

Proapoptotički učinci derivata kumarina in vitro

Pnjak, Luka

Master's thesis / Diplomski 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:300410>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE**

Luka Pnjak

**PROAPOPTOTIČKI UČINCI
DERIVATA KUMARINA *IN VITRO***

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE**

Luka Pnjak

**PROAPOPTOTIČKI UČINCI
DERIVATA KUMARINA *IN VITRO***

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren u: Laboratoriju za kulturu stanica i tkiva pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu i Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju na Medicinskom fakultetu Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

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

Rad ima 32 lista i 7 slika.

Sadržaj:

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Kumarinski spojevi | 1 |
| 1.1.1. Kumarini..... | 1 |
| 1.1.2. Derivati kumarina i biološka aktivnost..... | 2 |
| 1.1.3. Protutumorsko djelovanje kumarina..... | 3 |
| 1.1.4. Apsorpcija i distribucija kumarina | 3 |
| 1.1.5. Metabolizam kumarina..... | 4 |
| 1.2. Apoptoza | 4 |
| 1.2.1. Kaspaze | 5 |
| 1.3. Autofagija | 6 |
| 2. HIPOTEZA | 7 |
| 3. CILJ | 8 |
| 4. MATERIJALI I METODE | 9 |
| 4.1. Materijali | 9 |
| 4.1.1. Ispitivani derivati..... | 9 |
| 4.1.2. Stanične linije | 9 |
| 4.2. Metode | 10 |
| 4.2.1. Uzgoj i održavanje stanica | 10 |
| 4.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi | 10 |
| 4.2.3. Određivanje apoptoze protočnim citometrom..... | 11 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.2.4. | Određivanje autofagije protočnim citometrom | 11 |
| 4.2.5. | Statistička obrada podataka..... | 12 |
| 5. | REZULTATI | 13 |
| 5.1. | Određivanje apoptotičkog učinka na HeLa i MCF-7 stanicama | 13 |
| 5.2. | Određivanje autofagije na HeLa i MCF-7 stanicama..... | 17 |
| 6. | RASPRAVA | 20 |
| 7. | ZAKLJUČAK | 22 |
| 8. | SAŽETAK | 23 |
| 9. | SUMMARY | 24 |
| 10. | LITERATURA | 25 |
| 11. | ŽIVOTOPIS | 27 |

1. UVOD

1.1. Kumarinski spojevi

1.1.1. Kumarini

Kumarin ili 2*H*-kromen-2-on heterociklički je aromatski kemijski spoj, široko rasprostranjen u prirodi. Sastoji se od kondenziranog benzenskog i pironskog prstena te sadrži dva kisikova atoma kao heteroatome, a strukturno spada u skupinu benzopirona. Takva građa omogućuje mu šest slobodnih položaja na kojima se može vršiti supstitucija. Poznato je mnoštvo derivata kumarina, prirodnih i sintetičkih, a zahvaljujući upravo toj strukturnoj raznolikosti imaju veliku biološku aktivnost. Velika razlika u strukturi unutar obitelji ovih spojeva dovela je do podjele kumarina u skupine, od jednostavnih do vrlo složenih, kao što su furokumarini i piranokumarini.

Prvo zanimanje za kumarin započinje prije nešto manje od 200 godina, kada je prvi puta izoliran iz biljke tonovac (*Coumarouna odorata* Aube; *Dipteryx odorata*) (1). Najviše se pronalazi u biljkama i voću kao što su marelice, jagode, višnje te u začinskom bilju poput lavande i cimeta, ali postoji i u nekim mikroorganizmima i životinjskim vrstama (2). Mnogi autori navode kako je kumarin izuzetno ugodna mirisa koji podsjeća na vaniliju ili pokošeno sijeno (3).

Kumarin nalazi široku primjenu u raznim granama prehrambene industrije, kozmetike, duhanske industrije, itd. Koristi se i u proizvodnji guma i plastike, a u nekim je državama i zabranjen kao dodatak hrani zbog svog toksičnog djelovanja na jetru i bubrege ili je upotreba uređena pravilnicima od LD₅₀= 275 mg/kg (eng. *Lethal dose*, hrv. Letalna doza) (2). Ipak, kumarini pokazuju mnoge dobre učinke u našem tijelu. Djeluju protuupalno, antipiretski, antioksidativno, antibakterijski, antifungalno i antitumorski. Zbog svoje sličnosti vitaminu K, kumarin se koristi i u antikoagulativnoj terapiji, ali isto tako i u terapiji alergija, i Alzheimerove bolesti (AD) (4).

1.1.2. Derivati kumarina i biološka aktivnost

Kroz povijest je vidljiva velika upotreba kumarina u medicini, stoga je razumljivo i sve veće zanimanje za sintezu novih derivata koji bi bili što učinkovitiji u borbi s modernim bolestima. S vremenom je provedeno sve više istraživanja i proizvedeno mnoštvo novih lijekova s kumarinskom jezgrom.

Jedni od poznatijih prirodnih kumarina su dikumaroli koji nastaju zagrijavanjem kumarina. Oni pokazuju jaka antikoagulacijska svojstva zbog strukture slične vitaminu K te zbog toga dolazi do kompetitivne inhibicije u sintezi protrombina. Dikumaroli nisu jedini s antikoagulacijskim svojstvima. Varfarin također ima veliku ulogu u antikoagulantnoj terapiji, a potiče od 4-hidroksikumarina. Koriste se u terapijske svrhe, ali i u tubicama i vrećicama za skupljanje krvi dobrovoljnih davatelja kako bi spriječili zgrušavanje. Nadalje, skopoletin, kumarin dobiven iz biljke *Erycibe obtusifolia*, pokazuje značajna antibakterijska svojstva, a najveću aktivnost ima u regulaciji krvnog tlaka. Eskulin, još jedan kumarin dobiven iz prirode je glikozidni kumarin dobiven iz ploda kestena, a koristi se u lijekovima za tretiranje hemoroida jer pokazuje velik utjecaj na krvne žile (5).

Mnoga istraživanja provode se na kumarinima koji su sintetizirani u laboratorijima kako bi se što prije pronašli odgovori na probleme današnje medicine. Zanimljivo je istaknuti da mnogi novosintetizirani kumarini pokazuju jako dobro, neki čak izvrsno djelovanje na bakterije kao što su *S. aureus* i *E. coli* u usporedbi s trenutno korištenim antibioticima. Ove znanstvene spoznaje vrlo su važne s obzirom na sve veću otpornost mikroorganizama na trenutno korištene antibiotike u humanoj i veterinarskoj medicini. Također, istraženo je da neki derivati kumarin djeluju antifungalno, i to protiv najpoznatijih gljivica kao što su *C. albicans*, *A. Niger* i *A. flavi*. (6).

