

# Utjecaj hibridnih molekula kinolina na stanični ciklus tumorskih stanica in vitro

---

Rugani, Bruno

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:152:985100>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Bruno Rugani**

**UTJECAJ HIBRIDNIH MOLEKULA  
KINOLINA NA STANIČNI CIKLUS  
TUMORSKIH STANICA *IN VITRO***

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Bruno Rugani**

**UTJECAJ HIBRIDNIH MOLEKULA  
KINOLINA NA STANIČNI CIKLUS  
TUMORSKIH STANICA *IN VITRO***

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je ostvaren u laboratoriju za kulturu stanica Medicinskog fakulteta u Osijeku

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

Rad ima 24 listova i 5 slika.

## *Predgovor*

Zahvaljujem se prvotno mentorici prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac što je omogućila da radim završni rad na katedri koja me najviše zanimala, što je osigurala moj samostalan rad u laboratoriju i što mi je omogućila odlazak na simpozij u Pečuh sa završnim radom na kojem sam stekao mnoga korisna iskustva. Također se zahvaljujem dr. sc. Marijani Jukić što mi je strpljivo pomagala u laboratorijskom radu i nesebično dala mnoge savjete u svrhu poboljšanja rada. Uz nju, zahvaljujem se i bacc. med. lab. diag. Ivani Jelavić koja je izdvojila svoje vrijeme i podučila me o radu u laboratoriju za stanične kulture.

Zahvaljujem se svim profesorima, docentima, asistentima, djelatnicima i suradnicima Medicinskog fakulteta u Osijeku što su mi podarili znanje potrebno za ostvarenje ovog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji što su mi uz potporu i bezuvjetnu ljubav omogućili studiranje u području znanosti koje me najviše interesiralo.

Zahvale idu i svim mojim prijateljima i kolegama koji su me oblikovali da budem osoba kakva danas jesam.

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Tumorska oboljenja i karcinogeneza .....	1
1.2. Kinolin i derivati .....	1
1.3. Stanični ciklus .....	3
1.4. Tehnika kulture stanica .....	4
2. Hipoteza.....	6
3. Ciljevi.....	7
4. Materijal i metode .....	8
4.1. Stanične kulture.....	8
4.2. Priprema hibrida kinolina .....	9
4.3. Određivanje citotoksičnosti.....	9
4.4. Analiza staničnog ciklusa na protočnom citometru.....	10
4.5. Statistička obrada .....	11
5. Rezultati.....	12
5.1. Citotoksični učinak hibrida kinolina u <i>in vitro</i> kulturi.....	12
5.2. Djelovanje hibrida kinolina na stanični ciklus tumorskih stanica <i>in vitro</i> .....	13
6. Rasprava .....	16
7. Zaključak .....	18
8. Sažetak .....	19
9. Summary .....	20
10. Literatura .....	21
11. Životopis.....	24

## Popis kratica

- A498 - stanice raka bubrega
- CaCo-2 - (eng. *adenocarcinoma, colorectal*) kolorektalni adenokarcinom
- CCRF-CEM - stanice akutne limfoblastične leukemije
- CDK - (eng. *cyclin-dependent kinase*) ciklin ovisna kinaza
- ctDNA - (eng. *circulating tumour DNA*) cirkulirajuća tumorska DNA
- DMEM - Dulbecco modificiran Eaglov medij
- DMSO - Dimetil sulfoksid
- DNA - (eng. *deoxiribonucleic acid*) deoksiribonukleinska kiselina
- EDTA - Etilendiamintetraoctena kiselina
- FBS - (eng. *fetal bovine serum*) fetalni goveđi serum
- HEPES - 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina
- INK4 - inhibitor CDK4 kinaza
- K-562 - stanice akutne limfoblastične leukemije
- MDA-MB - (eng. *M.D. Anderson metastatic breast cancer*) M.D. Anderson metastatički rak dojke
- MDCK1 - (eng. *Madin Darby canine kidney cells*) Madin Darby stanice psećeg bubrega
- MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid
- PBS - (eng. *phosphate-buffered saline*) fiziološka otopina puferirana fosfatom
- PDGF - (eng. *platelet-derived growth factor*) faktor rasta iz trombocita
- PI - propidijev jodid
- raf - (eng. *rapidly accelerated fibrosarcoma*) brzo napredujući fibrosarkom
- ras - (eng. *rat sarcoma gene*) gen sarkoma štakora
- Rb - retinoblastom gen
- RNA - (eng. *ribonucleic acid*) ribonukleinska kiselina
- RPMI - Roswell Park Memorial Institute medij
- src - „sarcoma“ genska obitelj kinaza
- WHO - Svjetska zdravstvena organizacija

## 1. Uvod

### 1.1. Tumorska oboljenja i karcinogeneza

U današnjem svijetu, rak je jedan od najvećih javnozdravstvenih problema. Odgovoran je za jednu šestinu smrti u globalu (1). Vođeni tim informacijama, znanstvenici istražuju razne načine kako da izliječe tumorska oboljenja. Pošto je rak bolest koja je ovisna o više faktora poput genske podloge, okolišnih čimbenika, osobnih navika i stresa, teško se baviti problematikom prevencije tumorskih oboljenja. Najznačajniji karcinogeni su kemikalije, zračenje i neki virusi (2).

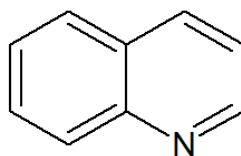
Kada govorimo o karcinogenezi, govorimo o procesu koji najčešće traje desecima godina i kojemu su potrebne više od jedne promjene u genotipu stanice, zbog čega ga nazivamo i „*multistep*“ procesom (3). Kada govorimo o mutagenezi povezanoj s karcinogenezom, često se spominju protoonkogeni i tumor-supresori. Protoonkogeni su važni regulacijski geni koji kodiraju proteine u putovima prijenosa signala kontrole proliferacije stanice (ras, raf, src). Promjenama u slijedu baza protoonkogeni, najčešće točkastim mutacijama, nastaju onkogeni koji dovode do transformacije stanica. S druge strane, tumor-supresorski geni imaju suprotnu ulogu u kontroli staničnog rasta (*Rb*, *p53*). Mnogi tumori ove gene imaju inaktivirane zbog čega nestaje negativna regulacija proliferacije i stanice se dijele bez inhibicije. Glavna razlika između tumorskih i zdravih tkiva u kulturi jest što kod zdravih stanica dolazi do inhibicije rasta kada stanice dostignu optimalnu gustoću (konfluentnost) u mediju. Taj fenomen je također poznat pod nazivom dodirna inhibicija. Stanica raste dok ne dođe u kontakt s drugom stanicom - tada stanični ciklus staje i stanice stvaraju sloj na dnu posudice za kultivaciju, dok se kod tumorskih stanica ciklus nastavlja. Tumorske stanice ne izvršavaju apoptozu, zbog čega žive dulje od normalnih genski nepromijenjenih stanica (2).

