** i **2-Re** u primjenjenoj koncentraciji od 100 µM. Kod spoja **1-Re** inhibirano je više od 80 % staničnog rasta, a kod spoja **2-Re** oko 90 %. Spoj **1** je u koncentraciji od 100 µM inhibirao rast oko 35 % stanica, a spoj **2** oko 55 % stanica. U nižim koncentracijama od 10 i 1 µM spojevi su imali slične inhibicijske učinke (15 do 30 %).

5. REZULTATI

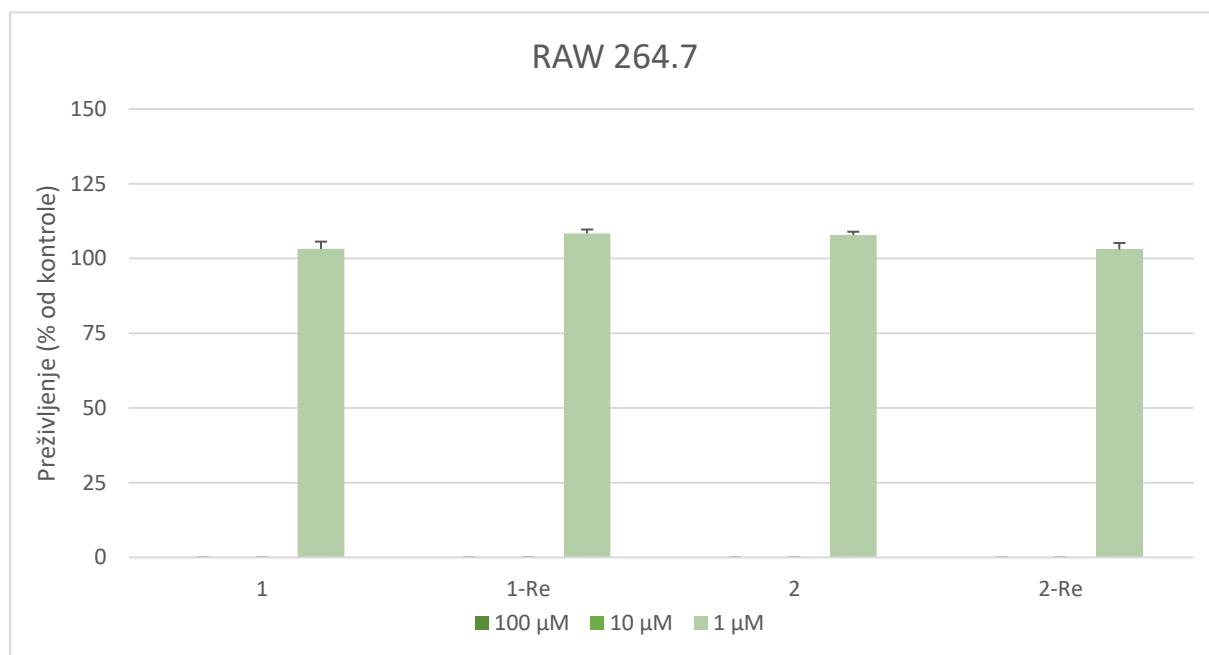


Slika 9. Antiproliferativni učinci spojeva **1**, **2**, **1-Re** i **2-Re** na MRC-5 staničnoj liniji. Stanice su bile izložene spojevima u koncentracijama od 1, 10 i 100 μM tijekom 72 sata. *Statistički značajna p vrijednost definirana je kao $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

5.1.7. Citotoksični učinak na staničnu liniju mišjih makrofaga – RAW 264.7

Citotoksični učinak ispitivanih spojeva testiranih na RAW 264.7 stanicama prikazan je kao postotak u odnosu na rast netretiranih (kontrolnih) stanica (Slika 10.) Stanice su bile tretirane spojevima **1**, **1-Re**, **2**, **2-Re** u koncentraciji od 1 μM kako bi se provjerilo imaju li spojevi citotoksičan učinak u toj koncentraciji na ove stanice. Niti jedan spoj pri koncentraciji od 1 μM nije djelovao toksično na stanice.