Upalni procesi mogu biti pokazatelji mnogo težih stanja od samih upala kao što su reumatoidni artritis i neke autoimune bolesti. U suzbijanju upala danas se koriste nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAIDs ; eng. *Non-steroidal anti-inflammatory drugs*). No, ova vrsta lijekova ima jednu manu, a to je gastrična intolerancija. Vrlo često izazivaju upale želučane ovojnice, krvarenja i čireve. Kako bi ih zamijenili, znanstvenici pokušavaju dokazati učinkovitost derivata kumarina na upalna stanja (7). U tim studijama

primijećeno je da kumarini imaju najveću protuupalnu aktivnost kada im se uvede aromatska skupina na poziciju 3 kumarinske jezgre. Kao najbolja u ovom slučaju pokazao se 2-benzimidazolni supstituent koji se već nalazi u mnogim dostupnim protuupalnim lijekovima, a uvođenjem kumarinske jezgre štetni učinci potpuno su uklonjeni (7).

Jedna od najzanimljivijih aktivnosti spojeva sintetiziranih na bazi kumarina svakako je aktivnost usmjerena protiv bolesti mozga. Alzheimerova demencija (AD) je progresivni degenerativni poremećaj mozga, a povezana je sa smanjenom razinom acetilkolina u dijelovima mozga koji su odgovorni najviše za procese pamćenja i ponašanja. Ne postoji lijek koji bi izliječio AD, ali postoji simptomatska terapija koja se temelji na inhibiciji enzima acetilkolinesteraze koja hidrolizira acetilkolin. Ovdje svoju ulogu nalazi kumarinski spoj skopoletin koji je već u fazi ispitivanja kao potencijalni lijek za AD (8).

1.1.3. Protutumorsko djelovanje kumarina

Protutumorski lijekovi već dugu niz godina imaju samo jednu zadaću - uništiti tumorsku stanicu. Naime, kako se ona dijeli velikom brzinom, zadatak je protutumorskih lijekova utjecati na proces dijeljenja, odnosno širenja tumora po tijelu. Ti lijekovi, iako učinkoviti, imaju visoku citotoksičnost koja razara cijeli organizam, a ponajviše hematopoetske stanice. Dobar terapijski učinak najčešće se postiže kombinacijom više različitih lijekova koji svojim doziranjem imaju manje nuspojave i tako podržavaju ponovnu proliferaciju zdravih stanica, ali ne i tumorskih. Trenutno najbolje rezultate pokazuje kombinacija kemoterapije, zračenja i operativnog zahvata (9).

Tumorske bolesti predstavljaju jedan od najvećih problema svjetske medicine u 21. stoljeću. Veliki broj istraživanja pokazuje da kumarin i 7-hidroksikumarin imaju inhibicijsko djelovanje na proliferaciju mnoštva ljudskih tumorskih staničnih linija, ali i nekih životinjskih tumora (9). Uz to, znanstvenici rade na otkrivanju utjecaja derivata kumarina na ostale stanične mehanizme koji bi imali utjecaja na uništenje malignih stanica ili barem prestanak njihovog dijeljenja (10).

1.1.4. Apsorpcija i distribucija kumarina

Najčešći put unosa kumarina je preko usta. Jednom kada uđu u organizam brzo su apsorbirani i distribuirani po cijelom tijelu. S obzirom da kumarini nisu dobro topivi u vodi,

smatra se kako neće imati dobru biološku dostupnost *in vivo*. Ipak, većina spojeva ima visok koeficijent raspodjele, što se smatra presudnim za apsorpciju tvari koje se nalaze u vodenoj otopini. Visok koeficijent raspodjele i nepolarnost molekule kumarina ide u prilog tome da će kumarini prolaziti lipidni dvosloj bez poteškoća, odnosno, pasivnom difuzijom. Farmakokinetičke studije pokazuju kako su kumarini nakon oralnog unosa potpuno apsorbirani iz gastrointestinalnog trakta i metabolizirani u jetri te u krv dolazi oko 2-6% nepromijenjenih molekula (9).

1.1.5. Metabolizam kumarina

Kumarini farmakolozi već dugi niz godina služe kao odličan model za proučavanje složenog metabolizma jednostavnih molekula. Za taj metabolizam zaslužna je superobitelj jetrenih enzima CYP450 (CYP- eng. *cytochrome*). CYP obitelj sastoji se od velikog broja mikrosomalnih hemoproteina koji kataliziraju oksidativni, peroksidativni i redukcijski metabolizam velikog broja tvari, pa tako i kumarina.

Kumarini se prvo metaboliziraju pomoću posebnog citokrom P450 enzima (CYP2A6) u jetrenim mikrosomima. Taj enzim omogućuje brzu hidroksilaciju kumarina u 7-hidroksikumarin. Nakon toga se 7-hidroksikumarin konjugira s glukoronidom. S obzirom da molekule kumarina imaju veći broj reaktivnih veznih mjesta, hidroksilacija je moguća na atomima ugljika broj 3,4,5,6,7, ali ona se najčešće događa na 3. i 7. mjestu. Kada se dogodi na trećem ugljikovom atomu, prsten se otvara te nastaju dva nova produkta, o-hidroksifenillaktatna kiselina i o-hidroksifenilacetatna kiselina. Iako je 7-hidroksikumarin najvažniji produkt metabolizma kumarina, mogući su i drugi produkti, pa njihovu važnost ne treba zanemariti (9).

1.2. Apoptoza

Programirana smrt stanice ili apoptoza, fiziološki je proces u ljudskom tijelu koji se dnevno događa nekoliko milijuna puta. To je proces koji ima ključnu ulogu, kako u embrionalnom razvoju, tako i tijekom cijelog života. Svakodnevno u ljudskom tijelu se pomoću apoptoze uklanja velik broj stanica. Kako bi održali normalan rast i razvoj tkiva, apoptoza i dijeljenje stanica moraju biti u ravnoteži. Postoji više razloga zbog kojih se javlja programirana smrt stanice. Pomoću ovog procesa, tijelo na siguran način uklanja stanice koje su oštećene ili potencijalno opasne kao što su tumorske stanice ili stanice zaražene virusom. Također, i

oštećenja DNK ili štetne mutacije pobudit će razne enzime odgovorne za apoptozu. Poznato je da tijekom embrionalnog razvoja programirana smrt ima ključnu ulogu, od formiranja prstiju na rukama do razvoja složenog živčanog sustava (11).

Dok se kod slučajne smrti stanice, koja je najčešće uzrok akutne ozljede, javlja upalni proces, kod apoptoze to nije slučaj. Naime, prilikom slučajne smrti, stanica puca i sav se sadržaj izljeva u međustanični prostor te uzrokuje upalu. Tijekom apoptoze, kromatin se kondenzira i jezgra se raspada u male komadiće. Na kraju se cijela stanica skvrči i raspadne u male komadiće okružene membranom koje nazivamo apoptotičkim tjelešcima koja razlažu makrofagi (10,11).