### 1.2. Kinolin i derivati

Kinolin (benzo[b]piridin, 1-aza-naftalen) je heterociklični aromatski spoj koji sadrži dušik. Bezbojna je higroskopna tekućina izrazitog mirisa. Njegova formula glasi  $C_9H_7N$ , a molekularna masa iznosi 129,16. Slaba je tercijarna baza, a stupa u slične reakcije kao benzeni i piridini. Nije toksičan za udisanje i oralni unos u organizam. Mnogi derivati kinolina pokazali su opsežne biološke učinke.



## 1. Uvod



Slika 1. Struktura kinolina (sliku izradio autor)

Derivati kinolina djeluju anti-malarično (kinin, kinidin, klorokin, meflokin, amodiakin, primakin), antivirusno (sakvinavir), antibakterijsko (ciprofloksacin, sparfloksacin, gatifloksacin), antihelmintično (oksaminikin), antifungalno (kliokinol), kardi tonično (vesnarinon), antiasmatično (montelukast), anestetično (dibukain).

Neki od derivata pokazali su i antineoplastično djelovanje (kamptotekin, irinotekan, topotekan) (4, 5).

Kamptotekin, korišten u tradicionalnoj Kineskoj medicini, je derivat kinolina. Ekstrahiran je iz drva *Camptotheca acuminata*, zvanim *Xi Shu* - „sretno drvo“ (6). Istraživanja koja su slijedila dokazala su kako je struktura kinolina odgovorna za vezanje kamptotekina za topoizomerazu što zaustavlja proces replikacije, posljedično dovodeći do zaustavljanja staničnoga ciklusa ili apoptoze. Zbog velike toksičnosti kamptotekina i njegove slabe topljivosti u vodi kasnije su sintetizirani njegovi derivati irinotekan i topotekan, koji sadržavaju laktonski prsten što omogućuje netoksični metabolizam ovih spojeva. Pokazali su se vrlo uspješnima u liječenju raka i pokazuju sinergistički učinak s ostalim kemoterapeutima (5, 6).

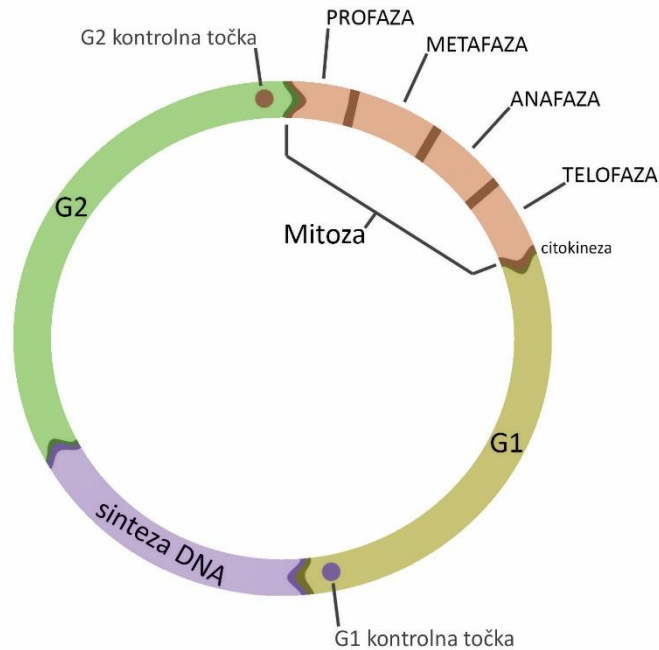
S. Kumar i S. Bawa provodili su mnoga istraživanja djelovanja derivata kinolina na tumorske tvorbe. Pokazali su izvrsne rezultate kroz broj različitih mehanizama poput inhibicije rasta tumora zbog zaustavljanja staničnog ciklusa, uvođenje stanica u apoptozu, inhibicijom angiogeneze, ometanjem metastaze tumorskih stanica i modulacijom odgovora jezgrinih receptora. Ove učinke pokazali su na mnogim staničnim linijama (5).

Luka Krstulović i suradnici su proučavali afinitet vezanja hibrida kinolina za DNA/RNA. Dokazano je da se afinitet vezanja kinolina povećava kako se povećava broj kemijskih grupa koje mogu stvarati vodikove veze s polinukleotidima na dvostrukoj uzvojnici. Ligacija se najčešće događala u malom i velikom utoru DNA molekule, no određeni derivati su se preferencijalno vezali za PoliA i PoliU sekvence. Neki derivati su se vezali i za ctDNA (eng. *circulating tumour DNA*) (7).

## 1. Uvod

Istraživanje Mantu i suradnika pokazalo je kako neki od derivata kinolina imaju vrlo dobre inhibitorne učinke na tumorske stanice. Derivati su najbolje djelovali na stanice raka bubrega A498 i raka dojke MDA-MB-468 (inhibicija rasta 45 %), no dobre rezultate pokazali su i na stanicama leukemije (CCRF-CEM i K-562 s inhibicijom rasta od oko 35 %). Na mnogim staničnim linijama pokazali su inhibitorne učinke, no u manjoj mjeri (8).

### 1.3. Stanični ciklus



Slika 2. Stanični ciklus (sliku izradio autor)

Stanični ciklus je proces kojim linija stanica osigurava svoje funkcionalno potomstvo dijeljenjem na dvije jednake stanice, a sastoji se od 4 glavna dijela – G1 faza (eng. *gap*), S-faza (sinteza), G2 faza i M-faza (mitoza). G1 faza priprema stanicu na replikaciju genetičkog materijala, a stanica je metabolički aktivna i raste. U S fazi odvija se replikacija DNA nakon koje slijedi G2 faza koja sintezom proteina priprema stanicu na mitozu. Mitoza tjelesnih stanica se odvija u četiri koraka: profaza, metafaza, anafaza i telofaza.

Pošto je genetski materijal osjetljiv tijekom diobe i stanice moraju biti dobro opskrbljene tvarima za rast i razvoj, stanični je ciklus strogo reguliran. G1 faza pri samom kraju sadrži regulacijsku točku u kojoj stanica, ako ima dovoljno resursa za proliferaciju, ulazi u nepovratnu S-fazu. Nasuprot, ako stanica nema dobre uvjete za diobu, odlazi u G0 fazu u kojoj ostaje metabolički aktivna, ali se ne dijeli dok ne dobije signal za ponovni ulazak u ciklus. Primjer takvog signala je protein PDGF (eng. *platelet-derived growth factor*) koji nakon oštećenja endotela kože stimulira stanice zaustavljene u G0 fazi na proliferaciju kako bi rana zacijelila.

## 1. Uvod

U eukariotskim se stanicama regulatorna točka na kraju G1 faze koja odlučuje o sudbini stanice između S-faze i G0 faze naziva restrikcijском točkom, a jedna je od najvažnijih regulacijskih mehanizama staničnog ciklusa. Na restrikcijску točku djeluju mnogi izvanstanični faktori rasta kako bi potakli stanicu na odlazak u S-fazu. Mehanizmi regulacije se uglavnom temelje na funkciji ciklin/Cdk kompleksa. Cdk kompleks i Cdk inhibitori čine važnu negativnu okosnicu u sprječavanju odlaska stanice u S fazu ako je DNA oštećena. Cdk inhibitore svrstavamo u dvije obitelji – INK4 i Cip/Kip(p21). INK4 djeluje tako da inhibira Cdk 4 i Cdk 6, dok Cip/Kip mogu inhibirati sve ciklin kinaze duž cijelog staničnog ciklusa. Kada djelovanjem oksidansa ili genotoksičnih agenasa dođe do oštećenja DNA, p21 iz obitelji Cip/Kip je aktiviran pomoću transaktivacije gena p53. P21 zatim inaktivira ciklin D, ciklin 4 i 6, te ciklin E/Cdk2 kompleks dovodeći do hipofosforilacije gena *Rb* što uzrokuje zastoј u staničnom ciklusu potkraj G1 faze (2, 9).