5. REZULTATI



Slika 10. Citotoksično djelovanje testnih spojeva na stanice mišjih makrofaga (RAW 264.7). Stanice su bile izložene spojevima u koncentraciji od 1 μ M tijekom 24 sata.

5.2. Određivanje antioksidativnog kapaciteta ispitivanih spojeva ABTS metodom

Rezultati određivanja antioksidativnog potencijala spojeva **1**, **1-Re**, **2** i **2-Re** prikazani su u tablici 1. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije apsorbancije nakon 60 minuta inkubacije. Spojevi pokazuju relativno visoke rezultate apsorbancije što ukazuje na njihovu značajno nižu antioksidativnu aktivnost (**1**: 45%, **2**: 47,2%, **1-Re**: 47,5%, **2-Re**: 47,6%) u usporedbi s Troloxom i Eskuletinom koji imaju učinak uklanjanja radikala od 95,4%.

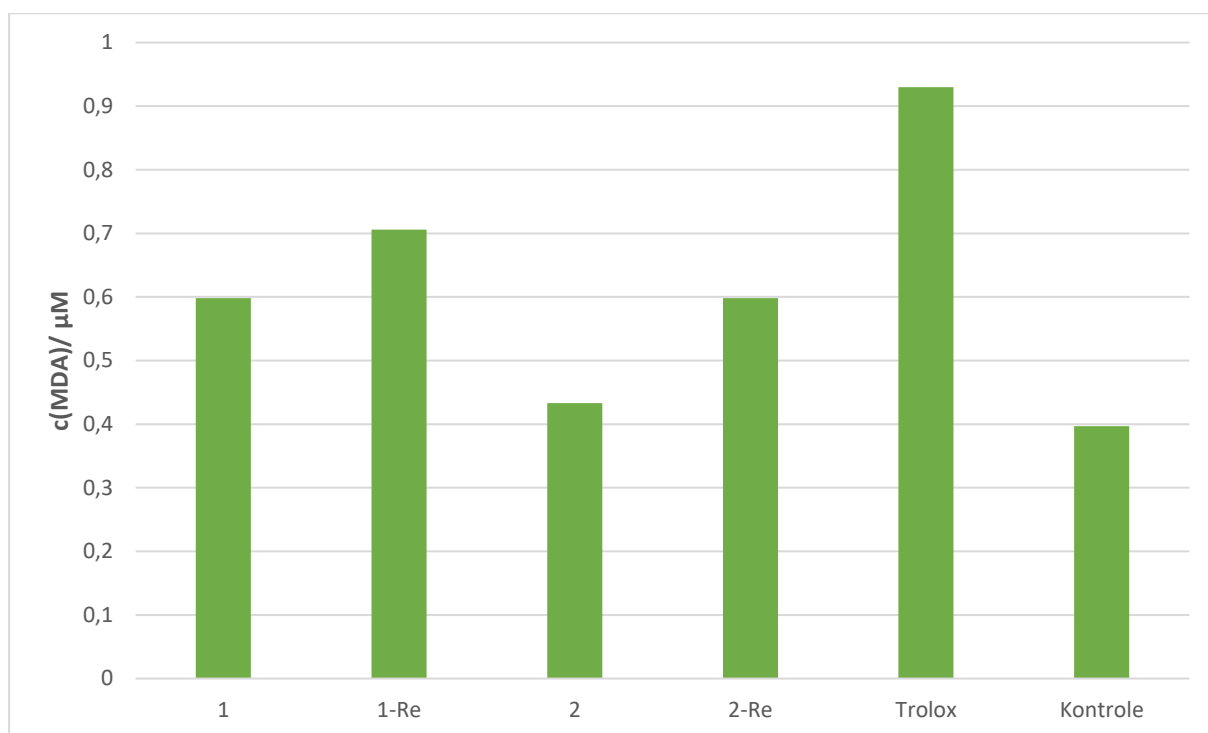
Tablica 1. Učinak spojeva **1**, **1-Re**, **2**, **2-Re** i standardnih spojeva Troloxa i Eskuletina na uklanjanje (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin6-sulfonat) radikal kationa (ABTS+) izraženo kao postotak nakon 60 minuta inkubacije.