1.2.1. Kaspaze

Proteaze su enzimi koji kataliziraju proteolizu, odnosno kataboliziraju razgradnju proteina, hidrolizom peptidnih veza. U ovu veliku obitelj enzima spadaju i kaspaze koje sudjeluju u procesu apoptoze. Kaspaze na svojim aktivnim mjestima imaju cisteinske ostatke i svoj proteinski susstrat kidaju na aspartatnim ostacima. Za svoj glavni cilj, kaspaze imaju brojne stanične proteine kao što su npr. inhibitoriu DNaze, koji je u svom aktivnom obliku odgovoran za fragmentaciju jezgrine DNK. Nadalje, kaspaze mogu razoriti jezgrinu laminu, što kao rezultat ima fragmentaciju jezgre i citoskeletnih proteina. To u konačnici dovodi do potpunog uništenja oštećene stanice.

Do sada je otkriveno 14 vrsta kaspaza u sisavaca. Dijele se na one koje su potrebne za dozrijevanje citokina (kaspaza 1, 4 i 5) i one koje izravno sudjeluju u procesu apoptoze. Kaspaze koje sudjeluju u apoptozi dalje se dijele prema strukturnim i funkcijskim obilježjima na inicijacijske (kaspaze 8, 9 i 10) i izvršne (kaspaze 3, 6 i 7). U mnoštvu kaspaza, najveću ulogu ima kaspaza 9. Kako bi se ograničila njena aktivnost, pohranjena je u citosolu u obliku zimogenih zrnaca. Aktivirati se može samo pomoću citokroma c koji je pohranjen u membrani mitohondrija te se otpušta u stanicu samo tijekom oštećenja što i je okidač za početak apoptoze. Citokrom c se tada veže na Apaf-1 (eng. *Apoptotic protease activating factor 1* (8); hrv. Aktivacijski faktor apoptotičke proteaze), a Apaf-1 s kaspazom-9 tvori kompleks koji se naziva apoptosom. Kaspaza-9 potom kida i aktivira ostale nizvodne izvršne kaspaze, poput kaspaze-3 i -7, što u konačnici dovodi do smrti stanice (11).

1.3. Autofagija

Fagocitoza je dobro istražen proces u kojem specijalizirane stanice (makrofagi) razgrađuju velike čestice kao što su bakterije, stanični debris i druge dotrajale stanice koje se trebaju ukloniti iz tijela. Makrofagi se potom spajaju s lizosomom koji probavljaju njihov sadržaj. Lizosomi su također odgovorni i za razgradnju u procesu autofagije. Pojam autofagija znači „jesti samu sebe“, što i objašnjava cijeli proces autofagocitoze. Ovaj proces pomaže razgradnju dotrajalih unutarstaničnih komponenti, kao što su ribosomi, mitohondriji, itd. Tri su definirane vrste autofagocitoze: makro-autofagocitoza, mikro-autofagocitoza i autofagocitoza pomognuta šaperonima. Makro-autofagija, najčešći proces na koji se misli kada se kaže autofagija, proces je razgradnje u kojemu se citosolna komponenta dovodi do lizosoma pomoću vezikula (autofagosom) koji se spaja s lizosomom i tvori autolizosom. Kod mikro-autofagije, lizosom sam uvlači dotrajalu komponentu tako što je okruže svojom membranom. Obje vrste autofagocitoze mogu razgraditi vrlo velike čestice. U autofagiji pomognutoj šaperonima, ciljani proteini koji trebaju razgradnju prenose se po lizosomalnoj membrani pomoću šaperona koje prepoznaje receptor na lizosomalnoj membrani, što dovodi do razmatanja ciljanih proteina i konačnog uništenja stanice (12).

2. HIPOTEZA

Polazna prepostavka je da derivati kumarina imaju proapoptotički učinak na stanice karcinoma vrata maternice i adenokarcinoma dojke *in vitro*.

3. CILJ

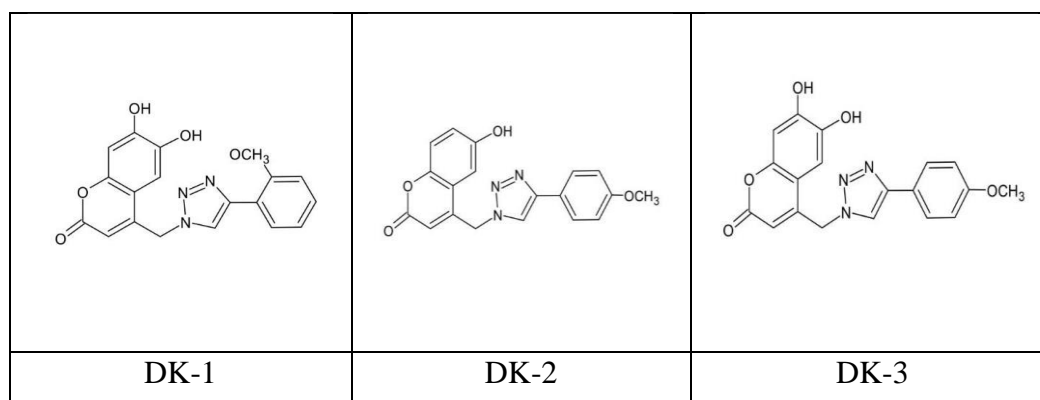
Cilj ovog istraživanja je ispitati proapoptotički potencijal derivata kumarina na tumorskim stanicama.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Ispitivani derivati

Ispitivani spojevi derivata 6,7-dihidroksikumarina, DK1, DK2 i DK3, sintetizirani su i pripremljeni na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije pri Zavodu za organsku kemiju, na Sveučilištu u Zagrebu. Testirani derivati otopljeni su u DMSO-u (99,8% dimetilsulfoksid, Acros organics; New Jersey, SAD) u koncentraciji od 1×10^{-2} mol/L (M).



Slika 1: Prikaz strukture kumarinskih derivata

4.1.2. Stanične linije

Proapoptotički utjecaj derivata kumarina ispitan je na humanim staničnim linijama karcinoma grlića maternice (HeLa; ATCC[®] CCL-2[™]) i adenokarcinoma dojke (MCF-7; ATCC[®] HTB-22[™]).

4.2. Metode

4.2.1. Uzgoj i održavanje stanica

Stanice karcinoma (HeLa i MCF-7) kultivirane su u bocama za uzgoj stanica u monosloju površine 25cm² i 75cm², tretirane za maksimalno prijanjanje stanica za površinu. Stanice su uzgojene u bazičnom DMEM mediju s visokim udjelom glukoze (4.5 g/L) i L-glutaminom, kompletiran s 10% FBS, (Capricorn Scientific GmbH, Slough, Velika Britanija). Bočice sa stanicama kultivirane su u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s kontroliranom atmosferom uz 5 % CO₂ i temperaturu od 37°C.

Kultivacija HeLa i MCF-7 stanica u kulturi postiže se odvajanjem stanica od podloge pod djelovanjem enzima tripsina (Trypsin/EDTA, tripsin 0.25%, 1 mM EDTA-Na₄ u HBSS, s phenolred, Panbiotech GmbH, Aidenbach, Njemačka). Odvojene stanice od podloge u svježem mediju koristile su se za daljnju kultivaciju staničnih linija ili za eksperimentalni dio rada.