Druga regulatorna točka koju neke stanice posjeduju nalazi se na kraju G2 faze. U toј fazi stanica sadrži dvostruki genom, metabolički je aktivna, no ne dijeli se sve dok nije potaknuta izvanstaničnim faktorima. Glavni faktori odgovorni za regulaciju odlaska stanice u mitozu su Cdk2, obitelj PI3K enzima, p21 i p53. Neki PI3K enzimi izravno fosforiliraju p53, dok neki to rade preko Chk1 i Chk2 kinaza. Aktivnost p53 u slučaju oštećenja DNA je bitna jer on stabilizira proteine odgovorne za zaustavljanje staničnog ciklusa. Stanice kojima je DNA oštećena, a aktivnost gena p21 i p53 narušena pokazuju ubrzan odlazak u mitozu, što ukazuje na važnost ispravne funkcije ovih gena u G2 fazi. Primjer stanica koje mogu „hibernirati“ u G2 fazi su eukariotske oocite, koje mogu desetljećima ostati u G2 fazi, sve dok ih na odlazak u M-fazu ne potakne hormonska regulacija (2, 9).

Istraživanja su pokazala kako zaustavljanje stanica u G2 fazi djelovanjem na funkcije regulatornih mehanizama ima povoljne učinke na osjetljivost tumorskih stanica na antitumorske agense (9).

### 1.4. Tehnika kulture stanica

Razvojem tehnika kultura stanica početkom dvadesetog stoljeća napravljen je značajan doprinos eksperimentalnim istraživanjima biokemijskog i pretkliničkog repertoara. Glavna zamisao je da stanice rastu izvan tijela domaćina u kojem su podvrgnute mnogim sustavnim promjenama. Proces započinje tako da se tkivo usitni (mehanički ili enzimski) i dobije suspenzija stanica što se onda nasaduje u posudice za kultivaciju s odgovarajućim medijem gdje se stanice prihvaćaju za dno i rastu. Rana istraživanja staničnih kultura koristila su se

## 1. Uvod

nedovoljno dobro definiranim ili složenim sastojcima poput plazme ili seruma sve do 1955. godine kad je Harry Eagle opisao prvi složen medij koji omogućuje rast životinjskih stanica. Sastojao se, uz sol i glukozu, od mnogih aminokiselina i vitamina neophodnih za rast stanica. Medij je također morao sadržavati i serum koji je služio kao izvor polipeptidnih faktora rasta (2, 10).

Nakon što stanice porastu u kulturi, mogu se razrijediti i ponovno nasaditi. Normalne stanice dosežu oko 50 do 100 populacijskih udvostručenja, te se pasažiranje takvih stanice može izvesti samo određeni broj puta. U drugu ruku, embrionalne i tumorske stanice imaju sposobnost neograničene proliferacije i nazivamo ih besmrtnim ili permanentnim staničnim linijama. One također brzo rastu, što ih čini vrlo pogodnima kao sredstvo u eksperimentalnim radovima (2).

## 2. Hipoteza

Polazna pretpostavka je da skupina novosintetiziranih hibridnih molekula kinolina pokazuje protutumorsko djelovanje na tumorske stanice koje rastu *in vitro*, zaustavljajući stanice u određenoj fazi staničnog ciklusa.

### 3. Ciljevi

Cilj istraživanja je ispitati učinak novosintetiziranih hibridnih molekula kinolina. Ispitati učinke navedenih hibrida na zdravim i tumorskim stanicama koje rastu u *in vitro* uvjetima, utvrditi postoji li razlika u citotoksičnosti prema zdravim stanicama u odnosu na tumorske stanice te odrediti promjene u staničnom ciklusu.

## 4. Materijal i metode

### 4.1. Stanične kulture

U radu su se koristile komercijalno dostupne stanične linije:

- CaCo-2 (ATCC® HTB-37™) – adenokarcinom debelog crijeva
- MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) – adenokarcinom dojke
- CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™) – akutna limfoblastična leukemija
- MDCK1 (ATCC® CCL-34™) – zdrave stanice psećeg bubrega

U radu su se koristile navedene kemikalije:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- Roswell Park Memorial Institute (RMPI-1640) medij
- Trypsin/EDTA 0.25% s indikatorom Phenol Red (PAN Biotech, Am Gewerbepark 13, 94501 Aidenbach, Njemačka)
- Natrijev piruvat 100mM (Lonza, Verviers, Belgija)
- HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina), (Fluka analytical, Rupert-Mayer-Str. 46, Munich)
- MTT (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD)
- Propidijev jodid 50µg/mL (Clontech, Mountain View, Kalifornija, SAD)
- Histanol 70 (BioGnost, Zagreb, Hrvatska)
- Trypan-blue (GIBCO, Charlemont Terrace, Crofton Road, Dun Laoghaire, Co Dublin, Irska)
- Dimetil sulfoksid (DMSO); (Acros organics, Janssen Pharmaceuticaaan 3a Geel 2440 Belgija)

Uzgoj kultura stanica *in vitro* pomoću kojih smo provodili pokus podrazumijeva uzgajanje u bocama za kulturu od 25 cm<sup>2</sup> i 75 cm<sup>2</sup> (BD, Falcon, Njemačka) u CO<sub>2</sub> inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) na temperaturi 37 °C uz 5 % CO<sub>2</sub>.

Adherentne stanične linije (CaCo-2, MDA-MB-231 i MDCK1) koje su korištene u ovom pokusu održavane su u DMEM mediju s visokim udjelom glukoze (4,5 g/L), 10 % fetalnog goveđeg seruma (eng. *fetal bovine serum*), 1 % kombinacije antibiotik-antimikotik i 1 % glutamaxa. Mediji sadrže kombinaciju antimikrobnih lijekova kako bi se spriječio razvoj

#### 4. Materijal i metode

mikroorganizama koji u mediju i staničnim kulturama nalaze povoljne uvjete za rast. Sastav antimikrobnog dodatka je 10000 U/mL penicilina, 10000 µg/mL streptomicina i 25 µg/mL amfotericina B. Glutamax je dipeptid sastavljen od L-alanina i L-glutamina, koji se za razliku od čistog L-glutamina puno sporije razgrađuje u otopini (11).

CCRF-CEM stanice održavane su razrjeđivanjem ili oduzimanjem dijela volumena te dodatkom svježeg RPMI medija. CCRF-CEM stanice uzgajane su u RPMI-1640 mediju s 10 % temperaturno inaktiviranog FBS-a, 2 mM L-glutamina, 1 mM natrij-piruvata, 10 mM HEPES-a i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomicin antibiotika.