Testni spojevi	1	1-Re	2	2-Re	Eskuletin	Trolox
	45,2 %	47,3 %	47,2 %	47,6 %	95,4 %	95,4 %

5. REZULTATI

5.3. Učinak ispitivanih spojeva na stvaranje malondialdehida u LPS-om stimuliranim RAW 264.7 stanicama *in vitro*

Rezultati stvaranja malondialdehida u LPS-om stimuliranim RAW264.7 stanicama vidljivi su na slici 11. Stimulacija LPS-om nije značajno povisila ni smanjila razine malondialdehida te nisu pronađene značajne statističke promjene. Koncentracije MDA uzoraka manje su od koncentracije MDA u Troloxa, a veće od koncentracija kod kontrole. Takva raspodjela rezultata može upućivati na djelomično antioksidativno djelovanje, ali ne dovoljno da u potpunosti smanje oksidativni stres ispod razine kontrolnih stanica.



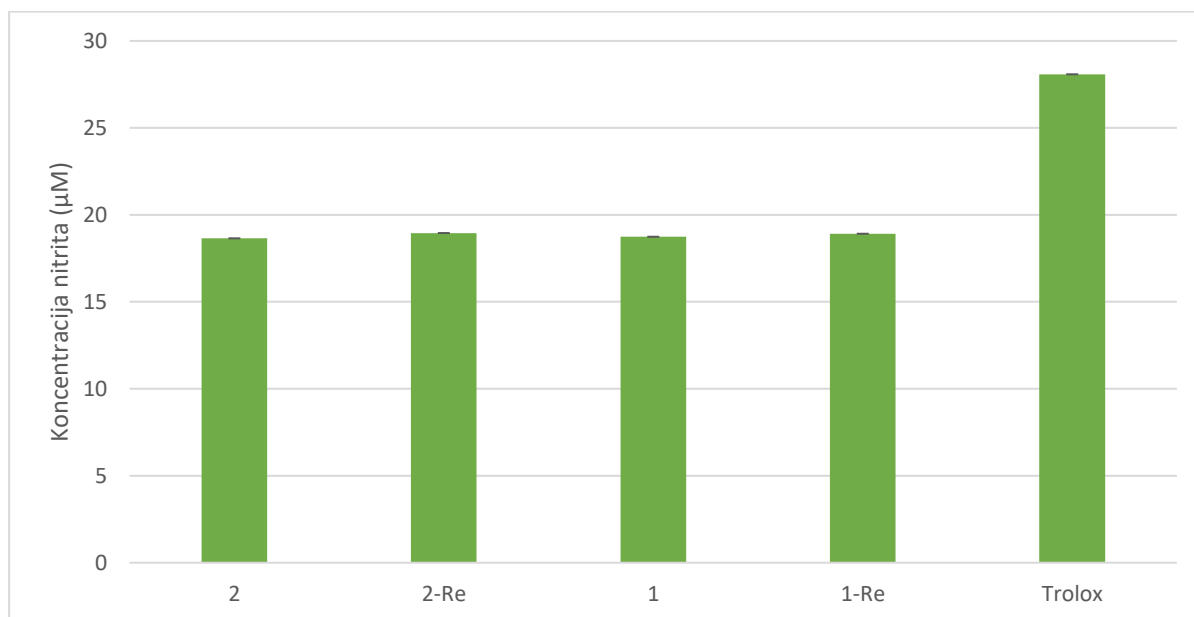
Slika 11. Učinak hibridnih spojeva na TBARS razine izražene kao količina MDA u LPS-om stimuliranim RAW stanicama. Stanice su preinkubirane sa testiranim hibridima i Troloxom u koncentraciji od 10 μM tijekom 2 sata i onda kontinuirano stimulirane sa 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS-om tijekom 24 sata. Kontrola: netretirane i nestimulirane stanice.

5.4. Određivanje NO Griessovim testom

Određivanje nitrita Griessovim testom može pružiti uvid u protuupalno ili proupalno djelovanje testnih spojeva. Slika 12. prikazuje rezultate testiranja testnih spojeva **1**, **1-Re**, **2** i **2-Re** na stvaranje dušikova oksida u LPS-om stimuliranim RAW 264.7 mišjim makrofagima. Na grafu

5. REZULTATI

se vidi da je mala razlika u koncentraciji među samim spojevima, no za razliku od Troloxa koji se koristio kao standard spojevi su inhibirali stvaranje NO za oko 30%.