4.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi

Broj stanica u kulturi određen je brojanjem živih stanica u Bürker-Türkerovoj komorici. stanice su obojane tripan plavilom (Tripan plavilo 0.4%, 0.8 % NaCl, sterilno filtriran, Lonza; Basel, Švicarska), bojom pomoću koje se razlikuju žive od mrtvih stanica. Stanice koje su se obojale tripankim plavilom, predstavljaju mrtve stanice, dok žive stanice ostaju nebojene zbog aktivnog izbacivanja boje. Stanice se broje pod invertnim mikroskopom (Zeiss, Axiovert 25, Njemačka). Konačan broj stanica izračunat je prema dolje navedenoj formuli.

$$\frac{N*3}{4} = x * 10^4 \text{ stanica/mL}$$

Objašnjenje formule: N - broj izbrojanih stanica u komoricama, broj 4 - broj polja u komorici, a 3 - faktor razrjeđenja.

4.2.3. Određivanje apoptoze protočnim citometrom

Prisutnost apoptotičkih stanica određena je pomoću aneksina V i propidij jodida, i to metodom protočne citometrije. Aneksin A5 ili aneksin V protein je koji pripada proteinima ovisnim o kalciju koji vežu fosfolipide (13). U našem slučaju veže se za fosfatidil serin (PS). U zdravim se stanicama PS normalno nalazi s unutarnje strane stanične membrane, dok se u apoptozi translocira na vanjsku stranu. Pozicioniran na vanjskoj strani stanične membrane omogućeno je vezanje aneksina V na PS. Upravo zato je ova metoda superiornija nad ostalima jer detektira apoptozu u najranijim počecima.

Postupak:

MCF-7 i HeLa stanice nasađene su u koncentracijama od 3×10^5 stanica u ukupnom volumenu od 3 mL po jažici. Stanice su ostavljene u CO₂ inkubator preko noći kako bi se prihvatile za podlogu. Nakon što su se stanice prihvatile za podlogu tretirane su s kumarinskim derivatima (DK 1, DK 2 i DK 3) u koncentraciji od 1×10^{-5} M kroz 24 sata. Za pozitivnu kontrolu stanice su tretirane s doksorubicinom u koncentraciji od 5×10^{-6} M. Po isteku vremena inkubacije stanice s derivatom stanice su odvojene od podloge i prikupljene u falkonicama. Stanice su centrifugirane šest minuta, pri 1100 o/min, na sobnoj temperaturi te isprane sa PBS-om. Stanice su prebačene u tubice za protočnu citometriju i obojane s Aneksinom V i propidij jodidom prema uputama proizvođača za (Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit, Abcam, Cambridge, UK). Stanice su analizirane na protočnom citometru (BD FACSCanto, BD Biosciences, Češka), a rezultati su analizirani programom FlowJo 7.2.5. (Trestar, SAD).

4.2.4. Određivanje autofagije protočnim citometrom

Određivanje stupnja autofagije detektiramo pomoću mjerenja količine stvorenih autolizosoma, organela koji su egzekutori autofagije. Naime, pH osjetljiva boja, Acridine Orange, boja DNK i citoplazmu svijetlozeleno, ali ulazi i u autolizosome te zbog niskog pH mijenja boju u crveno. Jačina boje koju tada emitiraju autolizosomi proporcionalna je njihovoj kiselosti te je tada moguća detekcija protočnim citometrom (14).

Postupak:

U detekciji autofagije korištene su MCF-7 i HeLa stanice u koncentraciji od 3×10^5 stanica u volumenu od 3 mL po jažici. Nakon nasadivanja stavljene su u CO₂ inkubator na 24 sata. Potom su tretirane kumarinskim derivatima (DK 1, DK 2 i DK 3) u koncentraciji od 1×10^{-5} M kroz 24 sata. Nakon završetka inkubacije stanice su odvojene od podloge i prebačene u falkonice te centrifugirane na 1100 o/min kroz šest minuta. Odliiven je supernatant i stanice su resuspendirane u PBS-u. Pred samu analizu na protočnom citometru stanice su obojane s Acridin Orange bojom u koncentraciji 1 µg/ml na 37°C kroz 30 minuta u mraku. Stanice su isprane u PBS-u i analizirane na protočnom citometru (BD FACSCanto, BD Biosciences, Češka), a rezultati su analizirani programom FlowJo 7.2.5. (Trestar, SAD).

4.2.5. Statistička obrada podataka

Podatci aktivacije apoptoze i autofagije prikazani su kao postotak populacije i koeficijent varijacija (CV) pomoću statističke funkcije za analizu podataka i obrade rezultata protočne citometrije u FlowJo programu. Statistička analiza podataka određena je u XLSTAT 2019 programu, ANOVA testom s Dunnettovim korekcijama. Razina statističke značajnosti određena je kao $p < 0,05$.

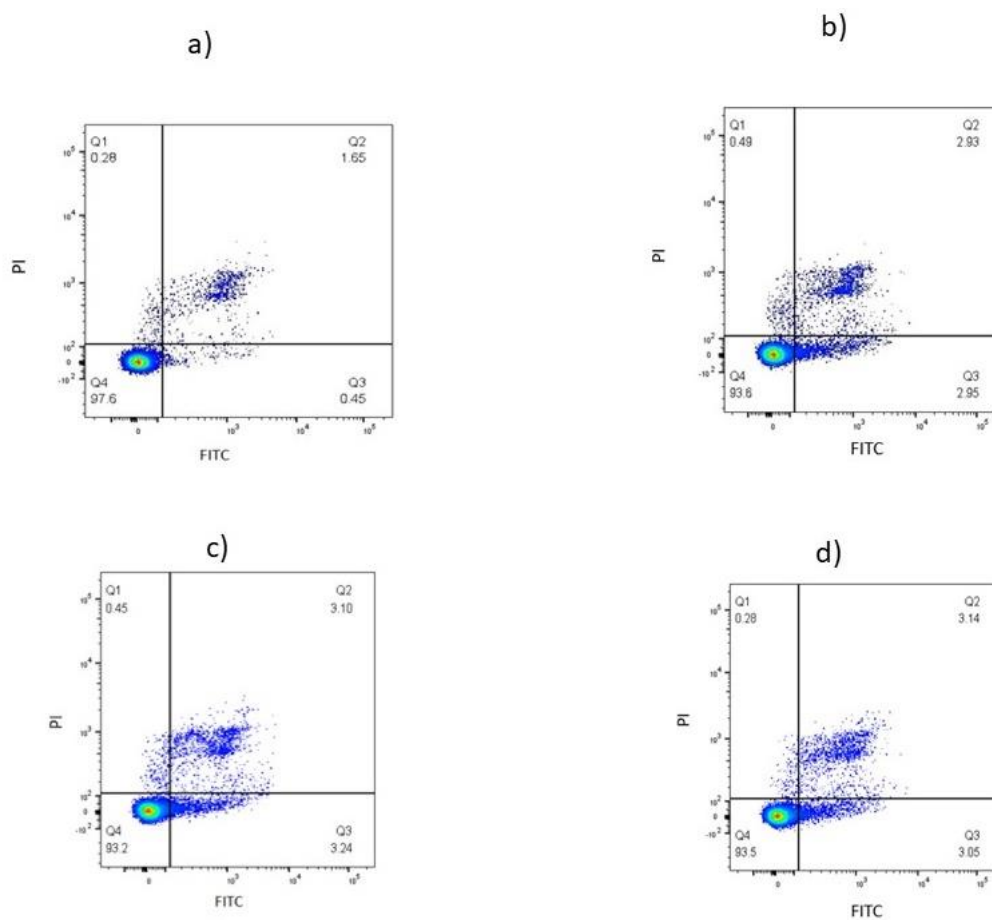
5. REZULTATI

5.1. Određivanje apoptotičkog učinka na HeLa i MCF-7 stanicama

Apoptotički učinak derivata kumarina ispitan je na dvije stanične linije, HeLa i MCF-7. Stanice su bile izložene koncentraciji derivata od 1×10^{-5} M. Rezultati apoptoze s protočne citometrije prikazani su histogramskim i grafičkim prikazom (slike 2, 3, 4 i 5).