Broj vijabilnih stanica koje ćemo tretirati hibridima kinolina odredili smo na invertnom mikroskopu (Zeiss Axiovert 25, Njemačka). Staničnu suspenziju obojali smo tripanskim plavilom, nakon čega smo suspenziju nanijeli na Bürker-Türk komoricu. Broje se samo neobojene stanice jer one svojom osmotskom regulacijom ne dopuštaju boji ulazak kroz membranu, dok su mrtve stanice obojene. Prebrojene stanice uvrštavaju se u formulu  $N/4 \cdot 3 = X \cdot 10^4$  stanica/cm<sup>3</sup>, gdje je 3 faktor razrjeđenja, a 4 je broj polja.

#### 4.2. Priprema hibrida kinolina

Otopina hibrida kinolina bila je pripremljena otapanjem hibrida u dimetil sulfoksidu čime smo dobili stock otopinu koncentracije  $1 \times 10^{-2}$  M. Hibridi kinolina koje smo koristili pripremljeni su na Zavodu za organsku kemiju, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Korišteni hibridi kinolina označeni su oznakama QH1, QH2 i QH3. Stock otopina je kasnije razrijeđena na koncentracije od  $1 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M i  $1 \times 10^{-6}$  M. Za MTT test korištene su koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M i  $1 \times 10^{-6}$  M, dok za analizu staničnog ciklusa koncentracija  $5 \times 10^{-6}$  M.

#### 4.3. Određivanje citotoksičnosti

Za određivanje citotoksičnog učinka hibrida kinolina na sve stanične linije koristili smo MTT test. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid) redukcijski test predstavlja jedan od najčešće korištenih testova za dokazivanje citotoksičnosti zbog njegove relativne lakoće izvođenja. Žive stanice pretvaraju MTT u formazan pomoću sukcinat dehidrogenaze koji se spektrofotometrijski može mjeriti na apsorbanciji od 570 nm. MTT je svijetlo žut, a formazan je ljubičaste boje, što nam izravno govori o vijabilnosti stanica – što je jača obojenost, to je više stanica živo (12).



#### 4. Materijal i metode

CCRF-CEM stanice nasadene su na mikrotitarske pločice u koncentraciji od  $1 \times 10^5$  st/mL. Stanice su istog dana nasadivanja tretirane hibridima kinolina u koncentracijama od  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  i  $1 \times 10^{-6}$  M. Po isteku vremena inkubacije od 72 sata, na stanice je dodan MTT u finalnoj koncentraciji od 5 mg/mL. Stanice su inkubirane 4 sata u CO<sub>2</sub> inkubatoru. Nastali formazanski kristalići otopljeni su preko noći u 10 % SDS-u i 0,01 M HCl-u. Rezultati su očitani na mikročitaču (iMark, Bio Rad) pri valnoj duljini od 595 nm.

Adherentne stanice nasadili smo u koncentraciji  $2 \times 10^4$  st/mL preko noći su kultivirane prije tretmana kako bi se prihvatile za podlogu. Nakon što su se stanice prihvatile za dno jažica, tretirali smo ih s  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  i  $1 \times 10^{-6}$  M hibrida kinolina. Nakon 72-satnog tretmana, dodana je otopina MTT-a u koncentraciji 5 mg/mL, nakon čega smo mikrotitarsku pločicu inkubirali 4 sata. Kristali formazana otopljeni su u DMSO-u. Rezultati su očitani na mikročitaču (iMark, Bio Rad) pri valnoj duljini od 595 nm.

#### **4.4. Analiza staničnog ciklusa na protočnom citometru**

Svaku tumorsku staničnu liniju tretirali smo hibridima kinolina u duplikatu. Tretman je trajao 24 sata u inkubatoru. Kako bismo odredili kako su hibridi kinolina djelovali na stanični ciklus, koristili smo se protočnom citometrijom. Pošto se gustoća i količina stanične DNA mijenja tijekom ciklusa, koristili smo propidijev jodid kako bi obojili DNA i učinili je detektabilnom sensorima na citometru. Propidijev jodid (PI) je mala fluorescentna molekula koja se veže za DNA interkalirajući između dušičnih baza, a pobuđena je intervalima valnih duljina od 400 nm do 600 nm. Otpušta svjetlosti valne duljine 600 – 700 nm što je čini dobrim izborom za detekciju na protočnom citometru. Prije bojenja stanice je potrebno fiksirati (13).

Adherentne stanične linije korištene za tretman bile su koncentracije  $3 \times 10^5$  stanica po jažici, dok su stanice u suspenziji koncentracije  $5 \times 10^5$  stanica po jažici. Nakon 24 sata tretmana hibridima kinolina koncentracije  $5 \times 10^{-6}$  M adherentne stanice smo iz jažica odvojili pomoću tripsina i prebacili ih u Falcon™ epruvetu za centrifugiranje s konusnim dnom. Epruvete sa stanicama smo centrifugirali 6 minuta na 1100 rpm u uređaju Jouan BR4i. Nakon centrifugiranja uklonili smo supernatant i stanice resuspendirali PBS otopinom. Stanice su fiksirane s 3 mL hladnog etanola i tada su pohranjene na -20 °C do analize. Prije analize bilo je potrebno stanice ponovno centrifugirati 6 minuta na 1100 rpm i ukloniti supernatant te ih isprati PBS-om. Potom je dodana RNaza A koncentracije 0,2 µg/µL, a stanice smo ostavili 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon djelovanja RNaze na stanice je dodan propidij jodid u finalnoj koncentraciji 15 µg/mL. Stanice smo ostavili pola sata na sobnoj temperaturi nakon čega smo

#### 4. Materijal i metode

sadržaj prebacili u epruvete za protočnu citometriju. Analiza je provedena na uređaju FACSCanto II, BD Bioscience. Distribucija stanica u staničnom ciklusu obrađene su FlowJo programu (FlowJo LCC, BD, Ashland, Oregon).

##### **4.5. Statistička obrada**

Testovi citotoksičnosti napravljeni su u triplikatu kroz tri ponavljanja. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost vijabilnih stanica sa standardnom devijacijom. Statistička analiza podataka određena je u XLSTAT 2019 (Addinsoft, Pariz, Francuska) programu, gdje su podatci citotoksičnosti analizirani Mann-Whitney testom, a distribucija stanica u fazama staničnog ciklusa provedena je ANOVA analizom s Dunnettovim testom gdje je razina statističke značajnosti određena kao  $p < 0,05$ .

## 5. Rezultati

### 5.1. Citotoksični učinak hibrida kinolina u *in vitro* kulturi

Citotoksični učinak hibrida kinolina određen je na tumorskim staničnim linijama CaCo-2, MDA-MB-231, CCRF-CEM i na genski nepromjenjenoj staničnoj liniji MDCK1. Parnom usporedbom različitih hibrida i koncentracija određena je statistička značajnost Mann-Whitney-U testom kod koje je  $p < 0,05$  između tretiranih stanica i netretiranih stanica (kontrolne skupine) (slika 3).