Slika 12. Učinak hibridnih spojeva na stvaranje dušikova oksida u LPS-om stimuliranim RAW 264.7 stanicama. Stanice su preinkubirane s testiranim hibridima i Troloxom u koncentraciji od 10 µM tijekom 2 sata i onda kontinuirano stimulirane s 1µg/mL LPS-om tijekom 24 h. Kontrola: netretirane i nestimulirane stanice. Rezultati su izrađeni kao koncentracija nitrita. Koncentracija nitrita (µM) izračunata je pomoću NaNO₂ standardne krivulje.

6. RASPRAVA

6. RASPRAVA

Rak je skupina bolesti koju karakterizira nekontrolirani rast i širenje abnormalnih stanica, ako širenje nije kontrolirano, može dovesti do smrti (20). Mnogi oblici raka nastaju na mjestima infekcije, kronične iritacije i upale (21). Na osnovi brojnih studija postaje jasno da je tumorsko mikrookruženje, koje je u velikoj mjeri definirano upalnim stanicama, neizostavan sudionik u neoplastičnom procesu, jer potiče nekontroliranu proliferaciju, preživljavanje tumorskih stanica i njihovu migraciju (21). Problemi povezani s liječenjem raka uključuju visoku stopu otpornosti tumora na terapiju kao i njene štetne učinke na normalne stanice što zahtjeva nove inovativne pristupe i razvoj novih i sigurnijih lijekova protiv raka s manje nuspojava i visoku učinkovitost prema stanicama raka (22-23). Takvi novi lijekovi mogu se stvarati kombinacijom molekula koje imaju različitu strukturu, a mogu se razlikovati i mehanizmi djelovanja kao i ciljevi na ili unutar stanice. Kao što je već ranije spomenuto, za veliki broj kemijskih spojeva deriviranih od strukturno različitih heterocikličkih jezgra, pokazano je da inhibiraju rast tumorskih stanica, ali i upalne procese (24, 25).

U ovome radu ispitani su ligandi na bazi kinolina i kumarina i njihovi renijevi (I) karbonilni kompleksi. S obzirom na ranije spomenuta svojstva ovih spojeva opravdano se istraživao njihov utjecaj na proliferaciju stanica, njihovo protuupalno djelovanje i antioksidativni kapaciteti. Određivanjem citotoksičnosti liganda **1** i **2**, kao i njihovih kompleksa s Re (**Re-1** i **Re-2**) uočeno je da djeluju jače na inhibiciju rasta stanica leukemija i limfoma u odnosu na stanice karcinoma. Na svim staničnim linijama kompleksi s renijem pokazali su značajne antiproliferativne učinke u odnosu na učinke liganada pojedinačno. Uočeni rezultati izražene antiproliferativne aktivnosti metalnih kompleksa u usporedbi s njihovim kumarinskim i kinolinskim ligandima u skladu su s rezultatima prethodno objavljenih studija (18,26-29).

Svi nekirurški pristupi u terapiji tumora poput kemoterapije, radioterapije ili fotodinamičke terapije ubijaju stanice raka izazivanjem oksidativnog stresa u tretiranim stanicama (30). S obzirom na građu liganada, kao i ugradnju renija u kompleks istražen je mogući antioksidativni potencijal ovih spojeva. Dobiveni rezultati pokazuju da ovi spojevi nemaju izražene antioksidativne učinke u odnosu na standardne spojeve trolox i eskuletin.

MTT testom pokazalo se kako su spojevi s renijevim (I) karbonilnim kompleksom (**1-Re** i **2-Re**) znatno toksičniji od spojeva bez renijevih kompleksa (spojevi **1** i **2**). Najniža razina toksičnosti pokazala se pri koncentraciji od 1 μM , stoga se ta koncentracija koristila za

6. RASPRAVA

istraživanje protuupalne učinkovitosti. Najmanju osjetljivost na testne spojeve pokazala je stanična linija Caco-2, gdje se pri manjim koncentracijama stimulirala proliferacija stanica. Pri najvećoj koncentraciji hibrida, sve stanične linije pokazale su značajnu inhibiciju rasta za spojeve **1-Re** i **2-Re**. Rezultati istraživanja citotoksičnosti derivata pokazali su zadovoljavajuće rezultate kod spojeva **1-Re** i **2-Re**, ali su potrebna daljnja istraživanja kako bi se utvrdila konkretna terapijska svojstva tih spojeva.