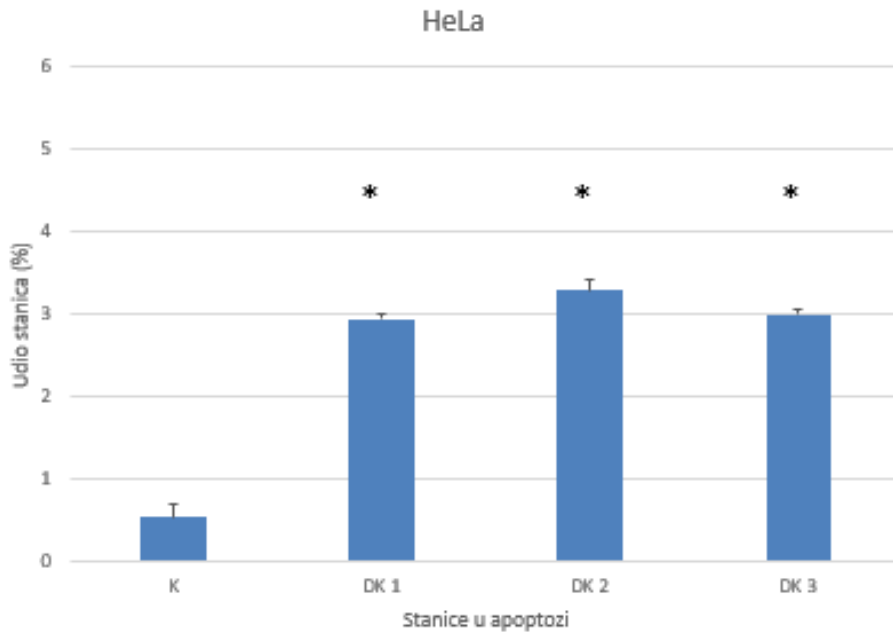
Dobiveni rezultati apoptotičkog djelovanja kumarina na HeLa stanicama prikazuju aktivaciju apoptoze u tretiranim stanicama.

Derivat kumarina DK3 potiče apoptozu u 2,4 % više HeLa stanica u odnosu na kontrolne stanice s 1% više stanica u nekrozi ili kasnoj apoptozi. Derivat DK1 pokazuje podjednak učinak kao i DK3 nakon izloženosti u koncentraciji od 1×10^{-5} M u trajanju od 24 sata. Najbolji apoptotički učinak na HeLa staničnoj liniji imao je derivat kumarina DK2. U odnosu na kontrolne stanice 2,7% više stanica je u apoptozi nakon djelovanja DK2, s 1% više stanica u nekrozi ili kasnoj apoptozi. Svi testirani derivati prikazuju statističku značajnost s podjednakim postotnim učinkom na aktivaciju apoptoze u HeLa stanicama.



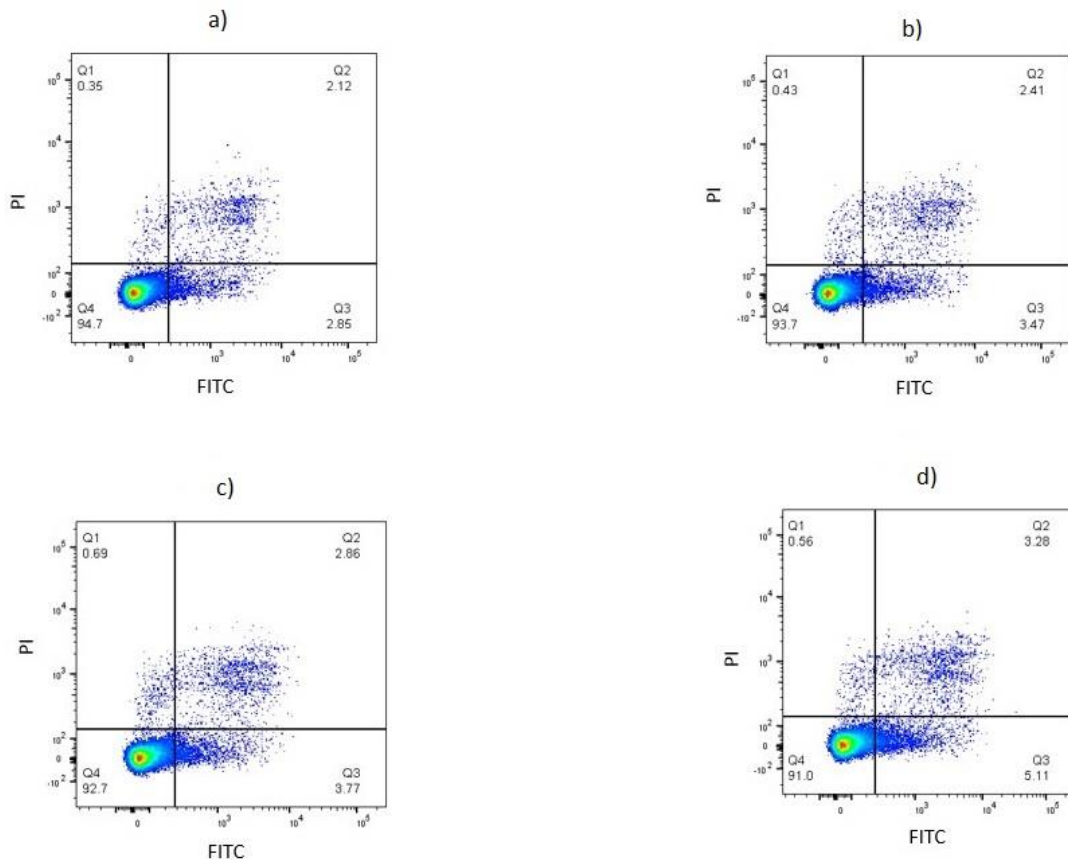
Slika 2: Histogramski prikaz djelovanja kumarinskih derivata na aktivaciju apoptoze u HeLa stanicama. Slika prikazuje a) kontrolne stanice, b) stanice tretirane sa DK 1, c) stanice tretirane s DK 2 i d) stanice tretirane sa DK 3. Kvadranti na histogramu predstavljaju žive stanice (Q4), stanice u apoptozi (Q3) i stanice u nekrozi (Q2).