Na stanicama CaCo-2, osim kod koncentracije  $1 \times 10^{-6}$  M hibrida QH3, tretman je kod svih derivata i koncentracija pokazao statistički značajnu razliku između kontrolne i tretirane skupine. QH1 smanjuje stanični rast za 75,8 % kod koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M, 34,3 % kod koncentracije  $1 \times 10^{-5}$  M i 21,2 % kod koncentracije  $1 \times 10^{-6}$  M. Kod QH2 su to 50,1 %, 29,2 % i 21,2 %. QH3 ispoljava inhibiciju od 90,9 % na  $1 \times 10^{-4}$  M i 62,6 % kod konc.  $1 \times 10^{-5}$  M.

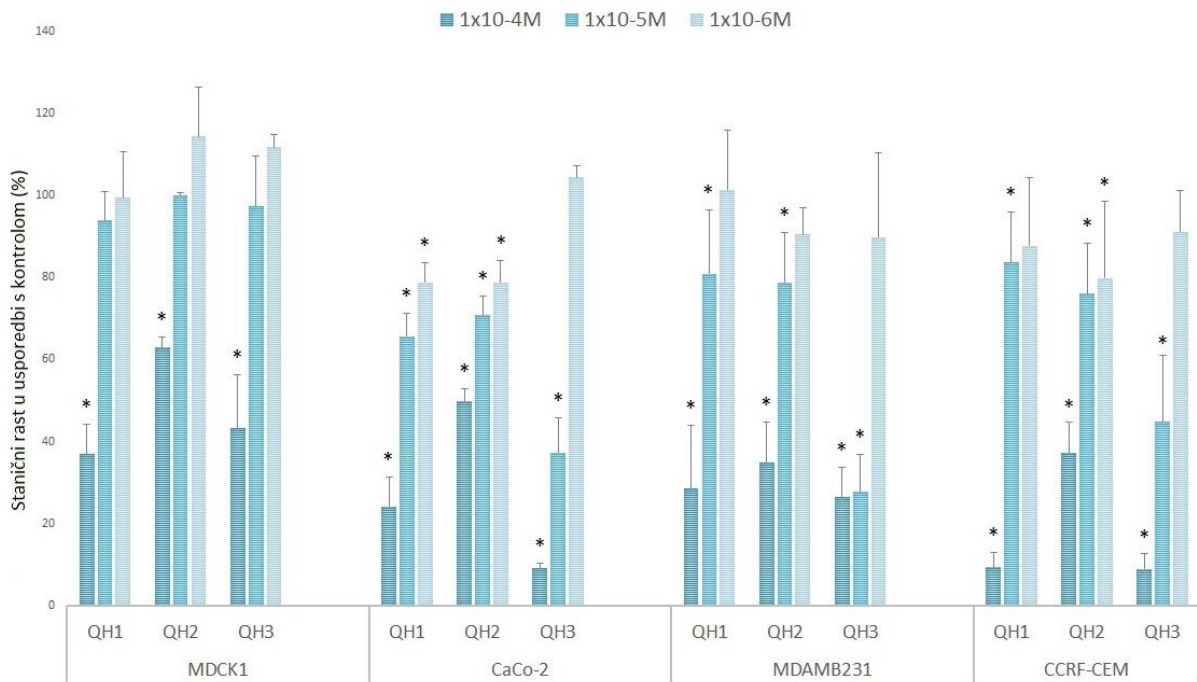
Koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  i  $1 \times 10^{-5}$  M kod MDA-MB-231 pokazale su značajnu razliku između kontrolne i tretirane skupine kod svih derivata, dok  $1 \times 10^{-6}$  M nije. Od više do niže koncentracije ta inhibicija kod QH1 je 71,3 % i 19,1 %, kod QH2 65,1 % i 21,1 %, a kod QH3 73,4 % i 72,3 %.

Kod CCRF-CEM stanica značajne razlike pokazali su hibridi QH1 i QH3 u testiranim koncentracijama  $1 \times 10^{-4}$  i  $1 \times 10^{-5}$  M, a QH2 u svim testiranim koncentracijama. Hibrid QH2 je u rasponu koncentracija  $1 \times 10^{-4}$  do  $1 \times 10^{-6}$  M ispoljavao inhibicije od 62,8 %, 23,9 % i 20,1 %. Kod QH1 to su 90,7 % i 16,2 %, a QH3 91 % i 55,1 %.

Normalna stanična linija - MDCK1 pokazala je manju osjetljivost u odnosu na tumorske stanice pri najvećoj apliciranoj koncentraciji od  $1 \times 10^{-4}$  M kod svih derivata, kod QH1 to se djelovanje očituje u inhibiciji od 63 %, kod QH2 za 37,1 %, a QH3 za 56,6 %.

Citotoksični učinak smo odredili na svim staničnim linijama pod više koncentracija hibrida kinolina kao što je prikazano na slici br. 3. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom.

## 5. Rezultati



Slika 3. Djelovanje  $1 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M i  $1 \times 10^{-6}$  M koncentracija hibrida kinolina QH1, QH2 i QH3 na stanice MDCK1, CaCo-2, MDA-MB-231 i CCRF-CEM nakon 72 sata inkubacije. Statistički značajne razlike označene su \*.

### 5.2. Djelovanje hibrida kinolina na stanični ciklus tumorskih stanica *in vitro*

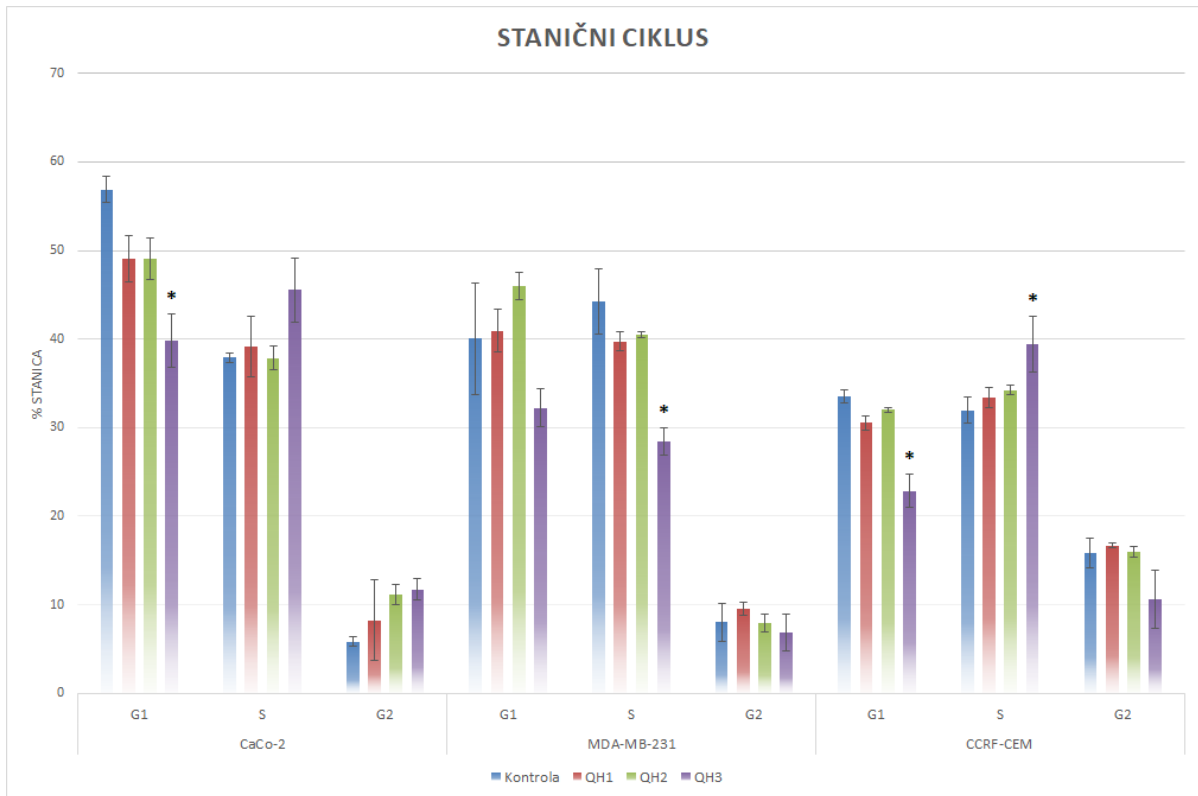
Djelovanje hibrida kinolina na stanični ciklus proučavali smo koristeći se ANOVA analizom s modelom Dunettovog testa kako bismo statistički prikazali značajne razlike između kontrolnih i tretiranih staničnih linija (slika 4). Stanični ciklus prikazan je modelom Watson (pragmatic) u programu FlowJo.