Za određivanje imunomodulatornih učinaka testnih spojeva koristili smo staničnu liniju mišjih makrofaga RAW 264.7 zbog sposobnosti vjernog repliciranja upalnih reakcija, čime se dobivaju vrijedni uvidi u imunomodulirajuća svojstva testiranih tvari (31). Imunomodulacijska aktivnost procijenjena je određivanjem koncentracije dušikovog oksida (NO). Svi testirani spojevi su podjednako smanjili stvaranje NO-a u stimuliranim stanicama za oko 30 %. Slične rezultate istraživanja dobili su Tseng i sur. testiranjem učinaka derivata pirazolo[4,3-c]kinolina za njihovu inhibitorску aktivnost LPS-om stimulirane proizvodnje NO i ekspresije iNOS-a u stanicama RAW 264.7 (32). Nadalje, u istraživanju Kanga i sur., rađenim na 6-metilkumarinima i 7-metilkumarinima, otkrili su da je NO inhibitorna aktivnost 6-metilkumarina bolja, dok kada je hidroksilna skupina vezana na poziciju 4 6-metilkumarina (4-H-6MC) i 7-metilkumarina (4H-7MC), smanjena je inhibicijska aktivnost kumarina za NO (32). S obzirom na rezultate postojećih istraživanja i na temelju dobivenih rezultata ovog istraživanja derivati kinolina i kumarina i njihovih renijevih (I) karbonilnih kompleksa imaju potencijal u daljnjem razvijanju lijeka u smislu djelovanja na inhibiciju NO.

Rezultati mjerenja oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije u stimuliranim RAW 264.7 stanicama nakon izlaganja testnim spojevima ne pokazuju značajnu promjenu u rezultatima što može ukazivati na nedostatak značajnog oksidativnog stresa ili na učinkovite antioksidativne mehanizme testnih spojeva. Potrebna su dodatna istraživanja mehanizma djelovanja ovih spojeva, antioksidativni potencijal prirodnih i sintetskih kumarina je temeljito istražen posljednjih godina i postalo je jasno da su polihidroksi ili fenolni kumarina učinkoviti antioksidansi u biološkim sustavima (33).

7. ZAKLJUČAK

7. ZAKLJUČAK

Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti slijedeće:

1. Ugradnjom renija između kinolinskih i kumarinskih liganada značajno raste antiproliferativna aktivnost na tumorskim stanicama u usporedbi s odgovarajućim ligandima pojedinačno.
2. Spojevi s renijem pokazuju selektivno djelovanje na stanice limfoma i leukemija u odnosu na stanične linije adenokarcinoma i netumorsku staničnu liniju MRC-5.
3. Ligandi **1** i **2**, kao i njihovi kompleksi s renijem imaju manji antioksidativni kapacitet u odnosu na Trolox i Eskuletin
4. Testirani spojevi inhibiraju stvaranje dušikovog oksida u LPS-om stimuliranim RAW 264.7 makrofazima
5. Testirani spojevi nemaju učinke na lipidnu peroksidaciju u LPS-om stimuliranim RAW 264.7 makrofazima

8. SAŽETAK

8. SAŽETAK

Uvod: Tumorske bolesti su jedna od vodećih bolesti suvremenog društva i javljaju se u svim dobnim skupinama. Njihov razvoj odvija se u tri stadija: inicijacija, promocija i progresija. Zadnjih nekoliko godina s napretkom medicine otkrivaju se novi potencijalni spojevi koji bi imali protuupalna i protutumorska djelovanja. Derivati kinolina i kumarina i njihovi renijevi (I) karbonilni kompleksi, otkriveni su kao spojevi koji imaju raznolike strukture od kojih svaka nosi neki svoj značaj u proizvodnji lijekova.