Rezultati

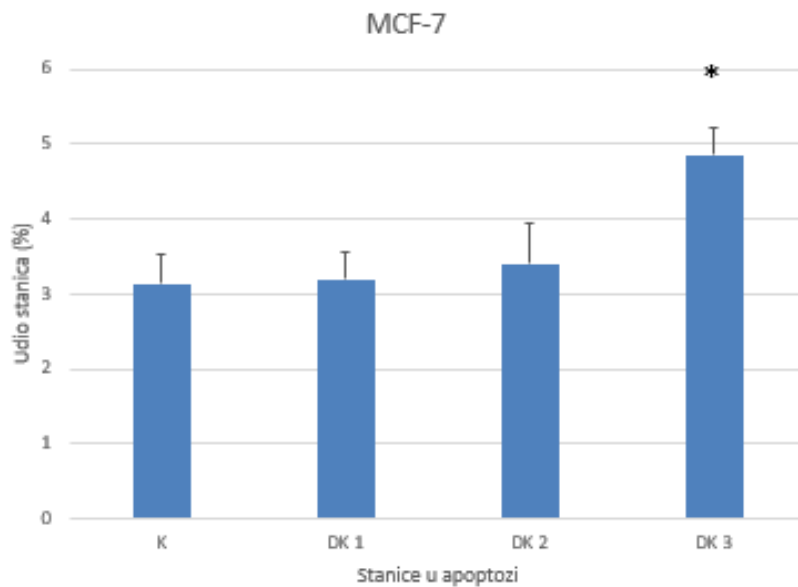


Slika 3: Apoptotički učinak kumarinskih derivata DK 1, DK2 i DK 3 na HeLa staničnu liniju. Stanice su izložene djelovanju derivata kroz 24 sata pri koncentraciji od 1×10^{-5} M. Apoptotički učinak određen je protočnim citometrom. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05$ (*) u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

Najslabiji apoptotički učinak na MCF-7 staničnu liniju u odnosu na kontrolne stanice imao je derivat DK1. U usporedbi s kontrolom, u tretmanu s derivatom DK1 samo je 0,06% više stanica otišlo u apoptozu i 0,13% više u nekrozu ili kasnu apoptozu. Derivat DK2 bilježi 0,26% više stanica u apoptozi i 0,53% više stanica u nekrozi ili kasnoj apoptozi u odnosu na kontrolne stanice. Statistički značajan apoptotički učinak na MCF-7 staničnu liniju imao je kumarinski derivat DK3 s 1,72% boljim rezultatom od kontrolnih stanica, dok je u nekrozu ili kasnu apoptozu ušlo 1,03% više stanica.



Slika 4: Histogramski prikaz djelovanja kumarinskih derivata na aktivaciju apoptoze u MCF-7 stanicama. Slika prikazuje a) kontrolne stanice, b) stanice tretirane sa DK 1, c) stanice tretirane s DK 2 i d) stanice tretirane sa DK 3. Kvadranti na histogramu predstavljaju žive stanice (Q4), stanice u apoptozi (Q3) i stanice u nekrozi (Q2).



Slika 5: Apoptotički učinak kumarinskih derivata DK 1, DK2 i DK 3 na MCF-7 staničnu liniju. Stanice su izložene djelovanju derivata kroz 24 sata pri koncentraciji od 1×10^{-5} M. Apoptotički učinak određen je protočnim citometrom. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05(*)$ u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

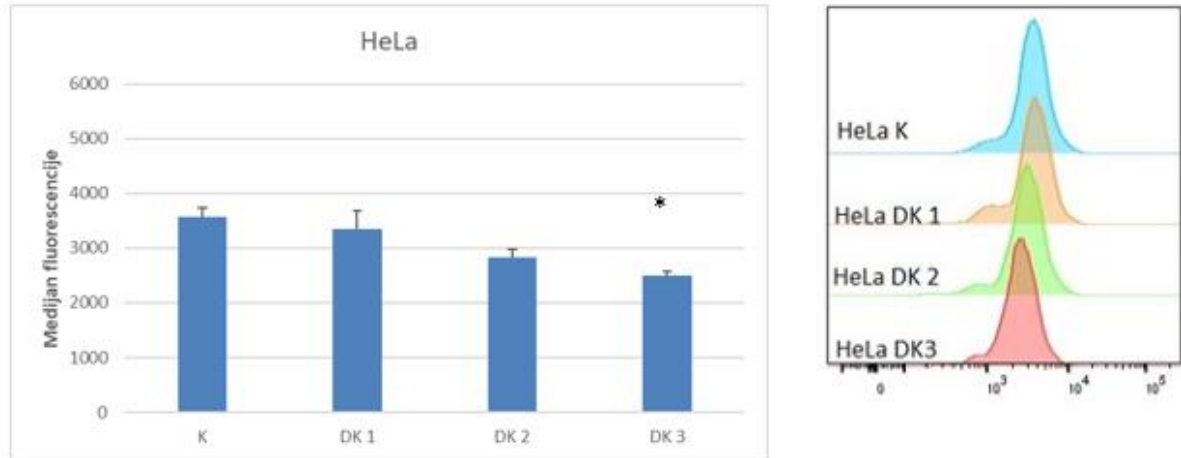
5.2. Određivanje autofagije na HeLa i MCF-7 stanicama

Utjecaj derivata kumarina DK1, DK2 i DK3, ispitan je na HeLa i MCF-7 staničnim linijama. Stanice su bile izložene derivatima u koncentraciji od 1×10^{-5} M kroz 24 sata. Analizirane stanice bojane su Acridine Orange bojom koja boja lizosome u crveno i pri tome fluorescira. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je količini lizosoma, odnosno količini stanica koje su započele proces autofagije.

Mjerenjem intenziteta fluorescencije u HeLa stanicama tretiranim s DK1, DK2 i DK3 vidljiva je smanjena fluorescencija u odnosu na kontrolne netretirane stanice. ANOVA test s Dunnett korekcijama pokazao je statističku značajnost jedino u slučaju tretmana s derivatom DK3 (Slika 6).