Od svih hibrida jedini koji je pokazivao statistički značajne promjene u staničnom ciklusu bio je QH3.

CaCo-2 stanice tu su razliku pokazivale u G1 fazi smanjenjem u broju stanica od 17,05 %, a MDA-MB-231 u S fazi za 15,9 % pod utjecajem QH3 u odnosu na kontrolnu skupinu. Vidljivo je nakupljanje MDA-MB-231 stanica u subG0 fazi staničnog ciklusa tretine QH3 derivatom.

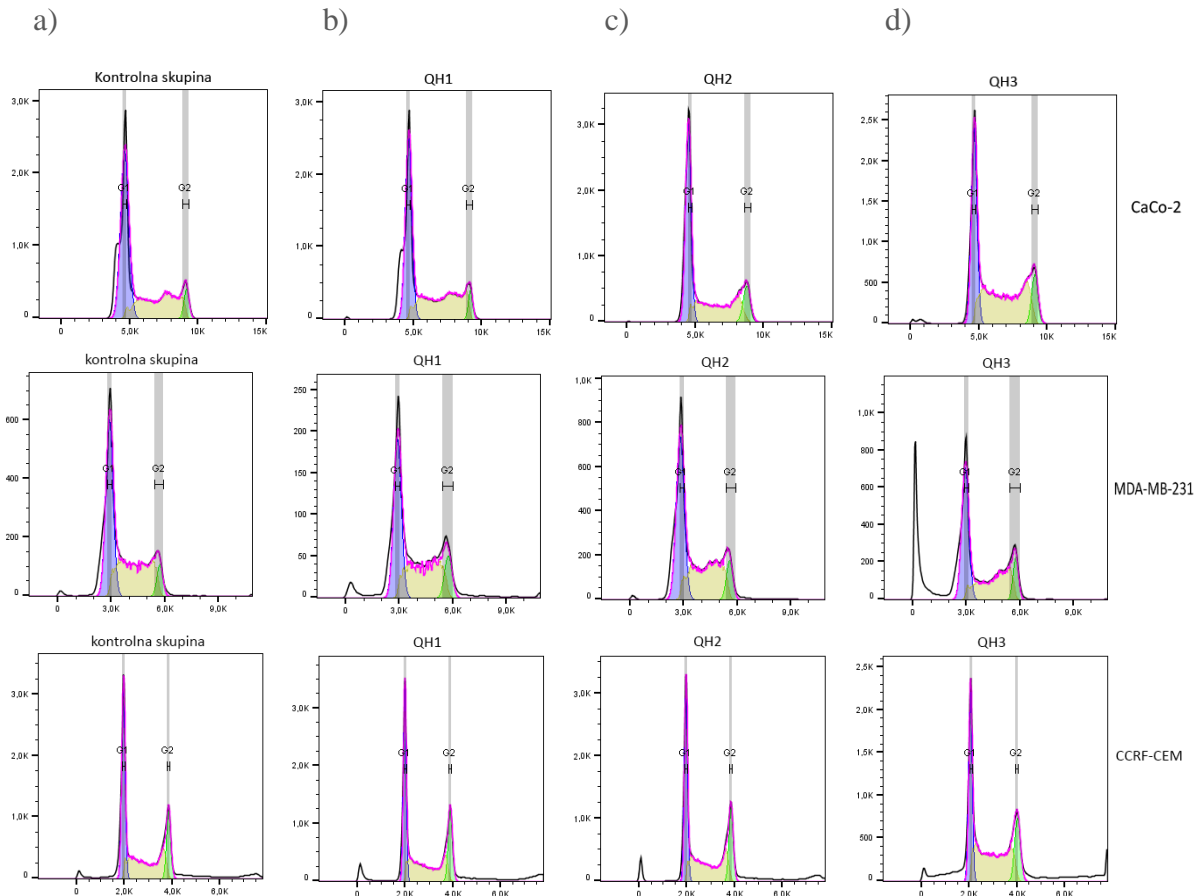
U slučaju CCRF-CEM stanica u G1 fazi bilježimo smanjenje broja stanica u G1 fazi od 10,65 %, dok u S fazi stanica je više za 7,5 % pod utjecajem QH3 u odnosu na kontrolnu skupinu. Derivat QH3 djelovao je na manji udio stanica koje su okarakterizirane s fragmentiranom DNA, odnosno stanice koje su zabilježene u subG0/G1 fazi staničnog ciklusa (slika 5).

## 5. Rezultati



Slika 4. Distribucija stanica CaCo-2, MDA-MB-231 i CCRF-CEM po fazama staničnog ciklusa nakon tretmana s koncentracijom  $5 \times 10^{-6}$  M hibrida QH1, QH2 i QH3 i inkubacije od 24 sata. Statistička značajnost označena je \*.

## 5. Rezultati



Slika 5. Prikaz histograma staničnog ciklusa analiziranog pomoću modela Watson (pragmatic) u programu FlowJo. Slika prikazuje a) kontrolnu skupinu i tretirane stanične linije hibridima b) QH1, c) QH2 i d) QH3.