Cilj istraživanja: (1) ispitati antitumorsku aktivnost kinolinskih i kumarinskih liganada i njihovih kompleksa s renijem na panelu tumorskih stanica; (2) ispitati protuupalnu aktivnost kinolinskih i kumarinskih liganada i njihovih kompleksa s renijem određivanjem dušikovog oksida i malonilaldehida liposaharidima induciranim RAW 264.7; (3) odrediti antioksidativni kapacitet kinolinskih i kumarinskih liganada i njihovih kompleksa s renijem.

Materijali i metode: Antiproliferativna aktivnost određena je MTT testom na staničnim linijama: MRC-5 (ljudskim fibroblastima izoliranim iz pluća fetusa), ljudskim stanicama raka vrata maternice - HeLa, ljudskim stanicama adenokarcinoma debelog crijeva (Caco-2), stanicama akutne monocitne leukemije (THP-1), T-stanicama limfoma 8 (Hut-78), stanicama akutne limfoblastične leukemije (CCRF-CEM) i na kulturi stanica mišjih makrofaga RAW 264.7). Antioksidativni kapacitet određen je ABTS metodom. Koncentracije NO određene su Griessovim testom, a lipidna peroksidacija TBARS testom.

Rezultati: Ligandi **1** i **2** i i njihovi kompleksi (**Re-1** i **Re-2**) jače inhibiraju rast stanica leukemija i limfoma u odnosu na stanice karcinoma. Najmanju osjetljivost na testne spojeve pokazala je stanična linija Caco-2. Kompleksi s renijem pokazali su jače antiproliferativne učinke u odnosu na učinke liganada pojedinačno. Testirani spojevi imaju manji antioksidativni kapacitet u odnosu na trolox i eskuletin te inhibiraju stvaranje dušikovog oksida u LPS-om stimuliranim RAW 264.7 makrofazima. Testirani spojevi nemaju učinke na lipidnu peroksidaciju u LPS-om stimuliranim RAW 264.7 makrofagima.

Zaključak: Potrebno je provesti daljnja istraživanja u smjeru razjašnjavanja mehanizma djelovanja testiranih spojeva s obzirom na uočene selektivne učinke na rast stanica leukemija i limfoma.

Ključne riječi: Citotoksičnost, derivati kinolina, derivati kumarina, renijevi (I) karbonilni kompleksi,

9. SUMMARY

9. SUMMARY

Evaluation of cytotoxicity and anti-inflammatory efficacy of ligands based on quinoline and coumarin and their rhenium (I) carbonyl complexes *in vitro*

Introduction: Tumor diseases are one of the leading diseases of modern society and occur in all age groups. Their development takes place in three stages: initiation, promotion and progression. In the last few years, with the progress of medicine, new potential compounds have been discovered that would have anti-inflammatory and anti-tumor effects. Quinoline and coumarin derivatives and their rhenium (I) carbonyl complexes have been discovered as compounds that have a diverse structure, each of which has its own importance in the production of drugs.

The aim of the research: (1) to examine the antitumor activity of quinoline and coumarin ligands and their complexes with rhenium on a panel of tumor cells; (2) to examine the anti-inflammatory activity of quinoline and coumarin ligands and their complexes with rhenium by determining nitric oxide and malonylaldehyde with RAW264.7-induced liposaccharides; (3) to determine the antioxidant capacity of quinoline and coumarin ligands and their complexes with rhenium

Materials and methods: Antiproliferative activity was determined by the MTT test on cell lines: MRC-5 (human fibroblasts isolated from fetal lungs), human cervical cancer cells - HeLa, human colon adenocarcinoma cells (Caco-2), acute monocytic leukemia cells (THP-1), lymphoma 8 Hut-78 T-cells), acute lymphoblastic leukemia cells (CCRF-CEM) and mouse macrophage cell culture RAW 264.7). The antioxidant capacity was determined by the ABTS method. NO concentrations were determined by the Griess test and lipid peroxidation by the TBARS test

Results: Ligands 1 and 2 and their complexes (Re-1 and Re-2) inhibit the growth of leukemia and lymphoma cells more strongly than cancer cells. The Caco-2 cell line showed the highest sensitivity to the test compounds. Complexes with rhenium showed stronger antiproliferative effects compared to the effects of the ligands individually. The tested compounds have a lower antioxidant capacity compared to trolox and esculetin and inhibit the formation of nitric oxide in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. Tested compounds have no effect on lipid peroxidation in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages.