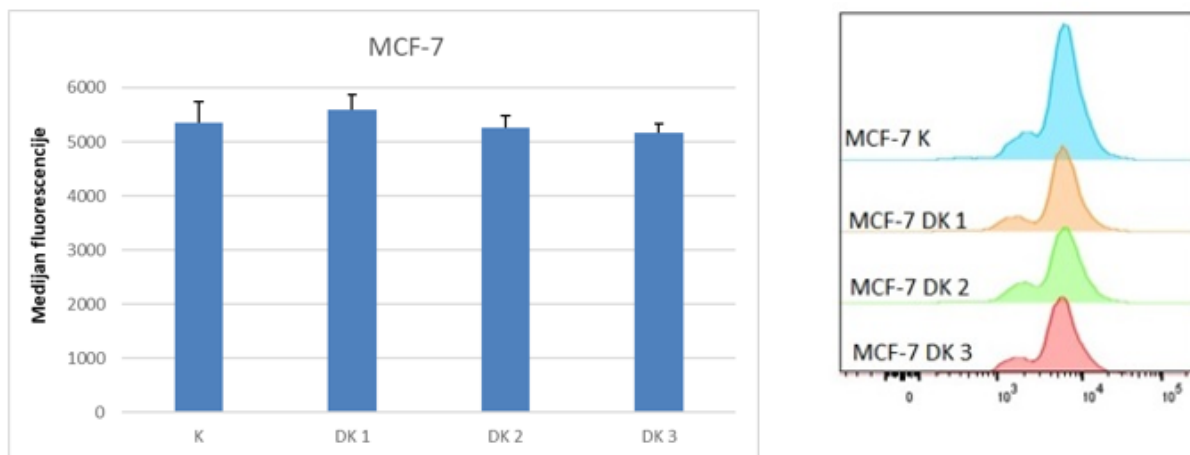
Rezultati

Derivat DK1 djelovao je na blago povećanje fluorescencije u MCF-7 stanicama u odnosu na kontrolne stanice. Djelovanje derivata DK2 i DK3 odrazilo se u smanjenoj fluorescenciji u odnosu na kontrolne stanice. Nije utvrđena statistička značajnost u tretiranim stanicama.



Slika 6: Utjecaj derivata kumarina na aktivaciju autofagije na HeLa staničnoj liniji. Stanice su izložene djelovanju derivata kumarina DK1, DK2 i DK3 kroz 24 sata. Aktivacija autofagije izmjerena je protočnim citometrom. Statistički značajna p vrijednost definirana je p < 0,05(*) u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

Rezultati



Slika 7: Utjecaj derivata kumarina na aktivaciju autofagije na MCF-7 staničnoj liniji. Stanice su izložene djelovanju derivata kumarina DK1, DK2 i DK3 kroz 24 sata. Aktivacija autofagije izmjerena je protočnim citometrom. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05(*)$ u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

6. RASPRAVA

Tumori svih vrsta predstavljaju jedan od gorućih problema medicine 21. stoljeća. Predviđanja svjetskih znanstvenika i Svjetske Zdravstvene Organizacije govore kako će 2030. godine od raka umrijeti 13 milijuna ljudi (15). Rak dojke glavni je uzrok smrti kod žena u ekonomski razvijenim sredinama. Iako se svakodnevno vrše napori kako bi se pronašlo rješenje ovog problema, i dalje se ne uspijeva pronaći dovoljno dobar lijek. Trenutno najbolji izbor u liječenju raka jest kombinacija kemoterapije, radioterapije i operativnog zahvata. Najveći problem kemoterapije je njezina citotoksičnost koja uzrokuje brojne nuspojave (16). Prema nekim autorima svakodnevno u naš organizam hranom unosimo oko jedan gram različitih biološki aktivnih spojeva na bazi benzopirona (9). Isto tako, brojna istraživanja pokazuju široki spektar mehanizama protutumorskog djelovanja kumarina s blagim ili nikakvim nuspojavama (17). Neki od mehanizama djelovanja derivata kumarina su inhibicija aktivnosti protein kinaze, inhibiranje enzima telomeraze, smanjenje regulacije onkogene ekspresije i indukciju kaspaze 9 (18). Jedan od mehanizama protutumorskog djelovanja svakako je i aktivacija apoptoze. Apoptoza je iznimno važan fiziološki proces u kojem organizam sam ciljano uništava stanice koje više nisu „zdrave“. Dokazano je da kumarini mogu aktivirati apoptozu u stanicama i tako dovesti do njenog uništenja (10).

U ovom radu istražen je mehanizam djelovanja kumarinskih derivata koji su pokazali u prethodnim istraživanjima značajan citoskični učinak na tumorske stanice *in vitro* tako da je praćen učinak testiranih spojeva na aktivaciju apoptoze i autofagije u stanicama raka vrata maternice (HeLa) i raka dojke (MCF-7).

Prilikom testiranja indukcije apoptoze utvrđeno je da derivati kumarina nakon 24 sata izlaganja stanica izazivaju apoptozu u tretiranim tumorskim stanicama za oko 3% u odnosu na kontrolne netretirane HeLa stanice. Kod tretiranih MCF-7 stanica uočeno je da je jedino DK3 imao značajnije promjene s 2% većom aktivacijom apoptoze od kontrolnih stanica. Možemo zaključiti kako u ovom procesu važnu ulogu imaju koncentracija kumarina kojom će se stanice tretirati, tretirana vrsta tumorskih stanica i supstituente kumarina na osnovnom lancu, ali isto tako i vrijeme izlaganja tumorskih stanica testiranim spojevima (19). Mnogi autori prikazuju različite derivate kumarina kao aktivatore apoptoze. Najveću priliku u novoj protutumorskoj

terapiji vide u apoptozi jer je bezbolan i normalan fiziološki proces, a kumarini su jeftini i lako dostupni spojevi koji se nalaze svuda oko nas.

Autofagija je još jedan od mehanizama u organizmu pomoću kojega se rješavamo stanica ili dijelova stanica koje više ne obavljaju dobro svoju funkciju. To činimo uz pomoć vezikula s dvostrukom membranom (autofagosomi) koje „zagrle“ dio stanice koju treba fagocitirati te ga odnesu do lizosoma u kojemu se događa razgradnja.

O važnosti autofagije u medicini dovoljno govori Nobelova nagrada 2016. godine za medicinu koju je dobio znanstvenik za rad na temi autofagije. Autofagija igra značajnu ulogu kako u homeostazi, tako i u razvitku tumora. Ona je najbitniji mehanizam pomoću kojega se tumor privikava na život u nepovoljnim uvjetima. Tumorske stanice se autofagijom služe kako bi „reciklirali“ proteine i osigurali dovoljno aminokiselinskih supstrata za normalan rad pa čak i rast stanica. Proces autofagije u zdravim stanicama čovjeka odstranjuje i reciklira dotrajale organele, proteine i ostali neupotrebljiv sadržaj, dok ga tumorske stanice koriste za preživljavanje i borbu protiv kemoterapija (20).

Autofagiju smo u ovom radu jednako određivali kao i apoptozu. HeLa i MCF-7 stanice su tretirane derivatima kumarina u koncentraciji od 1×10^{-5} M kroz 24 sata te smo aktivaciju autofagije mjerili protočnim citometrom. Rezultati dobiveni na HeLa stanicama pokazuju pad aktivacije autofagije. Derivat DK1 pokazuje blagi rast aktivacije autofagije na MCF-7 stanicama, dok ostali derivati bilježe pad u odnosu na kontrolne stanice.