## 6. Rasprava

Rak, kao drugi po redu uzrok smrti na svijetu, odmah nakon kardiovaskularnih bolesti, zahtijeva mnoga ulaganja i resurse kako bi borba protiv njega bila moguća. WHO procjenjuje da se godišnje pojavi oko 14 milijuna novih slučajeva raka, a oko 1,16 trilijuna dolara se troši u njegovo liječenje (14). Zbog toga je važno posegnuti za kemijskim spojevima koji su nam lakše dostupni i jeftiniji, što kinolin i njegovi derivati jesu. Kinolinski spojevi su ubikvitarni u prirodi, a kao primjer možemo navesti već spomenuti kamptotekin, ali i kinin. Kinin su još Quechua Indijanci koristili kao sredstvo za snižavanje temperature, a dobivali su ga sušenjem kore drva kininovca (*Chinona spp.*) (15). Kinolin kao farmakofor bolje djeluje kada je vezan za neki drugi spoj ili kada je u dimernom obliku, čemu svjedoči dactolisib, novosintetizirani derivat s dimerom kinolina koji se trenutno evaluira u kliničkim istraživanjima kao pogodan antineoplastik. Dactolisib pokazuje antiproliferativno djelovanje tako što inhibira PI3K i mTORC komplekse (16).

Raznolikost kinolinskih derivata postavlja određeni rizik i sa sigurnošću se ne može reći da su potpuno sigurni za uporabu, no pogodnih djelovanja je mnogo. Zbog nedovoljnog broja kliničkih istraživanja s novim kinolinskim citostaticima, potrebno je dobro proučiti njihovu farmakodinamiku kako bi se izbjegli toksični učinci ili kontraefekt. Cilj antitumorske terapije je da kemoterapeutcima uzrokuje nepopravljivo oštećenje na brzo proliferirajućim tumorskim stanicama te tako postignemo zastoj u staničnom ciklusu (senescenciju) ili apoptozu. Problem je što mnogi kemoterapeutici djeluju na sve stanice u tijelu, pa tako i zdrave, gdje najčešće stradaju one koje su kao i tumor – brzo proliferirajuće (17). Kako bismo odredili citotoksični učinak koristili smo se MTT testom. Normalne - MDCK1 stanice pokazale sveukupno veću vijabilnost nakon tretmana naspram stanica raka. Nažalost, stanice su bile značajnije osjetljive na tretman pri najvećoj primjenjenoj koncentraciji hibrida. Većina testiranih hibrida je pokazala citotoksičan učinak na stanice pod koncentracijama  $1 \times 10^{-4}$  M i  $1 \times 10^{-5}$  M, dok je statistički najsvestraniji bio hibrid QH2, a najtoksičniji QH3. To nam govori kako bi u budućim istraživanjima najpogodnija bila koncentracija  $1 \times 10^{-5}$  M, pošto je ona pokazala citotoksični učinak samo na tumorskim stanicama. Gledajući rezultate i grafove također možemo primijetiti da je razlika u djelovanju koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M i  $1 \times 10^{-5}$  M puno veća nego ona između  $1 \times 10^{-5}$  M i  $1 \times 10^{-6}$  M.

Nasuprot djelotvornosti svih hibrida glede citotoksičnosti, jedini hibrid koji je uzrokovao značajne promjene u staničnom ciklusu bio je QH3. Kada pogledamo histogram staničnog ciklusa pod djelovanjem QH3 možemo vidjeti da postoji visoki udio stanica u subG1 fazi.

Povećani udio stanica u subG1 fazi upućuje na velik broj apoptotičkih stanica. Te stanice su ušle u apoptozu najvjerojatnije u G1 fazi. Ako stanice uđu u apoptozu u G2M fazi, povišenje DNA udjela očituje se povećanjem G1 faze (18). Važno je za napomenuti da smo nakon dodavanja hibrida QH3 makroskopski vidjeli promjene kod stanica u suspenziji CCRF-CEM. Stanice su izgledale kao da su se skupile u sitne nakupine. Najčešći uzrok nakupljanja stanica u kulturama gdje su stanice normalno odvojene nakon tripsinizacije je povećan udio DNA sadržaja ili smeća u mediju, što bi moglo značiti da je QH3 odmah nakon dodavanja uzrokovao lizu stanica (19). Kontrolne skupine stanica su na histogramu staničnog ciklusa pokazivale balansiranu distribuciju faza staničnog ciklusa. Zbog nedovoljne preciznosti interpretacije rezultata samo iz PI testa protočne citometrije, ne možemo sa sigurnosti reći da smo tretmanom hibrida QH3 postigli zastoj u staničnom ciklusu u S fazi. Također, smanjen broj stanica u G1 fazi bi mogao upućivati oboje na odlazak stanica u S fazu, no i povećan odlazak G1 stanica u apoptozu. Kada se stanice nakupljaju u S fazi, najlogičniji zaključak je da se aktivirala intra-S kontrolna točka i zaustavila stanice u toj fazi ciklusa (20). To bi značilo da je stanica imala dovoljno materijala i resursa za replikaciju DNA, no zbog oštećenja stanične mašinerije, stanica nije u stanju izvršiti replikaciju. Kako smo proučili da se neki od derivata kinolina mogu vezati za topoizomerazu, takvo objašnjenje se čini zadovoljavajuće.

Sve u svemu, derivati i hibridi kinolina nastavljaju se pokazivati u dobrom svjetlu kao kompetentni antineoplastični lijekovi. Kako bi u potpunosti iskoristili sav njihov potencijal, važno se baviti problematikom farmakokinetike i usavršiti hibridizaciju novih kinolinskih spojeva. Dodavanjem novih potentnih farmakofora na već poznati kinolin, moguće bi bilo dobiti hibride koji bi puno ciljanije djelovali. Tako bismo mogli izbjeći rezistenciju ili toksičnost ovih spojeva, a djelovati na stanične receptore, enzime ili komplekse u replikaciji ili transkripciji, što bi značilo sigurnije i brže liječenje raka.



## 7. Zaključak

- MDCK1 stanice su otpornije na testirane hibride od stanica adenokarcinoma ili leukemije.
- Testirani hibridi kinolina pokazali su citotoksični učinak ovisan o primjenjenoj koncentraciji.
- Među testiranim hibridima kinolina QH3 je pokazao najjači citotoksični učinak.
- QH3 uzrokuje nakupljanje stanica u S fazi staničnog ciklusa, s smanjenim udjelom stanica u G1 fazi.
- MDA-MB-231 stanice su pokazale smanjen udio S faze pod djelovanjem hibrida QH3.

## 8. Sažetak

**Ciljevi:** Cilj je bio odrediti učinak hibrida kinolina na rast normalne stanične linije i tumorskih staničnih linija.

**Nacrt studije:** Eksperimentalni rad

**Materijal i metode:** Učinak hibrida je određen na normalnim (MDCK1) i tumorskim (CaCo-2, MDA-MB-231, CCRF-CEM) stanicama. Citotoksičnost je određena MTT testom nakon 72 sata u rasponu koncentracija od  $1 \times 10^{-4}$  M do  $1 \times 10^{-6}$  M. Kako bismo odredili promjene u staničnom ciklusu nakon djelovanja hibrida nakon 24 sata pod koncentracijom  $5 \times 10^{-6}$  M, koristili smo se protočnom citometrijom.

**Rezultati:** Svi hibridi pokazuju citotoksični učinak na svim staničnim linijama pod koncentracijama  $1 \times 10^{-4}$  i  $1 \times 10^{-5}$  M. MDCK1 stanice su pokazale statističku značajnost samo kod koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M. QH3 je uzrokovao značajne promjene u staničnom ciklusu kod CaCo-2 u G1 fazi, MDA-MB-231 u S fazi i CCRF-CEM i u G1 i S fazi.

**Zaključak:** Učinak testiranih hibrida kinolina ovisan je o primjenjenoj koncentraciji i tipu stanica. MDCK1 stanice su otpornije na djelovanje hibrida od tumorskih stanica. QH3 hibrid je pokazao najveću citotoksičnost. Svi hibridi su djelovali citotoksično, no samo je QH3 uzrokovao promjene u staničnom ciklusu. Hibridi kinolina pokazuju obećavajuće rezultate u liječenju raka, no potrebna je daljnja biološka procjena.

Ključne riječi: molekule kinolina; tumorske stanice; stanični ciklus; stanična kultura

## 9. Summary

### **Effect of hybrids quinoline molecules on the cell cycle of tumour cells *in vitro***

**Objectives:** The aim was to determine the effect of hybrid quinoline molecules on growth of normal cell line and tumour cell lines.

**Study design:** Experimental study

**Materials and methods:** Effect of quinoline hybrids was determined on colon adenocarcinoma (CaCo-2), breast adenocarcinoma (MD-AMB-231), acute lymphoblastic leukemia (CCRF-CEM) cells, and on Madin-Darby Canine Kidney fibroblast-like cells (MDCK1) as normal cells. Cytotoxicity was tested using an MTT assay after 72 hours of incubation with new quinoline hybrids at concentration span from  $1 \times 10^{-4}$  M to  $1 \times 10^{-6}$  M. Flow cytometry was used to determine changes in cell cycle distribution in CaCo-2, MDAMB231 and CCEF-CEM cells treated with  $5 \times 10^{-6}$  M of quinoline hybrids for 24h.

**Results:** Hybrids exhibit cytotoxic effect on all cell lines at concentrations of  $1 \times 10^{-4}$  M and  $1 \times 10^{-5}$  M. MDCK1 cells only showed a statistical significance at a concentration of  $1 \times 10^{-4}$  M. QH3 caused significant changes in cell cycle with CaCo-2 in G1 phase, MDA-MB-231 cells in S phase, and CCRF-CEM in both G1 and S phase.

**Conclusion:** Tested quinoline hybrids showed dose dependent cytotoxic effect on treated cells, which differed between cell lines. MDCK1 cells were more resistant to quinoline hibrids than tumour cells. QH3 hybrid exhibited the highest cytotoxicity. The cytotoxic effect on normal cells was lower than on the tumour cells. All hybrids exhibited cytotoxicity, but only QH3 caused significant changes in the cell cycle. Quinoline hybrids show promising results in cancer treatment but further biological evaluation is required.

Key words: quinoline molecules; tumour cells; cell cycle; cell culture

## 10. Literatura

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, et al. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11, 2013.
2. Cooper GM. Stanica: Molekularni pristup. Treće izdanje, 2004., 29-34; 631-663.
3. Barrett JC. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect*, 1993. Apr; 100: 9–20.
4. Marella A, Tanwar OP, Saha R, Ali MR, Srivastava S, Akhter M, et al. Quinoline: A versatile heterocyclic. *Saudi Pharm J*, 2013 Jan;21(1):1-12.
5. Afzal O, Kumar S, Haider MR, Ali MR, Kumar R, Jaggi M, et al. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. *Eur J Med Chem*, 2015. Jun 5;97:871-910.
6. Abang AM. The clinical pharmacology of topoisomerase I inhibitors. *Semin Hematol*, 1998. Jul;35(3 Suppl 4):13-21.
7. Krstulović L, Stolić I, Jukić M, Opačak-Bernardi T, Starčević K, Bajić M, et al. New quinoline-arylamidine hybrids: Synthesis, DNA/RNA binding and antitumor activity. *Eur J Med Chem*, 2017.
8. Mantu D, Antoci V, Moldoveanu C, Zbancioc G & Mangalagiu II. Hybrid imidazole (benzimidazole)/pyridine (quinoline) derivatives and evaluation of their anticancer and antimycobacterial activity. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016. Jun 2., 31(sup2):96-103.
9. Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*, 2002 Dec 27;181-182:475-81.
10. Baust JM, Buehring GC, Campbell L, Elmore E, Harbell JW, Nims RW. Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2017 Sep;53(8):669-672.

11. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/media-supplements/glutamax-media.html>
12. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.
13. Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016 Jul 1;2016(7).
14. Chu XM, Wang C, Liu W, Liang LL, Gong KK, Zhao CY et al. Quinoline and quinolone dimers and their biological activities: An overview. *Eur J Med Chem.* 2019 Jan 1;161:101-117. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.10.035. Epub 2018 Oct 16.
15. Fernández-Álvaro E, Hong WD, Nixon GL, O'Neill PM, Calderón F, Antimalarial Chemotherapy: Natural Product Inspired Development of Preclinical and Clinical Candidates with Diverse Mechanisms of Action, *J Med Chem.* 2016 Jun 23;59(12):5587-603. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01485. Epub 2016 Feb 9.
16. Bendell JC, Kurkjian C, Infante JR, Bauer TM, Burris HA 3rd, Greco FA et al. A phase 1 study of the sachet formulation of the oral dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 given twice daily (BID) in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs.* 2015 Apr;33(2):463-71. doi: 10.1007/s10637-015-0218-6. Epub 2015 Feb 25.
17. Medema RH, Macurek L. Checkpoint control and cancer. *Oncogene.* 2012 May 24;31(21):2601-13. doi: 10.1038/onc.2011.451. Epub 2011 Oct 3.
18. Darzynkiewicz Z, Halicka HD, Zhao H. Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. *Adv Exp Med Biol.* 2010;676:137–147. doi:10.1007/978-1-4419-6199-0\_9

## 10. Literatura

19. García-Piñeres AJ, Hildesheim A, Williams M, Trivett M, Strobl S, & Pinto LA. DNase treatment following thawing of Cryopreserved PBMC is a procedure suitable for lymphocyte functional studies. *J Immunol Methods*. 2006 Jun 30;313(1-2):209-13. Epub 2006 May 17.

20. Iyer DR, Rhind N. The Intra-S Checkpoint Responses to DNA Damage. *Genes (Basel)*. 2017;8(2):74. Epub 2017 Feb 17. doi:10.3390/genes8020074

## 11. Životopis

Bruno Rugani rođen je 30. srpnja 1997. godine u Varaždinu. Pohađao je VI. osnovnu školu Varaždin, a 2012. upisuje Graditeljsku, prirodoslovnu i rudarsku školu. 2016. godine upisuje studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Od 2001. do 2010. pohađa dječji zbor „Varaždinski Štigleci“. 2011. upisuje solfeggio i klavir u Glazbenoj školi Varaždin. Dvije godine pohađa Školu stranih jezika Šimunić. Sudjelovao kao predstavljac na Petom međunarodnom Chohnoky simpoziju sveučilišta u Pečuhu 2019.