9. SUMMARY

Conclusion: It is necessary to carry out further research in the direction of clarifying the mechanism of action of the tested compounds, considering the observed selective effects on the growth of leukemia and lymphoma cells.

Key words: quinoline derivatives, coumarin derivatives, rhenium (I) carbonyl complexes, cytotoxicity

10. LITERATURA

10. LITERATURA

1. Chhikara BS, Parang K. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chem Biol Lett.* 2023;1–16. Dostupno na: <https://pubs.thesciencein.org/cbl>
2. World Health Organization (WHO). Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. 2024. Dostupno na: <https://gco.iarc.fr/en>.
3. Choudhuri S, Arvidson K, Chanderbhan R. *Carcinogenesis: mechanisms and models.* U: Gupta RC, ur. *Veterinary Toxicology.* Academic Press; 2007. str. 343-59. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/B978-012370467-2/50119-X>.
4. Sadler C. *Comprehensive Toxicology.* U: Reference Module in Biomedical Sciences. 3. izdanje. Vol. 7. 2018. str. 289-309.
5. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7. doi: 10.1038/nature01322
6. Ramos A, Sadeghi S, Tabatabaeian H. Battling chemoresistance in cancer: Root causes and strategies to uproot them. *Int J Mol Sci.* 2021;22:1-22. doi: 10.3390/ijms22179451
7. Debela DT, Muzazu SG, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, Kitui SK, Manyazewal T. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med.* 2021 Aug 12;9:20503121211034366. doi: 10.1177/20503121211034366
8. Borah P, Hazarika S, Chettri A, Sharma D, Deka S, Venugopala KN, Shinu P, Al-Shar'i NA, Bardaweel SK, Deb PK. Heterocyclic compounds as antimicrobial agents. U: Bagchi D, Das A, Downs BW, ur. *Viral, Parasitic, Bacterial, and Fungal Infections.* Academic Press; 2023. str. 781-804. doi: 10.1016/B978-0-323-85730-7.00068-0
9. Patel K, Rathi J, Dhiman N. Design, synthesis and molecular modeling of new quinoline analogues as potential anti-cancer agents. *Mater Today Proc.* 2020;28:3347-51. doi: 10.1016/j.matpr.2020.01.305
10. Ghorab MM, Alsaid MS. Anti-breast cancer activity of some novel quinoline derivatives. *Acta Pharm.* 2015;65:271-283
11. Rasoul-Amini S. Antitumor activity of new quinoline derivatives in human breast cancer T47D cells. *Int J Cancer Res.* 2006;2:102-8
12. Mukherjee S, Pal M. Medicinal chemistry of quinolines as emerging anti-inflammatory agents: An overview. Vol. 20, 35. 2013;4386-410

10. LITERATURA

13. Emami S, Dadashpour S. Current developments of coumarin-based anti-cancer agents in medicinal chemistry. *Eur J Med Chem.* 2015;102:611-30. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.08.033
14. Annunziata F, Pinna C, Dallavalle S, Tamborini L, Pinto A. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 29;21(13):4618
15. Thakur A, Singla R, Jaitak V. Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. *Eur J Med Chem.* 2015;101:476-95. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.07.010
16. Schindler K, Zobi F. Anticancer and antibiotic rhenium tri- and dicarbonyl complexes: Current research and future perspectives. *Molecules.* 2022;27(2):539. doi: 10.3390/molecules27020539
17. Karges RW, Stokes SM, Cohen S. Metal complexes for therapeutic applications. *Trends Chem.* 2021;3:523-34. doi: 10.1016/j.trechm.2021.03.006.
18. Kumar R, Thakur A, Sachin, Chandra D, Kumar Dhiman A, Kumar Verma P, Sharma U. Quinoline-based metal complexes: Synthesis and applications. *Coord Chem Rev.* 2024;499:215453. doi: 10.1016/j.ccr.2023.215453
19. Schmölz L, Wallert M, Lorkowski S. Optimized incubation regime for nitric oxide measurements in murine macrophages using the Griess assay. *J Immunol Methods.* 2017;449:68-70. doi: 10.1016/j.jim.2017.06.012
20. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2020.* Atlanta: American Cancer Society; 2020.
21. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7. doi: 10.1038/nature01322
22. Xu Z, Zhao SJ, Liu Y. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as potential anticancer agents: Current developments, action mechanisms and structure-activity relationships. *Eur J Med Chem.* 2019 Dec 1;183:111700. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111700. Epub 2019 Sep 16. PMID: 31546197
23. Ramos A, Sadeghi S, Tabatabaeian H. Battling chemoresistance in cancer: Root causes and strategies to uproot them. *Int J Mol Sci.* 2021;22:1-22. doi: 10.3390/ijms22179451