Nakon istraživanja literature uočavamo da autori imaju podijeljeno mišljenje kada je u pitanju protutumorsko djelovanje autofagije. Dakle, upitno je jesu li dobiveni rezultati u ovom radu zapravo dobri ili loši. Izostao je odgovor na mnoga pitanja. U posljednje vrijeme kod većine se javlja mišljenje i potvrdni rezultati istraživanja na životinjskim modelima i *in vitro* studijama kako povoljniji učinak na krajnji ishod liječenja tumora ima inhibicija autofagije (21). Hoće li tretiranje stanica kumarinima u većoj koncentraciji imati za posljedicu veću aktivaciju i je li to uopće dobra stvar u protutumorskoj terapiji? Odgovor na ovo pitanje ostaje otvoren za neka druga istraživanja.

7. ZAKLJUČAK

- Svi testirani derivati kumarina djeluju na povećanje udjela HeLa stanica u apoptozi.
- Kod MCF-7 stanične linije nema značajne promjene u promicanju apoptoze pod djelovanjem testiranih derivata.
- Derivati kumarina nisu potaknuli proces autofagije u HeLa i MCF-7 staničnim linijama.

8. SAŽETAK

Uvod: Kumarin ili 2H-kromen-2-on je heterociklički aromatski kemijski spoj koji je široko rasprostranjen u prirodi. Maligne bolesti predstavljaju jedan od najvećih problema u današnjoj medicini, a kumarini nalaze ulogu u liječenju istih ili nuspojava uzrokovanih nekom drugom vrstom terapije malignih bolesti.

Cilj: Ispitati utjecaj derivata kumarina na aktivaciju apoptoze i autofagije u tumorskim stanicama *in vitro*.

Materijali i metode: Proapoptotički učinak derivata kumarina (DK1, DK2 i DK3), u koncentraciji od 1×10^{-5} M, ispitan je na HeLa i MCF-7 staničnoj liniji, a određen protočnim citometrom.

Rezultati: Svi testirani derivati djeluju na aktivaciju apoptoze u HeLa stanicama dok na MCF-7 stanice značajno utječe samo derivat DK3. Utjecaj na autofagiju je snižen u odnosu na kontrolu u obje stanične linije.

Zaključak: Testirani derivati pokazuju povećan apoptotički učinak na HeLa staničnu liniju. U obje stanične linije ne potiču autofagiju.

Ključne riječi: kumarin, maligne bolesti, apoptoza, stanične linije

9. SUMMARY

Title: Proapoptotic effects of coumarin derivatives *in vitro*

Introduction: Coumarin, or 2H-chromen-2-one, is a heterocyclic aromatic chemical compound that is widespread in nature. Malignancies are one of the biggest problems in today's medicine and coumarins find a role in treating the same or side effects caused by some other type of malignancy therapy.

Objective: To examine the influence of coumarin derivatives on the activation of apoptosis and autophagy in tumor cells *in vitro*.

Materials and methods: The proapoptotic effect of coumarin derivatives (DK 1, DK 2 and DK 3), in concentration of 1×10^{-5} M, was examined on a HeLa and MCF-7 cell line, determined by a flow cytometer.

Results: All tested derivatives affect the activation of apoptosis in HeLa cells, while MCF-7 cells are significantly affected only by the DK 3 derivative. The effect on autophagy was reduced in regard to both cell lines.

Conclusion: The derivatives tested show an increased apoptotic effect on the HeLa cell line. In both cell lines they do not promote autophagy.

Key words: coumarin, malignancies, apoptosis, cell lines

10. LITERATURA

1. Stefanachi A, Leonetti F, Pisani L, Catto M, Carotti A. Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. *Molecules*. 2018;23(2):250.
2. Molnar M, Čačić M. Biološka aktivnost derivata kumarina – pregledni rad. *Croat J Food Sci Technol*. 2013;3:55–64.
3. Liu B, Raeth T, Beuerle T, Beerhues L. A novel 4-hydroxycoumarin biosynthetic pathway. *Plant Mol Biol*. 2009;72(1-2):17–25.
4. Asif M. Pharmacologically potentials of different substituted coumarin derivatives. *Chemistry International*. 2015;1(1):1-11.
5. Stewart C. Use of coumarin derivatives in antifungal therapy, US Patent. 2010. US2010/0267653A1.
6. Shi Y, Zhou CH. Synthesis and evaluation of a class of new coumarin triazole derivatives as potential antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21(3), 956–960.
7. Grover J, Jachak, SM. Coumarins as privileged scaffold for anti-inflammatory drug development. *RSC Adv*. 2015;5(49):38892–38905.
8. Ali Y, Jannat S, Jung AH, Choi RJ, Roy A, Choi SJ. Anti-Alzheimer's disease potential of coumarins from *Angelica decursiva* and *Artemisia capillaris* and structure-activity analysis. *Asian Pac J Trop Med*. 2016;2(9):103-111.
9. Lacy A. Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Curr Pharm Des*. 2004;10(30), 3797–3811.
10. Lopez-Gonzalez JS, Prado-Garcia H, Aguilar-Cazares D, Molina-Guarneros JA, Morales-Fuentes J, Mandoki JJ. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung cancer*. 2004;43(3):275-83.
11. Cooper GM, Hausman RE. Stanica, molekularni pristup. 3. izd. Medicinska naklada Zagreb 2004. str. 575-584.
12. Cooper GM, Hausman RE. Stanica, molekularni pristup. 3. izd. Medicinska naklada Zagreb 2004. str. 393-394.

13. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. Cold Spring Harbor Protocols, Cold Spring Harb Protoc. 2016;(11).
14. Warnes G. Measurement of Autophagy by Flow Cytometry. Curr Protoc Cytom. 2014; 68(1): 9.45.1-9.45.10.
15. Jemal A ,Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. Ca Cancer J Clin. 2011;61(2):69-90.
16. Emamia S, Dadashpour S. Current developments of coumarin-based anti-cancer agents in medicinal chemistry. Eur J Med Chem. 2015;102:611-630.
17. Wang P, Xia LY, Yu Y, Lu XJ, Zou WL, Feng L i sur. Design, synthesis and biological evaluation of esculetin derivatives as anti-tumour agents. RSC Adv. 2015;5:53477-53483.
18. 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;101:476–495.
19. Duan YC, Ma YC, Zhang E, Shi XJ, Wang MM, Ye XW, i sur. Design and synthesis of novel 1,2,3-triazole-dithiocarbamate hybrids as potential anticancer agents. Eur J Med Chem. 2013;62:11–19.
20. Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, i sur. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. Cell Death Dis. 2013;4:e838.
21. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. Nat Rev Cancer. 2017;17(9):528–542.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Luka Pnjak

Datum i mjesto rođenja: 4. rujna 1994., Slavonski Brod

Adresa stanovanja: Kralja Petra Svačića 1, Osijek

Broj telefona: 099/324-7805

E-mail: pnjak.1@gmail.com

OBRAZOVANJE

2009. – 2013. – Prirodoslovno matematička gimnazija Matija Mesić, Slavonski brod

2013. – 2016. – Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek, Osijek

2016. – 2019. – Sveučilišni diplomski studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek, Osijek

POSAO

2017. – 2018. – Lotos Facility Management

2018. – 2019. – KBC Osijek, pripravnički staž