10. LITERATURA

24. Hua CJ, Niu WJ, Li YJ. Optical property investigations of coumarin and indene diketone structure dyes: Experiment and calculation. *Results Chem.* 2022;4:100257. doi: 10.1016/j.rechem.2021.100257
25. M. Ilakiyalakshmi, A. Arumugam Napoleon, Review on recent development of quinoline for anticancer activities, *Arab. J. Chem.* 15 (2022) 104168. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104168>.
26. Krzysztof Łyczko, Anna Pogorzelska, Urszula Czeł'scik, Mirosława Koronkiewicz, Joanna E. Rode, El'zbieta Bednarek, Robert Kawęcki, Karolina We'grzyńska, Anna Baraniak, Małgorzata Milczarek b and Jan Cz. Dobrowolski. Tricarbonyl rhenium(I) complexes with 8-hydroxyquinolines: structural, chemical, antibacterial, and anticancer characteristics. *RSC Adv.*, 2024, 14, 18080
27. Wang ZF, Nai XL, Xu Y, Pan FH, Tang FS, Qin QP, Yang L, Zhang SH. Cell nucleus localization and high anticancer activity of quinoline-benzopyran rhodium(iii) metal complexes as therapeutic and fluorescence imaging agents. *Dalton Trans.* 2022;51:12866-75. doi: 10.1039/d2dt01929a
28. Adsule S, Barve V, Chen D, Ahmed F, Dou QP, Padhye S, Sarkar FH. Novel Schiff base copper complexes of quinoline-2 carboxaldehyde as proteasome inhibitors in human prostate cancer cells. *J Med Chem.* 2006;49:7242-6. doi: 10.1021/jm060712l
29. Flora SJ. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev.* 2009 Sep-Oct;2(4):191-206. doi: 10.4161/oxim.2.4.9112.
30. Stanca L, Geicu OI, Serban AI, Dinischiotu A. Interplay of oxidative stress, inflammation, and autophagy in RAW 264.7 murine macrophage cell line challenged with Si/SiO₂ quantum dots. *Materials.* 2023;16:5083. doi: 10.3390/ma16145083
31. Tseng CH, Tung CW, Peng SI, Chen YL, Tzeng CC, Cheng CM. Discovery of pyrazolo[4,3-c]quinolines derivatives as potential anti-inflammatory agents through inhibiting of NO production. *Molecules.* 2018 Apr 28;23(5):1036. doi: 10.3390/molecules23051036. PMID: 29710774; PMCID: PMC6102577
32. Kang JK, Chung YC, Hyun CG. Anti-inflammatory effects of 6-methylcoumarin in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages via regulation of MAPK and NF-κB signaling pathways. *Molecules.* 2021;26:5351. doi: 10.3390/molecules26175351

10. LITERATURA

33. Wahy AHME, Ismail AR, Kana MTHA, Negm NA. Synthesis and characterization of novel bis-(4-methylcoumarin) derivatives as photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 2017;77:83-91. doi: [Google Scholar] [CrossRef]

11. ŽIVOTOPIS

11. ŽIVOTOPIS

Lucija Pavković rođena je 21. listopada 1999. godine. Nakon završene osnovne škole Dobriše Cesarića u Požegi, upisuje opću Gimnaziju u Požegi.

2018. godine upisuje Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike u Osijeku te ga završava 2021. Nakon preddiplomskog studija upisuje Diplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike.