

# Protutumorski učinci novih N-9 sulfonilpurina

---

Leović, Jasna

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:537887>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-06**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Jasna Leović**

**Protutumorski učinci novih N-9  
sulfonilpurina**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2016.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Jasna Leović**

**Protutumorski učinci novih N-9  
sulfonilpurina**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2016.**

Rad je ostvaren u Laboratoriju za kulturu tkiva pri Katedri za kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Osijek.

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

Rad ima 48 listova, 10 slika i 3 tablice.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ljubici Glavaš - Obrovac na iskazanoj potpori i sugestijama tijekom istraživanja i izrade diplomskoga rada.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Katarini Mišković - Špoljarić, voditeljici Laboratorija za kulturu tkiva, na korisnim savjetima tijekom izrade rada.

Posebno se zahvaljujem dr. sc. Teuti Opačak - Bernardi i Marijani Jukić mag. biol. na pomoći i potpori tijekom izrade rada.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Biologija malignih tumora.....	1
1.2. Liječenje tumora .....	2
1.2.1. Citostatici.....	3
1.2.2. Antitumorski potencijal purinskih nukleozidnih analoga.....	4
1.3. Modeli stanične smrti .....	6
1.3.1. Apoptoza .....	6
1.3.2. Vanjski put apoptoze .....	7
1.3.3. Unutarnji put apoptoze .....	7
1.3.4. Izvršna faza apoptoze .....	8
1.3.5. Autofagija kao model stanične smrti .....	9
1.3.6. Regulirana nekroza.....	9
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>11</b>
3.1. MATERIJALI.....	11
3.1.1. Derivati N-9 sulfonil purina .....	11
3.1.2. Stanične linije.....	12
3.1.3. Kemikalije .....	12
3.1.4. Medij za održavanje staničnih kultura.....	13
3.2. METODE.....	14
3.2.1. Rad sa staničnim kulturama.....	14
3.2.2. MTT test .....	15
3.2.3. Određivanje aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze .....	17
3.2.4. Kolorimetrijsko određivanje kaspaze 3 u staničnom lizatu.....	19
3.2.5. Mjerenje mitohondrijskog membranskog potencijala ( $\delta\psi$ ) protočnom citofluorimetrijom .....	21

3.3. Statistička obrada rezultata .....	22
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>23</b>
4.1. Određivanje antiproliferativnog učinka derivata N-9 sulfonil purinskih nukleozida ....	23
4.2. Evaluacija citotoksičnog učinka derivata N-9 sulfonil purina R191 i D7-23 mjerenjem aktivnosti LDH u mediju .....	33
4.3. Određivanje proapoptotskog djelovanja spojeva R-191 i D7-23 .....	37
4.4. Utjecaj novosintetiziranih N-9 sulfonil purina na mitohondrijski potencijal .....	38
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>40</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>42</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>43</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>44</b>
<b>9. LITERATURA .....</b>	<b>45</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>48</b>

## POPIS KRATICA

6-MP 6-merkaptopurin

6-TG 6-tiogvanin

AIF (*eng. Apoptosis inducing factor*) faktor indukcije apoptoze

ATCC (*eng. American Type Culture Collection*) Američka zbirka staničnih kultura

ATP (*eng. Adenosine triphosphate*) adenzin trifosfat

CAD kaspazno aktivirana DNaza

DISC (*eng. Death inducing signaling complex*) signalni kompleks smrti

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

DMSO dimetil-sulfoksid

DNA (*eng. deoxyribonucleic acid*) deoksiribonukleinska kiselina

FADD (*eng. Fas associated protein with death domain*) Fas protein povezan sa domenom smrti

FADH flavin adenin dinukleotid

FLIP (*eng. FLICE-inhibitory protein*) inhibitorni protein sličan FLIC-u

GSH glutation

hCNT humani koncentracijski nukleozidni transporter

hENT humani ekvilibracijski nukleozidni transporter

IAP (*eng. inhibitor of apoptosis protein*) inhibicijski protein apoptoze

IC<sub>50</sub> (*eng. halfmaximal inhibitory concentration*) Koncentracija koja inhibira rast 50 % stanica

IMPDH (*eng. Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*)

mRNA (*eng. messenger ribonucleic acid*) glasnička ribonukleinska kiselina

MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid)

NCCD (*eng. (Nomenclature Committe on Cell Death)*) Odbor za nomenklaturu stanične smrti



PNA purinski nukleozidni analog

RPMI 1640 (*eng. Roswell Park Memorial Institute*) medij

SDS (*engl. sodium dodecyl-sulphate*) natrijev dodecil sulfat

TNF (*eng. Tumor necrosis factor alpha*) čimbenik tumorske nekroze

## 1. UVOD

Tumorske bolesti, kao posljedica zagađenja okoliša i starenja svjetske populacije vodeći su uzročnici smrtnosti u modernom svijetu. Prema podacima Europske statističke agencije u Europskoj uniji je 2012. godine registrirano više od 1 milijun i 250 000 smrti kao posljedica tumorskih bolesti (1). Maligne bolesti su veliki javnozdravstveni problem i golemi društveni teret, stoga je velika potreba za pronalaskom antitumorskih lijekova koji će pokazivati selektivnu inhibiciju rasta tumorskih stanica. Modificirani nukleozidi i baze nukleinskih kiselina predmet su mnogih istraživanja zbog njihove potencijalne, ali i dosada klinički dokazane antitumorske i antivirusne aktivnosti. Sulfonamidna skupina  $R_1SO_2-NHR_2$  čest je farmakofor u različitim biološki aktivnim molekulama, inhibitor enzima i antagonist receptora. Unatoč pokazanom potencijalu, podatci o biološkom djelovanju N-sulfonilnih derivata purinskih nukleozida su malo zastupljeni u literaturi. Sredinom dvadesetog stoljeća intenzivira se pronalaženje sintetiziranih analoga nukleozida, koji su dobiveni strukturnim modifikacijama endogenih nukleozida, kao inhibitora *de novo* sinteze DNA. (2, 3).

### 1.1. Biologija malignih tumora

Zloćudni tumori, maligne neoplazije ili novotvorine obuhvaćaju skupinu bolesti koje karakterizira nekontrolirana dioba stanica, prodor u okolna tkiva, širenje putem limfe i krvi u druge dijelove organizma te formiranje sekundarnog tumora ili metastaze. Karcinogeneza ili proces formiranja tumora odvija se kumulativnim djelovanjem endogenih faktora na staničnoj razini i okolišnih čimbenika. Mutacije nastaju djelovanjem bioloških (onkovirusi), fizikalnih (UV, gama zračenje) i kemijskih mutagenih čimbenika. Posljedice djelovanja mutagenih čimbenika su točkaste mutacije nukleotidnog slijeda molekule DNA, veća oštećenja na razini kromosoma i utišavanje ili aktivacija malih nekodirajućih molekula mikroRNK koje posttranslacijskom degradacijom mRNA kontroliraju ekspresiju gena uključenih u proliferaciju. Maligna transformacija rezultat je genetičkih i epigenetičkih promjena onkogena, tumorsupresorskih gena i gena uključenih u nadzor staničnog ciklusa (4, 5).

Obilježja tumorske stanice su nestabilnost genoma i nakupljanje mutacija, gubitak diferencijacije, neograničena proliferacija i izbjegavanje stanične smrti (4). Tumorske stanice izgubile su kontaktnu inhibiciju kao funkciju supresije proliferacije stanica u održavanju normalne homeostaze tkiva. Vješto izbjegavaju apoptozu kao proces prevencije razvoja

tumora pojačavajući ekspresiju antiapoptotskih regulatora ili supresiju ekspresije proapoptotskih faktora (6). Tumorske stanice pokazuju tendenciju reprogramiranja metabolizma; i u prisustvu kisika koriste se glikolizom za pribavljanje energije, tzv. Warburgov efekt. Nusprodukte razgradnje iz procesa glikolize koriste kao gradivne elemente za kontinuirani rast i proliferaciju (7).

Tumori su monoklonskog porijekla jer nastaju od jedne maligno transformirane stanice, a progresija tumora rezultat je dominacije agresivnih subklonova (8). Heterogenost stanica unutar tumora posljedica je nagomilanih mutacija. Neke mutacije daju prednost agresivnim subklonovima koji pokazuju proliferacijsku nadmoć (4).

Tijekom razvoja, tumor prolazi kroz faze inicijacije, promocije, progresije i zloćudne preobrazbe. Od početne promjene DNK, nekontroliranom proliferacijom i nagomilavanjem mutacija, dogodit će se klonalna ekspanzija koja će tijekom posljednje faze postići potpunu malignu preobrazbu. Znak maligne preobrazbe je invazivni rast i metastaziranje. Procesom epitelno-mezenhimalne tranzicije eksprimiraju se transkripcijski faktori koji utiču na gubitak adhezivnosti stanica međusobno i adhezivnosti na bazalnu membranu čime je omogućen prodor tumorskih stanica u krvotok i limfni sustav i konačno metastaziranje u udaljene organe. Tumorske stanice sposobne su potaknuti proces angiogeneze svojstven embrionalnim stanicama. Složeni proces karcinogeneze može potrajati i nekoliko desetljeća, a zahvaljujući izostanku imunološkog odgovora, tumorske stanice uspijevaju izbjeći eliminaciju iz organizma (2).

### **1.2. Liječenje tumora**

Spoznaje o molekularnim mehanizmima zloćudne preobrazbe preduvjet su razumijevanja mehanizama djelovanja protutumorskih lijekova. Metode liječenja tumora u kliničkoj praksi su kirurške metode, radioterapija, hormonska terapija, imunoterapija, inhibicija angiogeneze i terapija citostaticima. U kliničkoj praksi koristi se kombinirani pristup liječenja tumora koji ostvaruje bolji ishod liječenja. Kombinirana terapija omogućava potpuno uništenje tumorske stanice uz klinički podnošljivu toksičnost lijekova. Primjenom kombinirane terapije nastoji se isključiti faktor rezistencije tumorske stanice na kemoterapiju povezan s genskom nestabilnošću tumorske stanice (9, 10) Primarna rezistencija pri prvoj primjeni terapije povezana je s mutacijom p53 tumor supresorskog gena i mutacijama enzima povezanih s

popravkom DNA. Rezistencija na citostatik očituje se pojačanom aktivnošću ATP-ovisne grupe ABC membranskih transportnih proteina i pojačanom ekspresijom gena MDR1 koji kodira transportni glikoprotein na površini stanice koji aktivnim prijenosom održavaju koncentraciju citostatika unutar stanice ispod granice djelotvornosti, pojačanim mehanizmima popravka DNA i akumulacijom ciljanih mutacija gena koji kodiraju gene za enzime zadužene za inaktivaciju lijekova (9, 10).

### 1.2.1. Citostatici

Citostatici su lijekovi koji uništavaju tumorske stanice ili zaustavljaju njihovu proliferaciju. Pokazuju kancerogeni, teratogeni i mutageni potencijal. Neselektivno djeluju i na zdrave stanice, posebno na stanice koje se brzo dijele: krvne stanice, stanice sluznice probavnog sustava, stanice folikula dlaka i spolne stanice. U grupu citostatika pripadaju: alkilirajući citostatici, analozi platine, antimetaboliti, inhibitori receptora čimbenika rasta, inhibitori mitoze.

Alkilirajući citostatici citostatički učinak ostvaruju prijenosom alkilne skupine na DNA i druge biološke strukture u stanici pri čemu ostvaruju jake kovalentne veze. Glavno mjesto alkilacije DNA je N7 pozicija gvanina, N1 i N3 pozicija adenina, N3 citozina i O6 gvanina. Najvažniji učinak alkilirajućih citostatika je križno povezivanje DNA i ometanje replikacije i transkripcije.

Kompleksi s platinom su diaminski kompleksi koji citotoksični učinak ostvaruju u svim fazama staničnog ciklusa. Elektrofilni kompleks stvaranjem križnih veza između DNA lanaca ometa replikaciju, inhibira transkripciju i potiče apoptozu.

Antimetaboliti citotoksični učinak ostvaruju ometajući metaboličke procese stanica koje se aktivno dijele. Glavni predstavnici su analozi folne kiseline koji ometaju sintezu tetrahidrofolata vežući se u aktivno mjesto enzima tetrahidrofolat reduktaze i time ometaju sintezu DNA, analozi purina (6-merkaptopurin) koji ometaju de novo sintezu purinskih nukleotida i analozi pirimidina (5-fluorouracil) koji ometaju sintezu pirimidinskih nukleotida. (10, 11)

Interkalatori su planarne aromatske strukture koje se umeću između susjednih parova baza bez ometanja dušikovih veza komplementarnih baza. Mjestu umetanja prilaze kroz utore na dvostrukoj uzvojnici. Interlulatori uzrokuju odmotavanje dvostruke uzvojnice, produženje

DNA i inhibiciju enzima topoizomeraza II tijekom replikacije. Prisutnost neke elektrofilne skupine u strukturi interkalatora doprinosi njegovoj genotoksičnosti. Aromatske i elektrostatske interakcije, vodikove veze te prijenos naboja stabiliziraju interkalator na veznom mjestu. Primjenjuju se kao antitumorski lijekovi (epirubicin, doksorubicin), antibiotici, antimikotici i antimalarijski lijekovi (11, 12).

Utor-vezujući spojevi su molekule polumjesečastog oblika koje se uglavnom vežu za mali utor DNA prema predlošku ključ-brava. Zahvaljujući obliku koji odgovara strukturi dvostruke uzvojnice DNA, ti spojevi mogu stvarati interakcije s malim utorom B-DNA. Vežu se kovalentnim i nekovalentnim vezama i pokazuju specifičnost vezanja za AT i GC sekvence nukleotidnog slijeda. Antraciklini, antitumorski i antibakterijski lijekovi, pokazuju svojstva interkalatora i utor-vezujućih spojeva (11, 13).

Inhibitori mitoze ometaju polimerizaciju tubulina i time remete funkciju niti diobenog vretena. Rezultat je prekid mitoze tijekom metafaze. Djeluju i na zdrave stanice, ali u manjoj mjeri zbog sporijeg dijeljenja u odnosu na tumorske stanice. Najpoznatiji predstavnici su Vinca biljni alkaloidi (alkaloidi zimzelena) iz vrsta *Vinca rosea Linnaeus* i *Catharanthus rosea*. (9, 10)

### **1.2.2. Antitumorski potencijal purinskih nukleozidnih analoga**

Nukleozidi su organske molekule koje se sastoje od heterocikličke dušične baze koja je preko N-glikozidne veze vezana na šećer ribozu ili deoksiribozu. Razlikujemo purinske (adenin, gvanin) i pirimidinske baze (timin, citozin, uracil). Nukleotidi, osnovne gradivne jedinice nukleinskih kiselina su fosfatni esteri koji nastaju fosforilacijom nukleozida na primarnoj hidroksilnoj skupini šećera. Nukleozidi su sastavni elementi različitih biološki aktivnih komponenti. Adenozin trifosfat ima važnu ulogu u opskrbi stanica energijom, a adenozin je također prisutan u strukturi važnih koenzima: nikotinamid adenin dinukleotid (NADH), flavin adenin dinukleotid (FADH) i koenzim A. Nukleozidi se uglavnom sintetiziraju iz elemenata koji nastaju razgradnjom nukleinskih kiselina unesenih hranom. Sintetiziraju se i de novo sintezom u jetri (14). Endogeni purinski nukleozidi sudjeluju u važnim staničnim procesima sinteze DNA i RNA, staničnoj signalizaciji i enzimskim reakcijama. Adenozin kao signalna molekula vezanjem za adenzinske receptore omogućava različite fiziološke odgovore; koronarnu vazodilataciju, neuromodulaciju, agregaciju trombocita (15).

Purinski nukleozidni analozi (PNA) su prema farmakološkom djelovanju heterogena skupina koja pokazuje citotoksično, antivirusno i imunosupresivno djelovanje. PNA u kemoterapijskom smislu pripadaju skupini antimetabolita (16). Novosintetizirani PNA su kemijski modificirani s nakanom da se oponašanjem fizioloških nukleozida uključe u stanični metabolizam. Nakon što budu inkorporirani u DNA ili RNA molekule, mogu inhibirati replikaciju ili ometati djelovanje enzima DNA i RNA polimeraze, kinaze, ribonukleotid reduktaze, DNA metiltransferaze i purin nukleozid fosforilaze. PNA ulaze u stanicu preko nukleozidnih transportera. Nukleozidni transporteri posreduju propusnost stanične membrane za endogene nukleozide i većinu nukleozidnih analoga kao hidrofilnih molekula. Važna je uloga nukleozidnih transportera u ostvarenju citotoksičnosti, kao i razvoju otpornosti tumorskih stanica na antitumorsku terapiju. Poznate su dvije skupine humanih nukleozidnih transportera: ekvilibracijski (hENT) i koncentracijski (hCNT). ENT subtipovi hENT1, hENT2, hENT3 i hENT4 posreduju u pasivnom, dvosmjernom transportu olakšanom difuzijom kroz staničnu membranu. Klasificirani su prema osjetljivosti na nitrobenziltioiozin kao NBMR osjetljivi i NBMR neosjetljivi. Grupu CNT čine tri podtipa CNT1, CNT2 i CNT3 koji pokazuju afinitet prema različitim supstratima. CNT posreduju jednosmjernan transport, energetski zahtjevan proces koji se odvija uz utrošak  $\text{Na}^+$  iona. Vezanjem liganda CNT podliježe konformacijskoj promjeni ovisnoj o  $\text{Na}^+$  ili  $\text{H}^+$  (15). Kada dospiju u stanicu, PNA se podvrgavaju fosforilaciji posredovanoj enzimom nukleozidna kinaza pri čemu nastaje monofosfatni oblik. Kroz sljedeća dva koraka fosforilacije djelovanjem enzima nukleozidna monofosfat kinaza i difosfat kinaza nastat će nukleozidni trifosfat. PNA trifosfat nadmeće se s endogenim nukleozidima tijekom sinteze DNA ili RNA. Ribonukleotidna reduktaza M1 (RRM1) je ključni enzim nukleozidnog metabolizma, a inhibira ga i difosfatni i trifosfatni oblik nukleozidnog analoga. Ugradnjom PNA u DNK zaustavlja se stanični ciklus tijekom S faze staničnog ciklusa. Tiopurini su važna grupa PNA koja posjeduje sulfurnu grupu na C6 atomu. Najvažniji predstavnici su derivati hipoksantina i gvanina 6-merkaptopurin (6-MP), 6-tiogvanin (6-TG) i modificirani 6-MP azatiopurin (AZA). 6-MP i 6-TG citotoksični učinak ostvaruju inhibicijom purinskog metabolizma. Tiopurini se primjenjuju kao imunomodulatori pri liječenju upalnih bolesti te kao antitumorska terapija, osobito u liječenju leukemija. Sulfozin je derivat 6-tiogvanozina koji zaustavlja stanični ciklus u S i G<sub>2</sub>M fazi staničnog ciklusa. Efikasnost koju pokazuje prema rezistentnim tumorskim stanicama ostvaruje zahvaljujući inhibiciji ključnih enzima uključenih u sintezu glutationa (GSH) i sustav detoksifikacije tumorskih stanica. Ribavirin i tiazofurin su N-glikozilni i C-glikozilni purinski nukleozidi inhibitori inozin 5-monofosfat dehidrogenaze (IMPDH) ključnog enzima

u *de novo* sintezi gvanozin-5'-trifosfat (GTP). Inhibicija aktivnosti IMPDH dovodi do redukcije sinteze gvanilata, a zatim i do inhibicije sinteze RNA i DNA te inhibicije proliferacije tumorskih stanica. Antivirusno, antitumorsko i imunosupresivno djelovanje posljedica je smanjene dostupnosti GTP-a koji sudjeluje u mnogim staničnim procesima (17). N-sulfonilni purinski analozi su derivati dvije biološki aktivne komponente: sulfonilciklouree i purinske baze. Poznato je da derivati sulfonilciklouree pokazuju antitumorsko djelovanje (2).

### 1.3. Modeli stanične smrti

Prema napatku Odbora za nomenklaturu stanične smrti (*Nomenclature Committee on Cell Death* NCCD, 2012) redefinirani su tipovi stanične smrti na temelju najnovijih spoznaja o biokemiji i genetici stanične smrti. Funkcionalna klasifikacija stanične smrti podrazumijeva: vanjsku (*eng. extrinsic*) apoptozu, kaspaza-ovisnu ili kaspaza-neovisnu unutrašnju (*eng. intrinsic*) apoptozu, reguliranu nekrozu, autofagiju i mitotičku katastrofu. Prvi opisi stanične smrti datiraju još iz sredine 1960-ih. Godine 1973. Schweichel i Merker predlažu modalitete stanične smrti prema načinu digestije. Ranije klasifikacije su se temeljile uglavnom na morfološkim karakteristikama. Prema preporukama NCCD-a nova sistematizacija stanične smrti treba se ravnati prema mjerljivim biokemijskim pokazateljima (18).

#### 1.3.1. Apoptoza

Apoptoza je najpodrobnije istražen mehanizam programirane stanične smrti. Termin apoptoza (*a-po-toe-sis*) prvi spominje Kerr 1972. (19) kako bi jasno razlučio apoptozu od nekroze. Apoptoza je evolucijski konzerviran, genetski determiniran i energetski ovisan biokemijski mehanizam uključen u razvoj tkiva i organa tijekom embriogeneze, održavanje tkiva tijekom odrasle dobi, regulaciju imunološkog sustava i patogenezu mnogih bolesti. Stanice koje umiru apoptozom pokazuju specifične morfološke promjene; smanjivanje staničnog volumena, kondenzacija kromatina (piknoza), bubrenje stanične membrane, fragmentacija kromatina i formiranje apoptotskih tjelešaca. Apoptotska tjelešca predstavljaju citoplazmu s gusto pakiranim organelima i fragmentima jezgre te očuvanom staničnom membranom na čijoj površini se nalazi izložen fosfatidilserin koji signalizira makrofazima da započnu fagocitozu oštećene stanice (20). Stanični sadržaj se ne oslobađa u okolinu i nema oštećenja okolnog

tkiva upalnim odgovorom. Brzom fagocitozom apoptotskih tjelešaca izbjegava se sekundarna nekroza i produkcija citokina. Razlikujemo dva glavna apoptotska puta: unutarnji ili mitohondrijski i vanjski ili receptorski put (21). Oba apoptotska puta regulira složeni, kaskadni sustav kaspaza, citoplazmatskih aspartat specifičnih proteaza. U citoplazmi su prisutne u inaktivnoj formi (prokaspaze), a aktiviraju se autokatalitički ili kaskadno. Prema mjestu i funkciji koje zauzimaju u kaskadi razlikujemo inicijatorske i efektorske. Inicijatorske kaspaze (-8, -9, -10) nalaze se u monomernom obliku, aktiviraju se dimerizacijom, a zatim potiču aktivaciju izvršnih kaspaza (-3, -6, -7) razlaganjem dimera na monomere (22).

### 1.3.2. Vanjski put apoptoze

Vanjski put apoptoze aktivira se preko transmembranskih receptora, najčešće članova receptorske superobitelji faktora tumorske nekroze (*eng. Tumor Necrosis Factor, TNF*) tzv. receptora smrti; FAS ili CD95/APO-1, TNF-receptor 1 TNFR1 (*eng. TNF related apoptosis inducing ligand-receptor*), receptor smrti 4 DR4 ili TRAILR1-2 i DR 5 ili TRAILR 2. Vanjski put apoptoze započinje aktivacijom receptora smrti vezivanjem liganda za specifični receptor (npr. FASL/FAS). Najčešći ligandi koji vezanjem za transmembranske receptore pokreću apoptozu su TNF $\alpha$  ligand za TNFR1 (naziva se i CD95 ili APO-1) i Fas ligand. TNF receptori su skupina transmembranskih proteina koji posjeduju cisteinom bogatu ekstracelularnu domenu i citoplazmatsku domenu tzv. domenu smrti (*eng. Death Domain DD*). Vezanjem Fas liganda na Fas receptor intracelularna domena se trimerizira i angažira adaptorske proteine (FADD, cIAP, cFLIP i prokaspazu-8) formirajući molekularni kompleks (*eng. Death Inducing Signaling Complex, DISC*) koji čine receptor Fas, adaptorski protein FADD (*eng. Fas-associated via Death Domain*) i prokaspaza -8 i koji kontrolira autoproteolitičku aktivaciju prokaspaze -8 ili -10. Nakon aktivacije kaspaze -8 i -10 započinje kaskadna aktivacija efektorskih kaspaza -3, -6 i -7, što će rezultirati fragmentacijom DNA i apoptozom (22, 23).

### 1.3.3. Unutarnji put apoptoze

Unutarnji put apoptoze pokreću različiti stresni događaji unutar stanice; oštećenje DNK, oksidativni stres, nedostatak faktora rasta, povećanje razine Ca<sup>2+</sup> u citoplazmi. Središnju ulogu unutarnjeg puta zauzima mitohondrij čija je uloga pojačati početni proapoptotski signal.



Svi navedeni stimulansi uzrokuju propusnost mitohondrijske unutrašnje membrane (engl. *mitochondrial permeability transition, MPT*), narušavanje mitohondrijskog membranskog potencijala i oslobađanje proapoptotskih proteina iz mitohondrijskog međumembranskog prostora u citoplazmu; citokrom c, inducirajući faktor apoptoze (AIF), Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 i endonukleaza G. Citokrom C otpušten u citoplazmu zajedno s kaspazom-9 i Apaf-1 proteinom formira kompleks apoptosom koji aktivira efektorsku kaspazu-3, dok Smac/DIABLO i Omi/HtrA2 pojačavaju kaspaznu aktivaciju neutralizacijom inhibicijskog djelovanja IAP (eng. *Inhibitor of Apoptosis Protein*) proteina (20). Regulacija unutarnjeg puta apoptoze odvija se preko članova Bcl-2 obitelji proteina. Tumor supresorski gen p53 sudjeluje u regulaciji apoptoze posredovane mitohondrijskim putem poticanjem ekspresije proapoptotskih članova Bcl-2 obitelji: Bcl-10, Bcl-xS, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik i Blk ili supresijom antiapoptotskih članova; Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, Bcl-w i BAG (20, 23). Proteini otpušteni iz mitohondrijskog međumembranskog prostora; AIF i ENDO G, odlaze u jezgru i neovisno o aktivaciji kaspaza cijepaju DNK. Među proteinima oslobođenim iz međumembranskog prostora mitohondrija su i inhibitori SMAC/DIABLO i HTRA2 nekoliko proteina iz familije inhibitora apoptoze (IAP familija) čime se dodatno pojačava proapoptotski kaspaza-neovisni proces apoptoze (24, 25).

#### 1.3.4. Izvršna faza apoptoze

Izvršna faza apoptoze je točka susreta vanjskog i unutarnjeg puta. Kaskadna reakcija aktivacije izvršnih kaspaza glavno je obilježje ove faze. Kaspaza-3, kaspaza-6 i kaspaza-7 djeluju kao izvršne kaspaze koje cijepaju različite supstrate: citokeratin, PARP (eng. *poly (ADP-ribose) polymerase*), plazmatsko membranski citoskeletni protein alfa fodrin, nuklearni protein NuMA. Posljedica djelovanja izvršnih kaspaza su karakteristična morfološka i biokemijska obilježja apoptoze. Centralno mjesto zauzima kaspaza-3, koju aktiviraju inicijatorske kaspaze -8, -9 i -10. Kaspaza-3 aktivira endonukleazu CAD (eng. *Caspase-activated deoxyribonuclease*) koja je u proliferirajućim stanicama vezana s inhibitorom ICAD. Aktivirana kaspaza-3 cijepa ICAD i oslobađa CAD, koji cijepanjem kromosomske DNA uzrokuje kondenzaciju kromatina. Kaspaza-3 cijepa aktin vezujući protein Gesolin, čijim cijepanjem nastupa oštećenje citoskeleta te ometanje unutarstaničnog transporta i mitoze. Zbog gubitka aktivnosti aminofosfolipidne translokaze i membranske fosfolipidne asimetrije, fosfatidilserin, fosfolipid smješten na citoplazmatskoj strani stanične membrane,

biva izložen na površini apoptotičnih stanica. Izloženi fosfatidilserin privlači fagocite, a ranom fagocitozom apoptotične stanice izbjegava se upalni odgovor (20).

### **1.3.5. Autofagija kao model stanične smrti**

Autofagija je glavni put fiziološke razgradnje proteina i citoplazmatskih organela tijekom starenja stanica. Glavno obilježje je obilna lizosomalna razgradnja, vakuolizacija citoplazme i formiranje autofagosoma. Autofagija može biti rezervni mehanizam umiranja stanica u slučaju mutiranih gena za apoptozu tijekom razvoja. Tumorske stanice koje su izgubile aktivnost nekih modulatora apoptoze u odgovoru na neke kemoterapijske tvari pribjegavaju autofagiji kao načinu umiranja. Važna molekula u regulaciji autofagije je serin/treonin kinaza mTOR, koja inhibira signale koji sprječavaju inicijaciju autofagije. mTOR put uključuje dva funkcionalna kompleksa, rapamicin ovisan Raptor-mTOR kompleks (mTOR1) i Rictor-mTOR kompleks (mTOR2). Aktivnost mTOR1 nadziru različiti signali kao što su faktori rasta, aminokiseline, glukoza, energetski status (razina ATP-a) i stanični stres. Adaptorski proteini prepoznaju i vežu ubikvitinom obilježene stanične elemente i sudjeluju u njihovom pakiranju u autofagosomalnu membranu. Prema preporuci NCCD-a definicija autofagije obuhvaća: lipidaciju mikrotubula udruženih s proteinom 1 lakog lanca 3, degradacija autofagosomnih supstrata (sekvestom 1) i mogućnost inhibicije autofagije različitim kemikalijama (18, 26, 27).

### **1.3.6. Regulirana nekroza**

Tradicionalno je apoptoza smatrana reguliranim oblikom stanične smrti, dok je nekroza definirana kao slučajan i nekontroliran proces. Nekrozu morfološki karakterizira povećanje staničnog volumena (onkoza), gubitak integriteta stanične membrane i oslobađanje staničnog sadržaja. (18, 28)

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

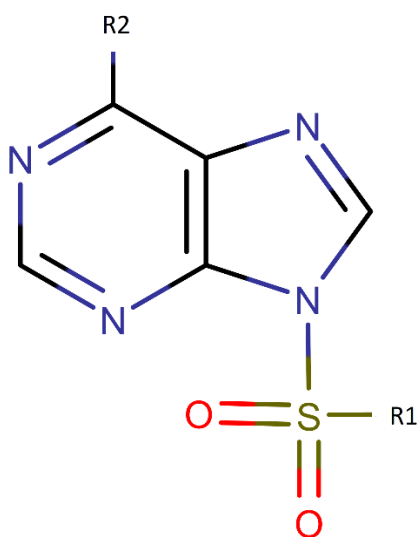
Ispitati utjecaj novosintetiziranih derivata N-9 sulfonilpurina na rast normalnih i tumorskih stanica u in vitro uvjetima. Ustanoviti povezanost između koncentracije novih spojeva i inhibicije rasta. Definirati supstanciju koja ima najveću učinkovitost na rast tumorskih stanica, a da istovremeno ne djeluje inhibitorno na rast kulture normalnih epitelnih stanica. Odrediti način umiranja tretiranih stanica.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1 Derivati N-9 sulfonil purina

Derivati N-9 sulfonil purina sintetizirani su u Laboratoriju za supramolekularnu i nukleozidnu kemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Za potrebe *in vitro* testiranja novosintetizirani spojevi otopljeni su u dimetil sulfoksidu (DMSO) kao  $1 \times 10^{-2}$  mol/L koncentrirane otopine i pohranjeni na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Neposredno prije testiranja pripremane su radne otopine otapanjem stock otopine ( $1 \times 10^{-2}$  mol/L) u sterilnoj destiliranoj vodi. Prema pokazanoj topivosti u sterilnoj destiliranoj vodi, definirane su radne koncentracije za pojedine novosintetizirane spojeve.



Slika 1. Osnovna molekulska struktura novosintetiziranih N-9 sulfonil purina

### 3.1.2. Stanične linije

Biološki učinak novosintetiziranih N-9 sulfonil purinskih derivata testiran je na komercijalno dostupnim humanim staničnim linijama i jednoj animalnoj staničnoj liniji. U radu su korištene sljedeće adherentne stanične linije:

- BJ (ATCC<sup>®</sup> CRL-2522<sup>™</sup>) stanice normalnih humanih fibroblasta,
- MDCK (ATCC<sup>®</sup> CCL-34<sup>™</sup>) zdrave epitelne stanice psećeg bubrega,
- HeLa (ATCC<sup>®</sup> CCL-2<sup>™</sup>) humane epitelne stanice karcinoma cerviksa,
- CaCo-2 (ATCC<sup>®</sup> HTB-37<sup>™</sup>) epitelne stanice humanog karcinoma kolona,
- NCI-H358 (ATCC<sup>®</sup> CRL-5807<sup>™</sup>) epitelne stanice bronhioalveolarnog karcinoma.

U radu su korištene i stanične linije leukemija i limfoma čovjeka:

- K562 (ATCC<sup>®</sup> CCL-243<sup>™</sup>) kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi,
- Raji (ATCC<sup>®</sup> CCL-86<sup>™</sup>) B-limfocitni Burkitt-ov limfom,
- Hut-78 (ATCC<sup>®</sup> CRM-TIB-161<sup>™</sup>) limfom T-stanica,
- CCRF-CEM (ATCC<sup>®</sup> CRM-CCL-119<sup>™</sup>) akutna limfoblastična leukemija,
- MOLT-4 (ATCC<sup>®</sup> CRL-1582<sup>™</sup>) leukemija T-stanica; akutna limfoblastična leukemija.

### 3.1.3. Kemikalije

Tijekom eksperimentalnog dijela rada korištene su kemikalije i reagensi različitih proizvođača: Dulbecco modificirani Eagleov medij (DMEM) Lonza (Basel, Switzerland), Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640) Lonza (Basel, Switzerland), fetalni goveđi serum (FBS) GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), 0,25 % tripsin EDTA GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), natrij-piruvat GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), penicilin/streptomycin (100 x) GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), Tripansko plavilo 0,4 % GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), (4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) Sigma-Aldrich (St.Louis, SAD), L-

glutamin 200 mM GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (HEPES) Sigma- Aldrich (St.Louis, SAD), natrij dodecil sulfat (SDS) Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD), dimetil sulfoksid (DMSO) Acros Organics (New Jersey, SAD), Triton X-100 Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD), komplet za kolorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima LDH (*LDH Cytotoxicity Detection Kit*, TAKARA BIO INC.), komplet za kolorimetrijsko mjerenje aktivnosti enzima kaspaze 3 *Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric* (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), komplet za detekciju promjene mitohondrijskog membranskog potencijala *Mitochondria Staining Kit For mitochondrial potential changes detection* (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD). **Fosfatni pufer** (eng. *Phosphate Buffered Saline, PBS*) pripremljen je od 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4. **MTT** reagens (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) otopljen je u PBS-u u koncentraciji 5 mg/ml.

#### 3.1.4. Medij za održavanje staničnih kultura

Hranjivi medij za uzgoj adherentnih staničnih linija priprema se kompletiranjem DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) temeljnog medija. Ukupni volumen kompletiranog medija, 500 ml pripremljen je dodatkom: 50 ml FBS-a ( *engl fetal bovine serum*) da bi ostvario 10 % (v/v), 5 ml 200 mM otopine L-glutamina, 5 ml penicilin/streptomycin (100 U/ml penicilin/0,1 mg/ml streptomycin). Stanične linije leukemija i limfoma uzgajaju se u RPMI 1640 (eng. *Roswell Park Memorial Institute*) mediju koji sadrži optimalne udjele aminokiselina i vitamina za rast humanih normalnih i neoplastičnih leukocita i limfocita. Ukupni volumen kompletiranog RPMI 1640 medija, 500 ml pripremljen je dodatkom: 50 ml FBS-a ( *engl fetal bovine serum*) da bi ostvario 10 % (v/v), 5 ml 200 mM otopine L-glutamina, 5 ml penicilin/streptomycin (100 U/ml penicilin/0,1 mg/ml streptomicina), HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina) pufera da ostvari koncentraciju 20 mM i 5 ml natrij piruvat otopine (100 mM). HEPES je prije dodavanja u temeljni medij otopljen u 10 ml odvojenog temeljnog medija, a zatim profiltriran kroz filter s porama veličine 0,2 µm. Kompletirani mediji DMEM i RPMI 1640, korišteni u pokusima, sadrže sve navedene sastojke osim penicilin/streptomycin antibiotika.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Rad sa staničnim kulturama

Rad sa staničnim kulturama odvija se u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka. Posuđe, pribor, otopine, puferi i mediji su sterilni. Stanične kulture se pohranjuju uklopljene u medij za zamrzavanje (45 % serum, 45 % medij, 10 % DMSO), u kriotubicama, u tekućem dušiku na temperaturi  $-196^{\circ}\text{C}$ .

*Odmrzavanje stanica:* Prije nego što su se potpuno otopile, stanice su prebačene u tubice u koje je dodano 5 ml svježeg kompletiranog medija. Tubice su centrifugirane (1100 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 6 min.) kako bi se odvojile od medija za smrzavanje. Medij za zamrzavanje sadrži DMSO-a koji je na sobnoj temperaturi štetan za stanice. Supernatant je odliven, a stanični talog je resuspendiran u 5 ml odgovarajućeg kompletiranog medija i prebačen u T-boce za uzgoj staničnih kultura.

*Održavanje stanične kulture:* Stanice su uzgajane u bocama za kulturu stanica površine rasta  $25\text{ cm}^2$  (BD, Falcon, Njemačka) u  $\text{CO}_2$  inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u uvjetima ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ) u atmosferi zasićenoj vlagom. Adherentne stanične linije (BJ, MDCK, HeLa, CaCo<sub>2</sub>,) uzgojene su u T-bocama prilagođenim kultivaciji stanica koje prijanjaju za podlogu, u 5 ml kompletiranog DMEM medija. Stanične linije leukemija i limfoma uzgojene su u T-bocama za uzgoj staničnih linija u suspenziji, u 5 ml kompletiranog RPMI 1640 medija. Adherentna stanična linija NCI-H358 je iznimno kultivirana u bocama za uzgoj adherentnih stanica u RPMI 1640 mediju. Prije početka rada sa stanicama, sve su potrebne kemikalije temperirane na sobnoj temperaturi. Stanične linije koje rastu u suspenziji održavaju se oduzimanjem dijela volumena i nadoknadom svježim medijem ili zamjenom ukupnog volumena medija. Konfluentnost stanica je svakodnevno provjeravana pod inverznim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka). Adherentne stanice su svaka 3 dana presađene. Sa stanica je uklonjen medij, a zatim je površina boce isprana s 5 ml PBS-a. Za odvajanje stanica od podloge dodano je 3 ml 0,25 % tripsin/EDTA. Nakon približno 6 min., tripsin je inaktiviran dodatkom 5 ml svježeg medija, a stanična suspenzija dobro resuspendirana propuhivanjem kroz pipetu. U boci je ostavljen 1 ml suspenzije, a ostatak je prebačen u sterilne tubice i pohranjen na  $+4^{\circ}\text{C}$ .

*Određivanje brojnosti i vijabilnosti stanica:* Broj stanica u svakom eksperimentu je definiran kako bi rezultati bili kvalitetni i reproducibilni, stoga je prije postavljanja pokusa potrebno utvrditi broj stanica u staničnoj suspenziji. Broj i vijabilnost stanica određena je bojenjem stanične suspenzije s tripan-plavilom. Otopina tripankog plavila nakuplja se u stanicama s oštećenom membranom, pri čemu se stanice boje u plavo. Žive stanice s intaktnom membranom aktivno izbacuju boju putem membranskih pumpi i ostaju nebojene. Pomiješano je 50  $\mu$ l resuspendirane stanične suspenzije i 100  $\mu$ l 0,4 % otopine tripankog plavila, a zatim je mikropipetom nanesena ispod pokrovnog stakalca Bürker-Türk komorice za brojanje stanica. Pod invertnim mikroskopom prebrojane su žive stanice unutar 4 kvadratića i one koje padaju u gornji i lijevi brid kvadratića. Broj živih stanica preračunava se u broj stanica u 1 ml prema formuli:

$$\text{broj stanica / 1ml} = \frac{N}{4} \times R \times 10^4$$

N predstavlja ukupan broj izbrojenih stanica u 4 kvadratića, R je razrjeđenje koje je u ovom slučaju 3 jer je 50  $\mu$ l stanične suspenzije razrijeđeno sa 100  $\mu$ l tripankog plavila. Bürker-Türk komorica podijeljena je na 9 manjih kvadrata površine 1 mm<sup>2</sup> i dubine 0,1 mm, odnosno 0,1  $\mu$ l volumena koji se množi s 10<sup>4</sup> kako bi se dobio broj stanica u 1 ml.

### 3.2.2. MTT test

MTT kolorimetrijski test je *in vitro* metoda za kvantitativnu procjenu stanične vijabilnosti nakon tretmana stanica kemijskim agensima (29). Test utvrđuje metaboličku aktivnost mitohondrijskog enzima sukcinat dehidrogenaze živih stanica, koji cijepa žutu tetrazolijevu sol MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid), pri čemu nastaju netopivi ljubičasti kristali formazana u citosolu stanica. Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je broju metabolički aktivnih stanica, a očitava se spektrofotometrijski na valnoj duljini 570 nm.

Adherentne stanične linije nasadene su na mikrotitarske ploče s 96 jažica namijenjene uzgoju adherentnih stanica u koncentraciji 2 x 10<sup>4</sup> st/ml. Kontrolne stanice (netretirane stanice) nasadene su u istim uvjetima. Kontrole početnog broja stanica (0. dan) pripremljene su u istoj koncentraciji i pohranjene na -20°C. Nasadene ploče pohranjene su preko noći u inkubator (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). Sutradan su stanice tretirane derivatima N-9 sulfonil purina u radnim koncentracijama koje dodavanjem 20  $\mu$ l otopine spoja ostvaruju finalne koncentracije prikazane u Tablici 1. Tretirane ploče pohranjene su u inkubator (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) sljedećih 72 h. Petog dana testa uklonjen je medij sa stanica, a u svaku jažicu dodano je 40  $\mu$ l otopine (1



x) MTT/PBS koncentracije 5 mg/ml. Mikrotitarske ploče vraćene su u inkubator na 4 h. Nakon isteka inkubacije, nastali formazanski kristali otopljeni su dodavanjem 160 µl organskog otapala DMSO u svaku jažicu, uz laganu trešnju na tresilici 30 min. na sobnoj temperaturi.

Stanice koje rastu u suspenziji nasadene su na ploče s 96 jažica za uzgoj stanica u suspenziji u koncentraciji  $1 \times 10^5$  st./ml u volumenu od 100 µl (90 µl stanične suspenzije + 10 µl testne otopine). Odmah nakon nasadivanja dodano je 10 µl otopine derivata N-9 sulfonil purina radne koncentracije koja ostvaruje finalnu koncentraciju prikazanu u Tablici 1. Kontrolne stanice (netretirane stanice) nasadene su u istim uvjetima. Kontrole početnog broja stanica pripremljene su u istoj koncentraciji i pohranjene na -20°C. Mikrotitarske ploče s tretiranim stanicama pohranjene su u inkubator (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) na 72 h. Četvrti dan testa, u svaku jažicu dodano je 10 µl otopine (10 x) MTT/PBS u koncentraciji 5 mg/ml, a ploče su vraćene u inkubator kroz sljedeća 4 h. Odmrznutim kontrolama početnog rasta također je dodano 10 µl otopine (1 x) MTT/PBS. Nakon inkubacije, nastali kristali formazana otopljeni su dodavanjem 100 µl 10 % SDS/HCl (0,01 M), a inkubacija je nastavljena preko noći. Peti dan testa ploče su očitane na čitaču mikrotitarskih ploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) na valnoj duljini 570 nm. Na temelju srednjih vrijednosti (svi tretmani su pripremljeni u triplicatu) očitanih apsorbancija tretiranih stanica, kontrolnih stanica i slijepe probe određen je postotak preživljenja prema formuli:

$$\text{vijabilnost (\%)} = \frac{\text{apsorbancija tretiranih stanica} - \text{apsorbancija slijepe probe}}{\text{apsorbancija kontrolnih netretiranih stanica} - \text{apsorbancija slijepe probe}} \times 1$$

**Tablica 1.** Finalne koncentracije derivata N-9 sulfonil purina

Stanične linije BJ, MDCK 1, HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562, Raji, Hut-78, CCRF-CEM, MOLT 4	
Derivati N-9 sulfonil purina	Finalne konc.derivatata N-9 sulfonil purina
<b>M-58/C, TsA, R-73, R-95, MsA, R-194</b>	$10^{-4}$ , $10^{-5}$ mol/L
<b>DS-V-37, DS-V-40-4, M-73, M-57, M-66</b>	$10^{-5}$ , $5 \times 10^{-5}$ mol/L
<b>R-199, R-191</b>	$10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ mol/L
<b>D7-23</b>	$10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ , $10^{-7}$ mol/L

### 3.2.3. Određivanje aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze

Stanična smrt karakterizirana je gubitkom integriteta stanične membrane, pri čemu se citoplazmatski enzimi oslobađaju u okolinu, što može biti znak apoptoze ili nekroze. Laktat dehidrogenaza (LDH) je citoplazmatski enzim prisutan u većini eukariotskih stanica, koji katalizira pretvorbu laktata u piruvat tijekom glikolize. Mjerenje aktivnosti LDH u mediju za uzgoj stanica je citotoksični test, jer je aktivnost enzima direktno proporcionalna broju stanica s oštećenom membranom. Metoda se temelji na kolorimetrijskom mjerenju nastalog ljubičastog formazana kroz dvije enzimatske reakcije. U prvoj reakciji LDH prisutan u staničnom supernatantu katalizira pretvorbu laktata u piruvat, pri čemu se koenzim  $\text{NAD}^+$  reducira u  $\text{NADH}+\text{H}^+$ . U drugoj reakciji katalizator diaphorasa posreduje pretvorbu tetrazolijeve soli INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium) u ljubičasti formazan, pri čemu se  $\text{NADH}+\text{H}^+$  oksidira u  $\text{NAD}^+$ . Aktivnost LDH u mediju za održavanje stanica direktno je proporcionalna količini nastalog formazana.

Citotoksičnost spojeva odabranih na temelju testa vijabilnosti, R-191 i D7-23, utvrđena je na staničnim linijama HeLa i K562 pomoću komercijalno dostupnog kompleta za kolorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima LDH (*LDH Cytotoxicity Detection Kit*, TAKARA BIO INC.). Priprema reakcijskih otopina: s kemikalijama iz sadržaja kita pripremljena je otopina A otapanjem liofiliziranog katalizatora (diaforaza/ $\text{NAD}^+$ ) u sterilne destilirane vode miješanjem na rotatoru kroz 10 min. Otopina B pripremljena je otapanjem smrznute originalne otopine INT boje. Otopine su pohranjene na  $+4^\circ\text{C}$ . Reakcijska otopina C pripremljena je netom prije primjene miješanjem 250  $\mu\text{l}$  otopine A i 11,25 ml otopine B. Prije postavljanja testa, serijskim razrjeđenjem određen je optimalan broj stanica u svakoj jažici. Serijska razrjeđenja pripremljena su za obje stanične linije u mediju s 10 % FBS-a i s 1 % FBS-a. Stanice su izbrojane u Bürker-Türkovoj komorici, a temeljem dobivenih rezultata odabrana je optimalna gustoća (30). Stanična linija K562 nasadena je na ploču za uzgoj stanica u suspenziji s 24 jažice u koncentraciji  $4 \times 10^4$  st/ml u volumenu 800  $\mu\text{l}$ . Adherentna stanična linija HeLa nasadena je na ploču za uzgoj adherentnih stanica s 24 jažice u koncentraciji  $1 \times 10^4$  st/ml u volumenu 1 ml. Stanice su prema preporuci proizvođača i literaturnim podatcima nasadene u mediju s 1 % FBS-a. Serumi bilo kojeg porijekla pokazuju LDH aktivnost. Visoka koncentracija seruma u mediju s kojim se pripremaju stanične suspenzije, može pojačati pozadinski signal (31). Kontrolne stanice nasadene su u istim

uvjetima kao i tretmani. Nasađene ploče ostavljene su preko noći u inkubatoru (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) da se stabiliziraju i prihvate za podlogu. Sutradan, adherentnim stanicama zamijenjen je medij, a stanice su tretirane odabranim spojevima (R-191, D7-23) u radnim koncentracijama koje ostvaruju koncentraciju njihovih IC<sub>50</sub> vrijednosti određenih na temelju testa vijabilnosti. Stanicama u suspenziji dodano je 200 µl svježeg medija s navedenim spojevima u radnim koncentracijama koje će ostvariti njihove IC<sub>50</sub> vrijednosti određene na temelju testa vijabilnosti. Stanice pozitivne kontrole tretirane su s 2 % Triton X-100 (neionski surfaktant) koji će u finalnoj koncentraciji u mediju biti 1 %. Prema preporuci proizvođača, finalna koncentracija Tritona X-100 od 1 % ostvaruje potpuno oštećenje stanične membrane i time maksimalno oslobađanje LDH u staničnu suspenziju. Ploče s tretiranim stanicama ostavljene su kroz 24 h u inkubatoru (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). Nakon inkubacije adherentnim stanicama pažljivo je odpipetirano 150 µl medija iz svake jažice i pohranjeno u čiste epruvete. Ploče sa stanicama u suspenziji su centrifugirane (250 g, 10 min.), a zatim je iz svake jažice odpipetirano 150 µl supernatanta u čiste epruvete. Ploče su vraćene u inkubator, a prikupljeni supernatanti pohranjeni na +4°C. Sutradan, 48 h nakon tretmana stanica postupak je ponovljen. 72 h nakon tretmana stanica supernatant je sakupljen samo s adherentnih stanica. Prema rezultatima optimizacijskih reakcija leukemijske stanice K562 nisu primjerene za dužu inkubaciju. Ostatak testa proveden je u ploči s 96 jažica. Pažljivo je iz svake epruvete sa sakupljenim supernatantom odpipetirano 100 µl i prebačeno u jažice, a zatim je u svaku jažicu dodano 100 µl reakcijske otopine C. Negativne kontrole pripremljene su dodavanjem 100 µl supernatanta netretiranih stanica i 100 µl reakcijske otopine C. Pozitivne kontrole pripremljene su dodatkom supernatanta stanica tretiranih Tritonom X-100 i 100 µl reakcijskog pufera C. Background kontrola pripremljena je dodavanjem 100 µl medija s 1 % FBS-a i 100 µl reakcijske otopine C. Ploče su zaštićene aluminijskom folijom i ostavljene na sobnoj temperaturi 30 min. Apsorbancija je izmjerena na optičkom čitaču mikroploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) na valnoj duljini 450 nm. Na temelju srednjih vrijednosti očitanih apsorbancija za tretirane stanice, kontrolne stanice i pozadinu (eng. background) određen je postotak citotoksičnosti prema formuli:

$$\text{citotoksičnost (\%)} = \frac{\text{apsorbancija tretiranih stanica} - \text{apsorbancija neg.kontrole}}{\text{apsorbancija pozitivne kontrole} - \text{apsorbancija neg.kontrole}} \times 100$$

### 3.2.4. Kolorimetrijsko određivanje kaspaze 3 u staničnom lizatu

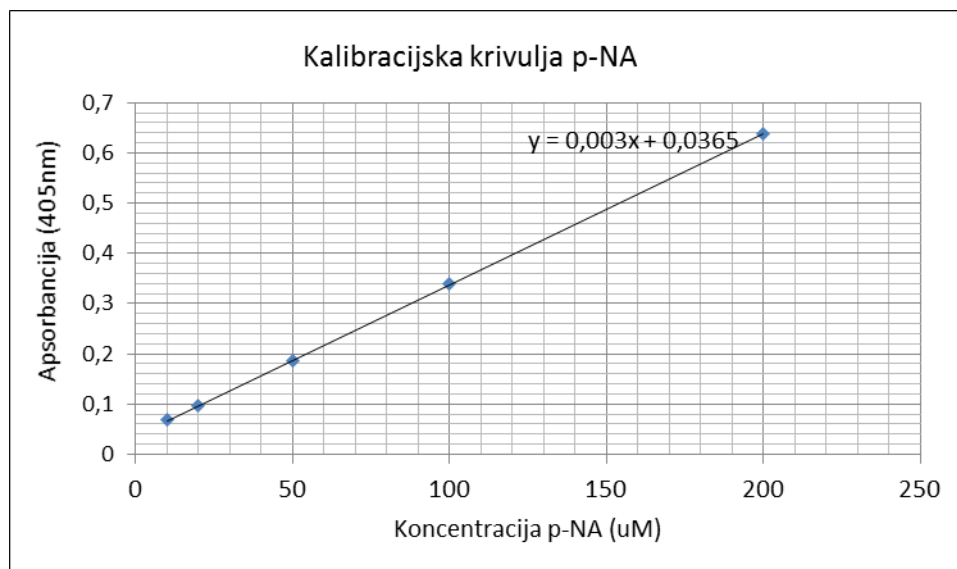
Kaspaza 3 (CPP32/ apopain) izvršna je kaspaza koja zauzima središnju ulogu u oba apoptotska puta. Pripada skupini cisteinskih proteaza koje cijepaju supstrate iza aspartatnog ostatka. Kaspaza 3 je ključna efektorska kaspaza koja pojačava signal inicijatorskih kaspaza. Njena uloga je cijepanje poli (ADP-ribosa) polimeraze (PARP), DNA- ovisne protein kinaze i aktina.

Analiza je obavljena pomoću komercijalno dostupnog kompleta za kolorimetrijsko mjerenje aktivnosti enzima kaspaza 3 *Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric* (Sigma-Aldrich, Inc.) i prema protokolu proizvođača. Za analizu su izdvojeni spojevi R-191 i D7-23 na temelju testa vijabilnosti. Adherentna stanična linija (HeLa) i stanična linija u suspenziji (K562) tretirane su navedenim nosintetiziranim spojevima u koncentracijama njihovih IC<sub>50</sub> vrijednosti.

Metoda kolorimetrijskog određivanja aktivnosti kaspaze 3 u staničnom lizatu temelji se na hidrolizi peptidnog supstrata acetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilina (Ac-DEVD-pNA), (Sigma Aldrich, Inc.) enzimom kaspaza 3 prisutnim u uzorku staničnog lizata, pri čemu nastaje žuto obojeni p-nitroanilin (pNA). Intenzitet boje proporcionalan je aktivnosti enzima, a očitava se pri valnoj duljini 405 nm.

Adherentne stanice su nasadene na ploče sa 6 jažica u koncentraciji 10<sup>5</sup> st/ml u 3 ml medija. Stanice u suspenziji su nasadene u koncentraciji 10<sup>5</sup> st/ml u 2,8 ml medija za uzgoj stanica u suspenziji. Sutradan su stanice tretirane nosintetiziranim spojevima u koncentracijama njihovih IC<sub>50</sub> vrijednosti. Adherentnim stanicama uklonjen je medij i dodan svježi s finalnom koncentracijom odabranih spojeva. Stanicama u suspenziji dodano je 200 µl medija s radnom koncentracijom spojeva koji u ukupnom volumenu ostvaruju koncentraciju IC<sub>50</sub> vrijednosti. Ploče s tretiranim stanicama inkubirane su 24 h u inkubatoru (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). Nakon inkubacije adherentne stanice su isprane s 1 ml PBS-a, tripsinizirane s 0,5 ml tripsina, a zatim sakupljene s 1 ml svježeg medija. Volumeni su povezani i pohranjeni u epruvetu volumena 15 ml. Stanice u suspenziji prebačene su u ukupnom volumenu medija u epruvetu od 15 ml. Stanične suspenzije su centrifugirane (600 g, 4 min., 4°C), a supernatant je odbačen. Stanični talozi su resuspendirani u 100 µl pripremljenog pufera za lizu (1 x) (Sigma Aldrich, Inc.), a zatim inkubirani na ledu 20 min. Nakon inkubacije, lizirane stanice su centrifugirane (16 000 g, 15 min., 4°C). Supernatanti su prebačeni u nove epruvete. Kolorimetrijsko mjerenje nastavljeno je u pločama s 96 jažica.

U jažice je dodano 85  $\mu\text{l}$  reakcijskog pufera (Sigma Aldrich, Inc.), 5  $\mu\text{l}$  staničnog lizata tretiranih stanica i 10  $\mu\text{l}$  Ac-DEVD-pNA supstrata (Sigma-Aldrich). Pozitivna kontrola je pripremljena dodavanjem 5  $\mu\text{l}$  otopine kaspaza 3 pozitivne kontrole (Sigma Aldrich, Inc.) koncentracije 5  $\mu\text{l/ml}$ , 75  $\mu\text{l}$  reakcijskog pufera i 10  $\mu\text{l}$  Ac-DEVD-pNA supstrata. Negativne kontrole (netretirane stanice) pripremljene su s inhibitorom (*Ac-DEVD-CHO Inhibitor*, Sigma Aldrich Inc.) i bez dodanog inhibitora. Kaspazu 3 specifično i ireverzibilno inhibira sintetički tetrapeptid Ac-DEVD-CHO (*Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide*). Nakon što su nanese sve reakcijske otopine na ploču s 96 jažica, ploča je zaštićena aluminijskom folijom i odložena u inkubator (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) tijekom 70 minuta. Apsorbancije su izmjerene pomoću optičkog čitača (BioRad) na valnoj duljini 405 nm ( $\epsilon^{\text{Mm}} = 10.5$ ) pri kojoj oslobođeni pNA pokazuje najveću apsorbanciju.



**Slika 2. Kaspaza 3 koncentracijska krivulja.** Serijsko razrjeđenje stock otopine kaspaza 3 enzima (Sigma-Aldrich). Apsorbancija očitana na 415 nm; optički čitač iMark<sup>TM</sup>Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad).

Aktivnost kaspaze 3 određena je prema p-nitroanilin kalibracijskoj krivulji koja je formirana na temelju apsorbancija standardnog uzorka (p-Nitroaniline, SigmaAldrich,Inc.) priređenih serijskim razrjeđenjem stock otopine kaspaza 3 enzima u različitim koncentracijama. Komercijalni uzorak *p-Nitroaniline Standard* (Sigma-Aldrich) 1 mg otopljen je u 720  $\mu\text{l}$  DMSO otapala, alikvotiran i pohranjen na -20°C.

### 3.2.5. Mjerenje mitohondrijskog membranskog potencijala ( $\delta\psi$ ) protočnom citofluorimetrijom

Kolaps mitohondrijskog elektrokemijskog membranskog potencijala rani je pokazatelj pokrenute apoptotske stanične smrti. Mitohondrijski membranski potencijal ( $\Delta\Psi$ ) procijenjen je bojenjem stanica JC-1 fluorescentnom bojom (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarboxyanine iodide), a zatim analiziran FACSCalibur (Beckton Dickinson, SAD) protočnim citofluorimetrom. Protočna citofluorimetrija (*eng. Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS*) je metoda kvantitativne analize stanica u otopini. FACS uređaj mjeri emisiju fluorescencije obilježenih stanica pri prolasku pored izvora ekscitacije.

JC-1 je lipofilna, kationska boja koja zbog pozitivnog električnog naboja prolazi kroz membranu mitohondrija očuvanog elektrokemijskog gradijenta (unutrašnjost mitohondrija je negativno naelektrizirana) te se nakuplja u matriksu mitohondrija u formi agregata koji fluoresciraju crveno (detektiraju se na FL-2 kanalu FACSCalibur). U apoptotičnim stanicama s narušenim membranskim potencijalom mitohondrija ne događa se nakupljanje JC-1 boje u mitohondriju, već boja ostaje raspršena u citoplazmi stanice u monomernoj formi koja fluorescira zeleno (detektira se na FL-1 kanalu FACSCalibur). Povećanje zelene fluorescencije pokazatelj je depolarizacije membrane mitohondrija i pada  $\Delta\Psi$  mitohondrija. Povećanje crvene fluorescencije znak je hiperpolarizacije membrane mitohondrija i porasta  $\Delta\Psi$  mitohondrija (32).

Analiza je obavljena pomoću komercijalno dostupnog kompleta za detekciju promjene mitohondrijskog membranskog potencijala *Mitochondria Staining Kit For mitochondrial potential changes detection* (Sigma-Aldrich, Inc.) i prema protokolu proizvođača. Za analizu su izdvojeni spojevi R-191 i D7-23 na temelju testa vijabilnosti. Adherentna stanična linija (HeLa) i stanična linija u suspenziji (K562) tretirane su navedenim novosintetiziranim spojevima u koncentracijama njihovih  $IC_{50}$  vrijednosti.

Stanice su nasadene u pločama sa šest bunarića ravnog dna; adherentne stanice u koncentraciji  $10^5$  st./ml u volumenu 3 ml, stanice u suspenziji u koncentraciji  $0,5 \times 10^6$  st./ml u 3 ml medija. Inkubacija tretiranih stanica trajala je 24 h u inkubatoru (37°C, 5 %  $CO_2$ ). Kontrolne stanice nasadene su u petrijevke i izložene djelovanju UV-zračenja kroz 20 minuta.

JC-1 boja je liofilizirani puder koji je otopljen u 200  $\mu$ l DMSO-a. Pripremljena 200 x JC-1 stock otopina (1 mg/ml) je alikvotirana i pohranjena na -20°C. Neposredno prije sakupljanja

staničnih suspenzija pripremljena je otopina za bojenje. Otopljeno je 5  $\mu$ l JC-1 (200x) stock otopine u 800  $\mu$ l ultra pročišćene vode, a zatim je dodano 200  $\mu$ l JC-1(1x) pufera za bojenje.

Nakon tretmana navedenim spojevima i 24 h inkubacije, adherentne stanice su isprane PBS-om, tripsinizirane i sakupljene u ukupnom mediju. Stanice u suspenziji sakupljene su u ukupnom volumenu medija.

Stanične suspenzije (1 ml) pomiješane su s 1 ml otopine za bojenje stanica, a zatim inkubirane 20 min. u inkubatoru (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). Primijenjeni komplet za analizu sadrži Valinomycin koji mitohondrijsku membranu čini propusnom za K<sup>+</sup>ione, čime se narušava membranski potencijal mitohondrija i onemogućava nakupljanje agregata JC-1 boje. Pozitivna kontrola s Valinomycinom pripremljena je miješanjem 1 ml otopine za bojenje i 1  $\mu$ l Valinomicina (1 mg/ml). Nakon inkubacije stanične suspenzije su centrifugirane (600 g, 4 min., 4°C). Obojene stanične suspenzije su od viška JC-1 boje dva puta (na ledu) isprane u 1 ml hladnog JC-1 (1 x) puferu. Konačno su obojene stanice resuspendirane u 1 ml JC-1 (1 x) pufera i odmah analizirane FACSCalibur protočnim citofluorimetrom. Kroz uređaj je propušteno 10 000 stanica po uzorku. Zelena i crvena fluorescencija su očitane na FL1/FL2 kanalu, a zatim analizirane CellQuestPro programom.

### 3.3. Statistička obrada rezultata

Baza podataka dobivenih rezultata i deskriptivna statistika kreirana je u programu *Microsoft Excel 2013*. Rezultati istraživanja analizirani su primjenom statističkog programa *Statistica for Windows v. 11.0*. Svi pokusi testa vijabilnosti provedeni su u triplikatu kroz tri odvojena testiranja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SV) sa standardnom devijacijom ( $\pm$  SD) rezultata triplikata tretiranih kultura i kontrola kroz tri odvojena testiranja. Za analizu statističke značajnosti razlike između tretiranih i kontrolnih kultura korištena je analiza varijance (ANOVA) praćena Mann-Whitney testom uz statističku značajnost  $p < 0,05$ . Svi ostali eksperimenti provedeni su u triplikatu. Rezultati su prikazani u obliku grafova s pridruženim objašnjenjima.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Određivanje antiproliferativnog učinka derivata N-9 sulfonil purinskih nukleozida

Vijabilnost odabranih staničnih linija (BJ, MDCK1, HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562, Raji, Hut-78, CCRF-CEM, MOLT4) tretiranih različitim koncentracijama novosintetiziranih derivata N-9 sulfonil purina ispitana je MTT testom. Rezultati testa prikazani su na Slikama 3a - 3p. Na temelju srednjih vrijednosti rezultata testova pripremljenih u triplikatu kroz tri neovisna pokusa formirani su grafovi koji prikazuju postotak rasta tretiranih stanica u odnosu na kontrolne netretirane stanice koje su arbitražno definirane kao 100 % rast. Citotoksični učinak novosintetiziranih derivata N-9 sulfonil purina prikazan je u obliku  $IC_{50}$  vrijednosti (Tablica 2.).  $IC_{50}$  je koncentracija citotoksične tvari koja uzrokuje 50 % inhibiciju rasta stanica u kulturi.

**Tablica 2.** Rast normalnih i tumorskih stanica izloženih ispitivanim spojevima nakon 72 sata izlaganja

	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)					
	HeLa	CaCo-2	MDCK1	Raji	K562	Hut78
DS-V-37	>50	>50	>50	51.3 $\pm$ 11.6	>50	54 $\pm$ 4.4
R-194	58 $\pm$ 6.3	70.2 $\pm$ 8.3	74.4 $\pm$ 8.4	50.9 $\pm$ 1.2	46.9 $\pm$ 1.1	83 $\pm$ 24.2
DS-V-40-4	>50	>50	>50	53.3 $\pm$ 4.7	>50	>50
M-57	>50	>50	>50	29.1 $\pm$ 9.2	51.6 $\pm$ 1.5	42.9 $\pm$ 4.9
M-58/C	>100	>100	>100	66.5 $\pm$ 1.0	112.9 $\pm$ 47.6	76.2 $\pm$ 18.4
M-66	>50	>50	>50	39.9 $\pm$ 2.9	32.5 $\pm$ 1.9	25.4 $\pm$ 11.8
M-73	>50	>50	>50	19.9 $\pm$ 2.6	27.1 $\pm$ 4.3	27 $\pm$ 10
M-76	51.2 $\pm$ 6.9	6.7 $\pm$ 0.2	58.1 $\pm$ 13.8	4.8 $\pm$ 0.1	4.9 $\pm$ 0.7	3.2 $\pm$ 0.5
MsA	>100	>100	>100	86.2 $\pm$ 21.9	>100	>100
R-191	48,2 $\pm$ 5,4	12,4 $\pm$ 5,3	7,1 $\pm$ 1,7	5,3 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,1
R-195	>100	>100	>100	>100	>100	84,5 $\pm$ 7,7
R-73	>100	>100	>100	66.2 $\pm$ 11.7	78.7 $\pm$ 5.9	64.2 $\pm$ 7.5
R-95	>100	>100	>100	73.9 $\pm$ 20.6	84.2 $\pm$ 14.7	61.2 $\pm$ 14.9
TsA	>100	>100	>100	72.5 $\pm$ 8.3	75.4 $\pm$ 1.8	73.3 $\pm$ 12.4
D7-23	53.5 $\pm$ 10.1	9.2 $\pm$ 2.8	33.3 $\pm$ 18.3	3.7 $\pm$ 2.5	8.7 $\pm$ 2.1	1.3 $\pm$ 1

Srednje vrijednosti  $IC_{50} \pm$  SD triju neovisnih mjerenja provedenih u triplikatu

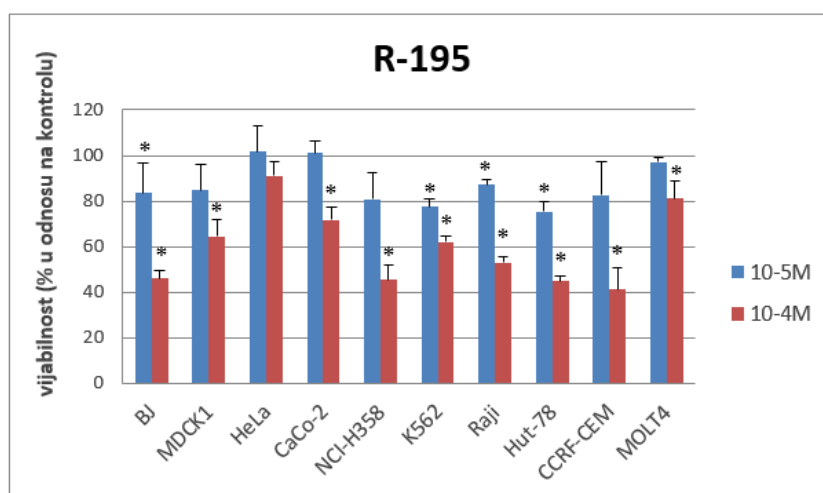


**Tablica 3.** Rast tumorskih stanica HeLa i K562 izloženih ispitivanim spojevima nakon 24, 48 i 72 sata izlaganja

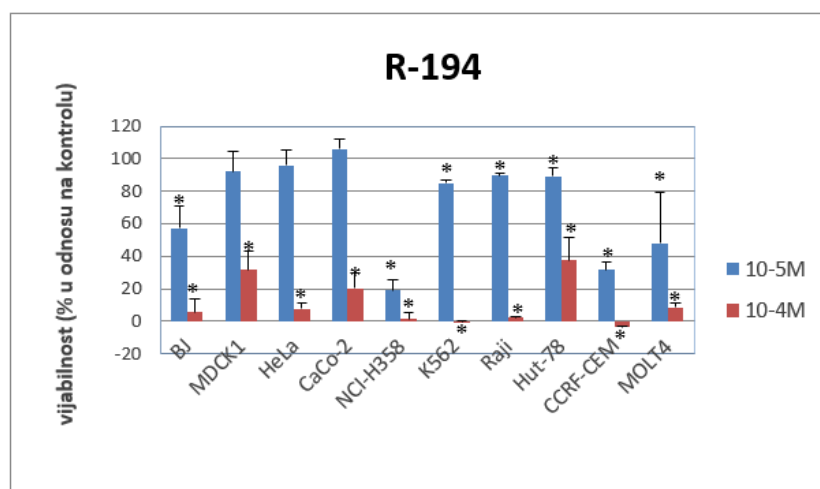
		HeLa	K562
R-191	24h	50.8 ±9	3.8 ±0.2
	48h	40.7 ±10.9	6.6 ±0.6
	72h	48.2 ±5.4	4.9 ±0.2
R-199	24h	34.2 ±14	1.2 ±0.3
	48h	47.1 ±4.2	3.4 ±0.4
	72h	44.9 ±2.3	4.9 ±0.1

Srednje vrijednosti  $IC_{50} \pm SD$  triju neovisnih mjerenja provedenih u triplicatu

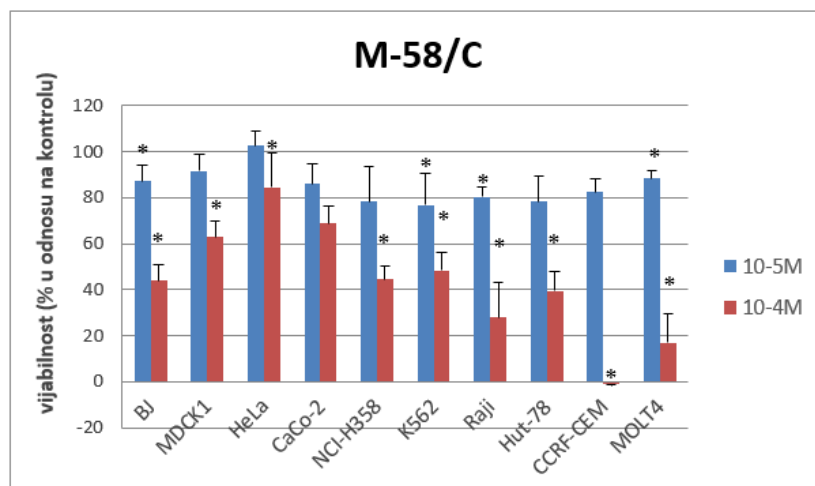
Novosintetizirani derivati N-9 sulfonilpurina na nekim staničnim linijama ostvaruju očitu inhibiciju rasta, dok na pojedinim staničnim linijama ne pokazuju inhibicijski učinak ili djeluju blago proliferativno.



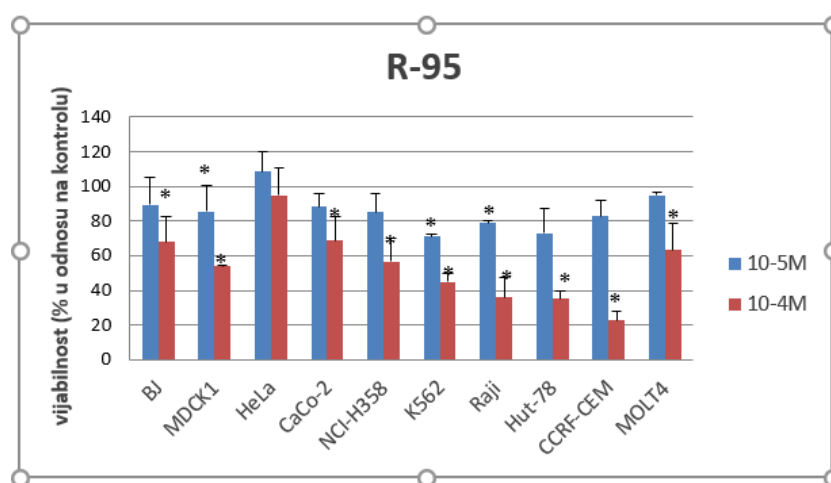
(3a)



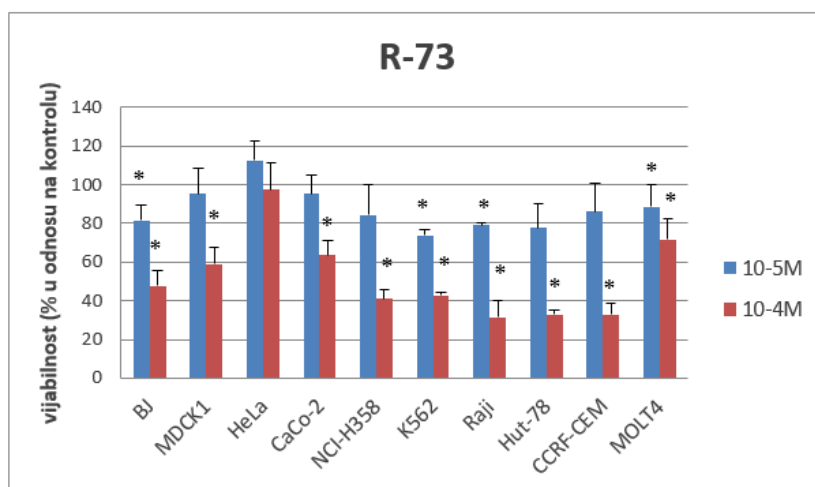
(3b)



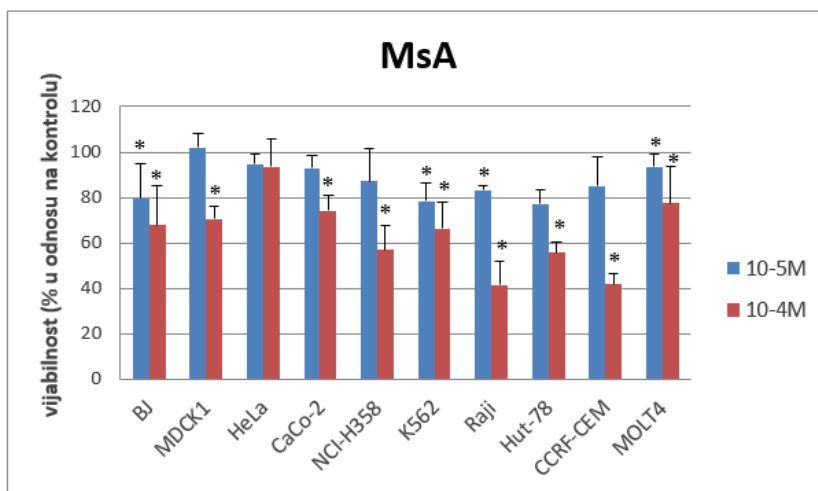
(3c)



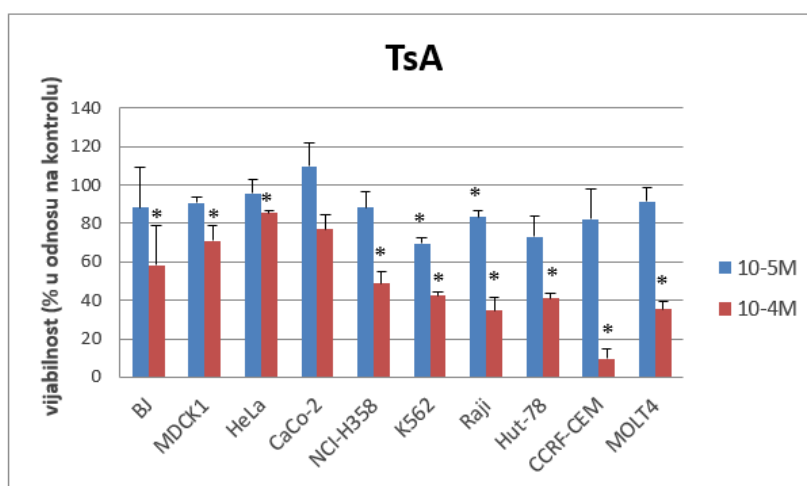
(3d)



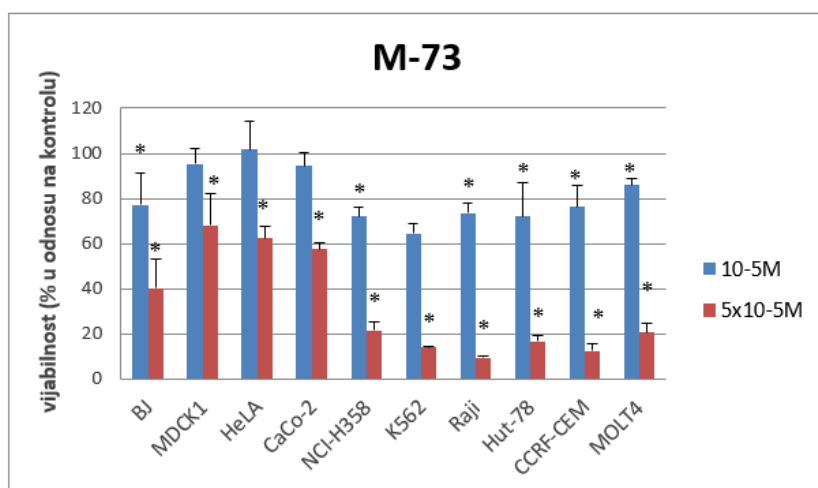
(3e)



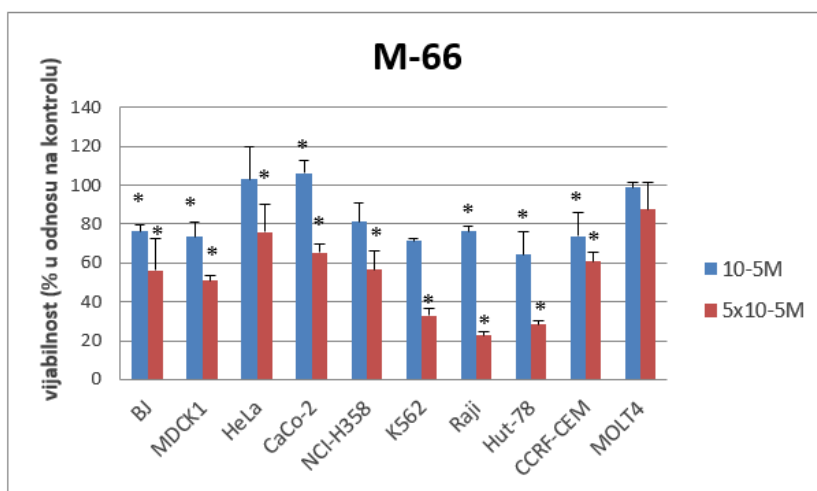
(3f)



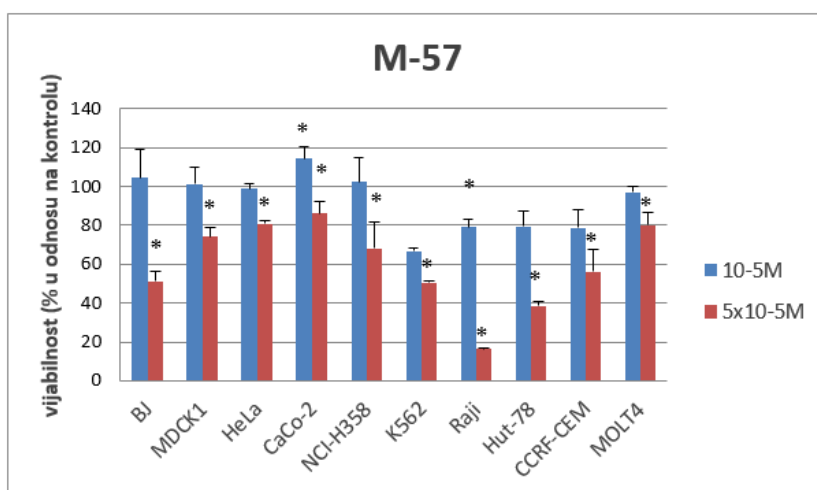
(3g)



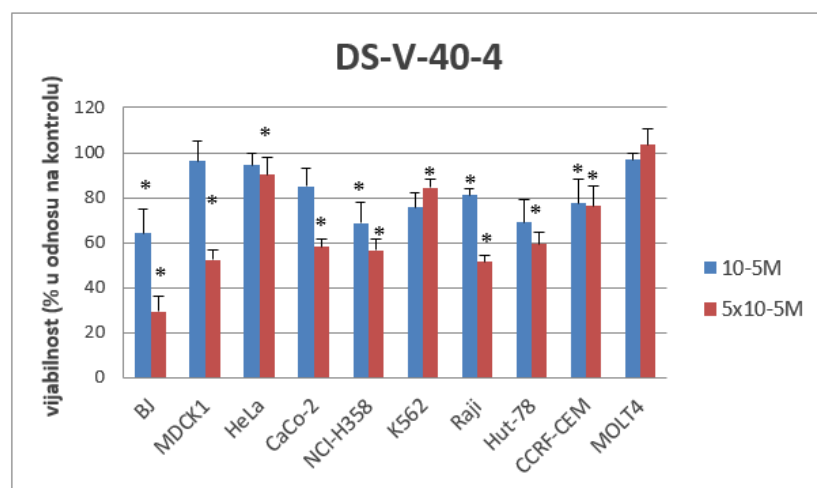
(3h)



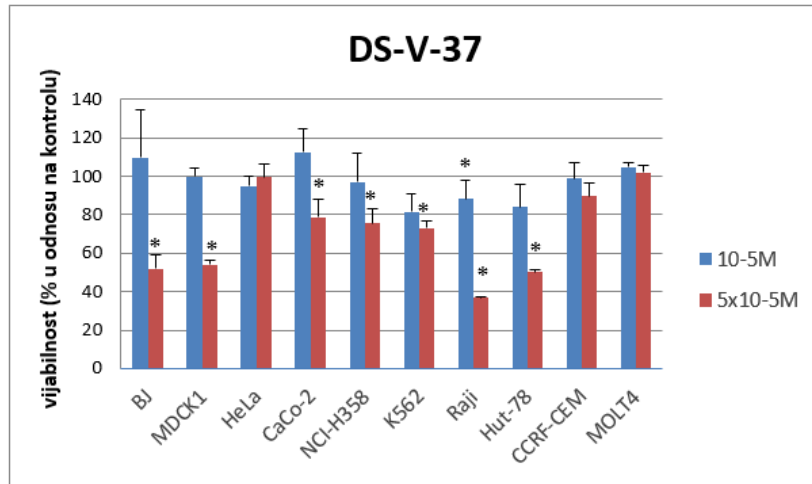
(3i)



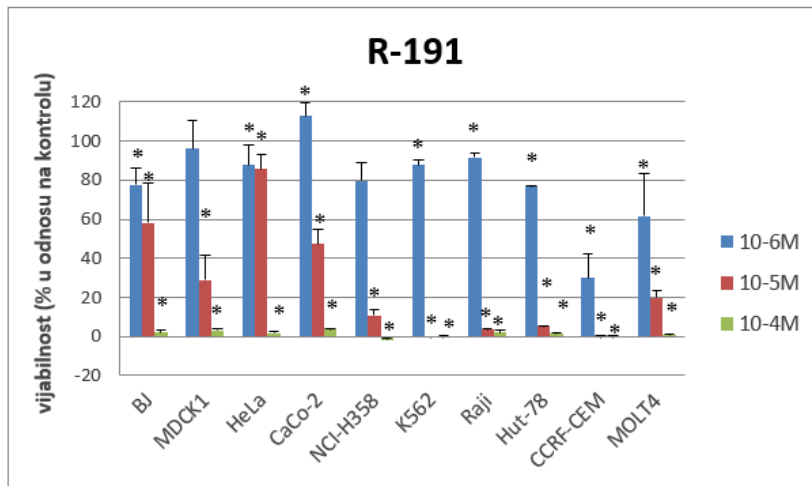
(3j)



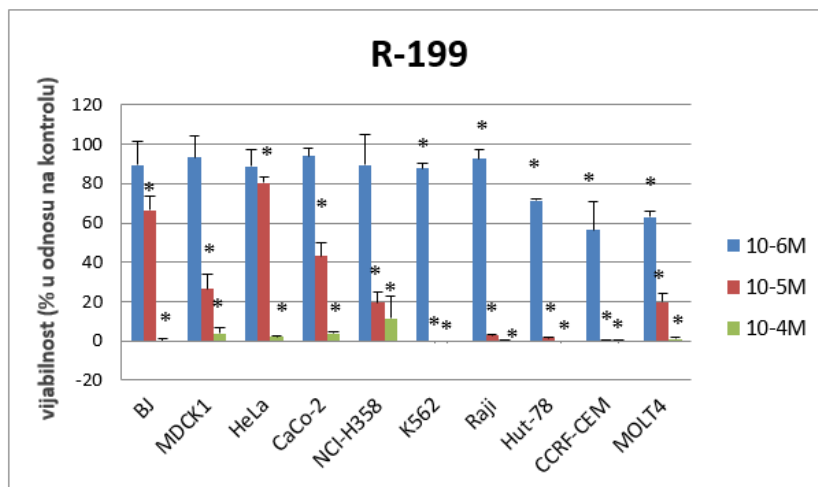
(3k)



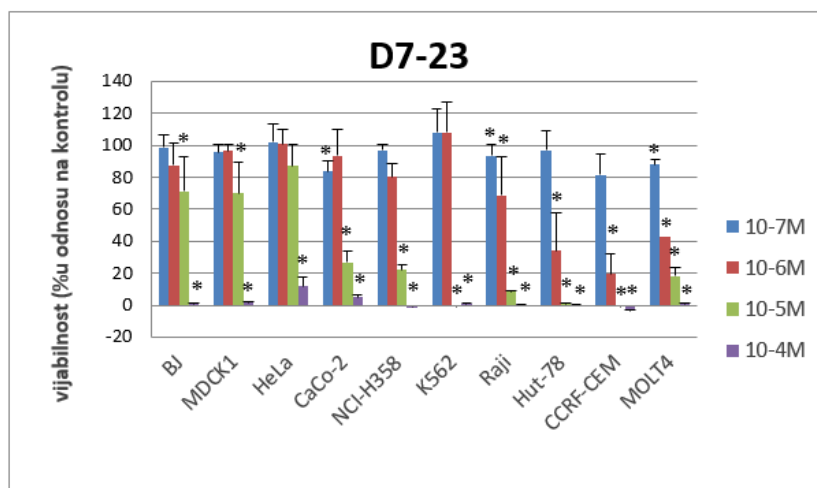
(3l)



(3m)



(3n)



(3p)

**Slika 3.** Vijabilnost tretiranih stanica određena je MTT testom na odabranim staničnim linijama. Stanice su izložene djelovanju N-9 sulfonilpurina u različitim koncentracijama kroz 72 h. Rezultati su prikazani kao udio vijabilnih stanica tretmana u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

Spoj pod nazivom **R-195** (Slika 3a) primijenjen u koncentraciji  $10^{-5}$  M ne pokazuje osobit inhibicijski učinak. Statistički značajniji inhibicijski učinak veći od 20 % pokazao je na leukemijskim staničnim linijama K562 i Hut 78. Primijenjen u višoj koncentraciji  $10^{-4}$  M, pokazao je statistički značajan učinak na inhibiciju rasta staničnih linija leukemija i limfoma K562, Raji, Hut 78., osobito na CCRF-CEM 60 % i Hut78 oko 55 %. Na staničnoj liniji MOLT4 inhibicija je bila 20 %. Na adherentne tumorske linije u toj koncentraciji pokazuje inhibiciju staničnih linija HeLa i CaCo-2 za oko 25 %, a osobito na NCI-H358 više od 50 %. U toj koncentraciji inhibira i rast normalnih staničnih linija BJ za više od 55 % i MDCK za gotovo 40 %.

Spoj **R-194** (Slika 3b) već pri nižoj koncentraciji  $10^{-5}$  M je ostvario značajan inhibicijski učinak na leukemijske stanice CCRF-CEM, 75 % i MOLT4 od oko 55 %. Izrazito inhibicijski je djelovao na tumorsku liniju NCI-H358 za oko 80 % i na normalne fibroblaste BJ za gotovo 60 %. Pri višoj koncentraciji  $10^{-4}$  M izazvao je gotovo potpunu inhibiciju rasta svih staničnih linija. Staničnim linijama K562 i CCRF-CEM rast je potpuno zaustavljen.

Statistički značajan inhibicijski učinak pri koncentraciji  $10^{-5}$  M spoj **M 58/C** (Slika 3c) ne pokazuje. Minimalnu inhibiciju staničnog rasta pokazao je na staničnoj liniji K562 za oko 20 %. Primijenjen u većoj koncentraciji  $10^{-4}$  M pokazao je vidljiv inhibicijski učinak na leukemijske stanice MOLT4 za više od 80 %, dok stanični rast CCRF-CEM potpuno zaustavlja. Statistički značajnu inhibiciju pokazao je na staničnim linijama NCI-H358 i BJ od oko 60 %.

Spoj **R-95** (Slika 3d) pri koncentraciji  $10^{-5}$  M ne pokazuje značajniju inhibiciju, tek slabiji učinak ostvaruje na K562, oko 25 %. Pri koncentraciji  $10^{-4}$  M statistički značajniji učinak ostvaruje na stanicama leukemija i limfoma: K562 od gotovo 60 %, Raji i Hut 78 više od 60 %, CCRF-CEM 80 %, MOLT4 60 %. Značajniju inhibiciju pokazuje na tumorskim linijama CaCo-2 30 % i NCI-H358 za više od 40 %, dok na HeLa stanicama ne pokazuje osobit inhibicijski učinak. Značajnije je zaustavio i rast normalnih staničnih linija BJ 35 % i MDCK1 od gotovo 50 %.

Blagi inhibicijski učinak pokazuje spoj **R-73** (Slika 3e) pri koncentraciji  $10^{-5}$  M na linijama K562 i Raji 20 %. Na normalnoj staničnoj liniji BJ ostvaruje inhibicijski rast od oko 20 %, dok na HeLa stanice djeluje proliferativno. Pri većoj koncentraciji  $10^{-4}$  M ostvaruje zamjetan inhibicijski učinak na stanične linije leukemija i limfoma: K562 60 % te Raji, Hut78 i CCRF-CEM oko 70 %. Zamjetno inhibira i rast NCI-H358 60 % i CaCo-2 za gotovo 40 %. Ozbiljno inhibira rast normalnih linija BJ 55 % te MDCK1 40 %. Na HeLa stanice nema inhibicijski učinak.

Spoj **MsA** (Slika 3f) pri koncentraciji  $10^{-5}$  M ima tek blagi inhibicijski učinak od oko 20 % na stanične linije K562 i Hut78 te BJ. Statistički značajnu inhibiciju rasta pokazuje pri većoj koncentraciji  $10^{-4}$  M na stanične linije leukemija i limfoma Raji i CCRF-CEM od oko 60 %, Hut78 55 %, K562 30 %, a na MOLT4 tek nešto više od 20 %. Statistički značajnije inhibira rast NCI-H358 40 % te rast BJ 20 % i MDCK1 30 %, a proliferaciju stanične linije HeLa gotovo uopće ne inhibira.

Značajniju inhibiciju proliferacije pri nižoj koncentraciji  $10^{-5}$  M pokazuje spoj **TsA** (Slika 3g) na staničnim linijama Hut78 i K562 od oko 30 %. Nakon izlaganja stanica većoj koncentraciji  $10^{-4}$  M, spoj vidno smanjuje proliferaciju staničnih linija leukemija i limfoma: K562 i Hut78 za oko 60 %, Raji i MOLT4 za gotovo 60 %. Gotovo je potpuno inhibirao rast linije CCRF-CEM 90 %. Statistički značajan učinak je pokazao na staničnoj liniji NCI-H358, gotovo 60 %,

kao i na linijama BJ 40 % i MDCK1 35 %. Najmanje citotoksično djelovanje je zabilježeno na HeLa stanicama, gotovo 20 %.

Spoj **M-73** (Slika 3h) pri koncentraciji  $10^{-5}$  M ima minimalan inhibicijski učinak na većinu staničnih linija. Nakon izlaganja stanica većoj koncentraciji  $5 \times 10^{-5}$  M spoj pokazuje izražen antiproliferacijski učinak na humane stanice leukemija i limfoma, 80 % i više. Značajno je usporen i rast stanične linije NCI-H358, 80 %. Na staničnim linijama HeLa i CaCo-2 pokazuje umjereniji inhibicijski učinak za oko 40 %. Proliferacija normalne stanične linije BJ vidno je umanjena za 60 %, a MDCK1 za 35 %.

Spoj **M-66** (Slika 3i) pri koncentraciji  $10^{-5}$  M na većini staničnih linija ne pokazuje osobit inhibicijski učinak, izuzev Hut78 30 %. Na staničnoj liniji CaCo-2 pokazuje stimulaciju proliferacije. Pri koncentraciji  $5 \times 10^{-5}$  M znatno inhibira rast leukemijskih staničnih linija: K562 i Hut78 oko 70 %, Raji 80 %. Inhibira rast NCI-H358 45 %, CaCo-2 55 % i HeLa za 25 %. Pri toj koncentraciji značajno je inhibiran rast normalnih staničnih linija: BJ 45 % i MDCK1 50 %.

Testirane stanične linije ne pokazuju značajniju osjetljivost na spoj **M-57** (Slika 3j) primijenjen u koncentraciji  $10^{-5}$  M. Kod adherentnih staničnih linija potiče proliferaciju, osobito kod CaCo-2, od oko 20 %. Pri koncentraciji  $5 \times 10^{-5}$  M citotoksični učinak na leukemijske stanice postaje vidljiv, osobito na Raji, 85 %, ali i kod normalne stanične linije BJ za oko 50 %.

Spoj **DS-V-40-4** (Slika 3k) ne pokazuje izraženiji inhibicijski učinak pri koncentraciji  $10^{-5}$  M. Izdvojiti se može inhibicijski učinak na staničnu liniju BJ, od gotovo 40 %. Pri većoj koncentraciji  $5 \times 10^{-5}$  M uočava se statistički značajan inhibicijski učinak na linije Raji 60 % i Hut78 50 %, ali i na BJ 70 % i MDCK1 50 %.

Primijenjen u koncentraciji  $10^{-5}$  M spoj **DS-V-37** (Slika 3l) gotovo i nema inhibicijski učinak na testirane stanice, ali nakon izlaganja stanica koncentraciji  $5 \times 10^{-5}$  M uočava se značajna inhibicija rasta stanica Raji za više od 60 % i Hut78 50 %. Vidno je inhibirana proliferacija i normalnih stanica BJ i MDCK1 za 50 %.

Spoj **R-191** (Slika 3m) je razgradni produkt spoja **R-199** (Slika 3n) nakon odvajanja morfolinskog prstena (R1) supstituiranog na sulfonilnu grupu (Slika 1). Strukturna sličnost vidljiva je i usporediva i kroz učinke na proliferaciju. Pri najnižoj koncentraciji  $10^{-6}$  M statistički značajniji učinak uočljiv je samo na CCRF-CEM liniji; R-199 od oko 45 %, R-199



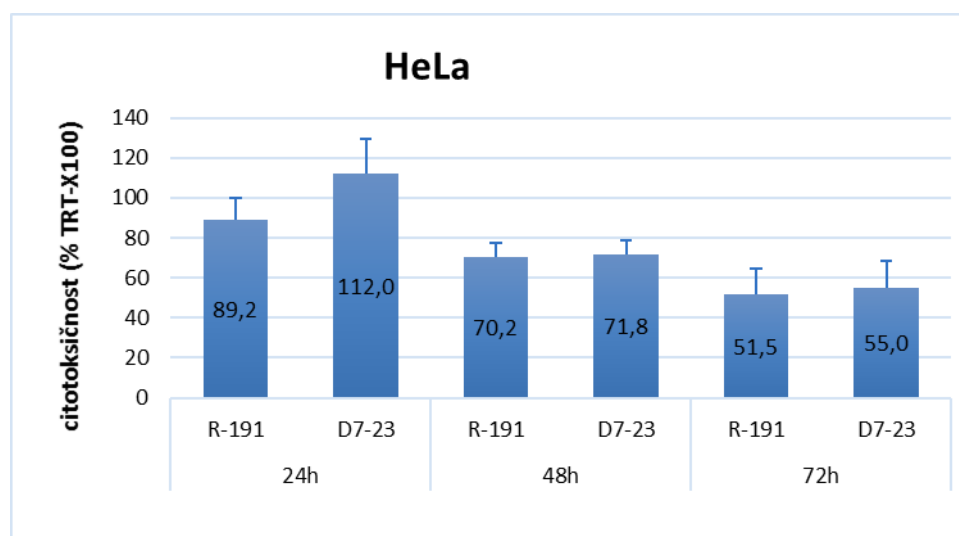
70 %. Rezultati inhibicije rasta pri koncentraciji  $10^{-5}$  M gotovo su identični. Opet se izdvajaju rezultati za CCRF-CEM staničnu liniju; R-199 inhibira stanični rast 45 %, R-191 70 %. Statistički značajniji su i rezultati za MOLT4 40 % kod oba spoja. Najveća primijenjena koncentracija  $10^{-4}$  M oba spoja potpuno je inhibirala rast svih staničnih linija.

Inhibicijsko djelovanje spoja **D7-23** (Slika 3p) u koncentraciji  $10^{-7}$  M je zanemarivo za sve testirane stanične linije. Statistički značajna inhibicija staničnog rasta uočena je pri koncentraciji  $10^{-6}$  M: Hut78 65 %, CCRF-CEM 80 %, MOLT4 gotovo 60 %. Pri koncentraciji  $10^{-5}$  M gotovo potpuno je inhibiran rast staničnih linija leukemija i limfoma, uz relativno pošteđan učinak na normalne stanične linije BJ i MDCK1 od oko 30 %. Ozbiljno je inhibiran i rast CaCo-2 od gotovo 80 % i NCI-H358 80 %. Potpuna inhibicija proliferacije svih staničnih linija nastupila je nakon djelovanja spoja u koncentraciji  $10^{-4}$  M.

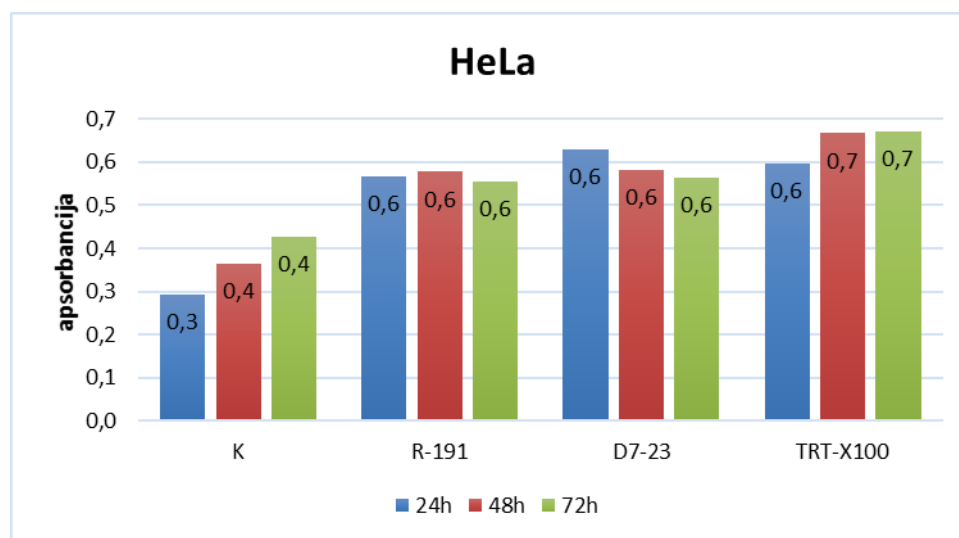
Sažimanjem rezultata uočava se izraženo citotoksično djelovanje spojeva pri koncentracijama  $10^{-4}$  M i  $5 \times 10^{-5}$  M na stanične linije leukemija i limfoma. Tumorske stanične linije CaCo-2 i osobito HeLa pokazuju relativnu otpornost i očuvan proliferativni potencijal. Nažalost, u većini slučajeva zaustavljen je rast i normalnih staničnih linija. Pažnju privlače spojevi R-199, R-191 i D7-23 koji pri koncentraciji  $10^{-5}$  M gotovo potpuno inhibiraju rast svih staničnih linija leukemija i limfoma te epitelnih stanica bronhioalveolarnog karcinoma NCI-H358, uz relativno pošteđan učinak na normalne stanice. Na temelju pretpostavke da je R-191 biološki aktivan produkt razgradnje spoja R-199 i rezultata antiproliferativnog djelovanja, za daljnje ispitivanje odabrani su spojevi R-191 i D7-23. Zbog izraženog citotoksičnog djelovanja odabranih spojeva na stanice humanih leukemija i limfoma kao *in vitro* model daljnjeg ispitivanja odabrana je stanična linija kronične mijeloidne leukemije K562. Stanična linija epitelnih stanica karcinoma cerviksa HeLa, zbog pokazane otpornosti na djelovanje istoimenih spojeva odabrana je kao kontrolni model.

#### 4.2. Evaluacija citotoksičnog učinka derivata N-9 sulfonil purina R191 i D7-23 mjerenjem aktivnosti LDH u mediju

Test s laktat dehidrogenazom - LDH determinira citotoksičnost apliciranog spoja iz perspektive različite od MTT testa. MTT test daje podatak da je proliferacija stanica zaustavljena ili se odvija i dalje. Stanice koje su doživjele ireverzibilno oštećenje stanične membrane sposobne su još neko vrijeme pokazivati funkcionalne sposobnosti. Rezultati MTT testa ne pružaju nikakvu informaciju o tipu stanične smrti. Smanjena vijabilnost stanica nakon tretmana sa spojevima R-191 i D7-23 u odnosu na kontrolne netretirane stanice ukazuje na citotoksično djelovanje. Mjerenjem aktivnosti enzima laktat dehidrogenaza u hranjivom mediju s 1 % FBS-a, provjereno je oštećenje stanične membrane djelovanjem spojeva. Povezivanjem rezultata MTT testa i podataka o citotoksičnom djelovanju spojeva polazište je potrage za načinom umiranja tretiranih stanica.



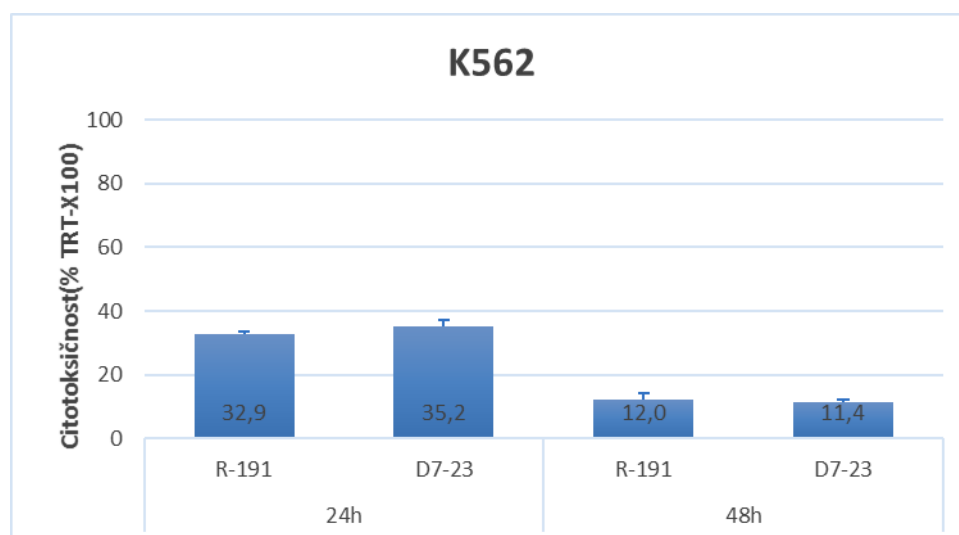
**Slika 4.** Stanice HeLa tretirane su kroz 24 h spojevima R-191 i D7-23 u konc. njihovih IC50 vrijednosti. Aktivnost LDH u mediju je mjerena nakon 24 h, 48 h i 72 h. Graf prikazuje udio tretiranih stanica s oštećenom membranom u odnosu na stanice tretirane s Triton X-100. Grafovi su formirani na temelju srednjih vrijednosti rezultata testova pripremljenih u triplikatu.



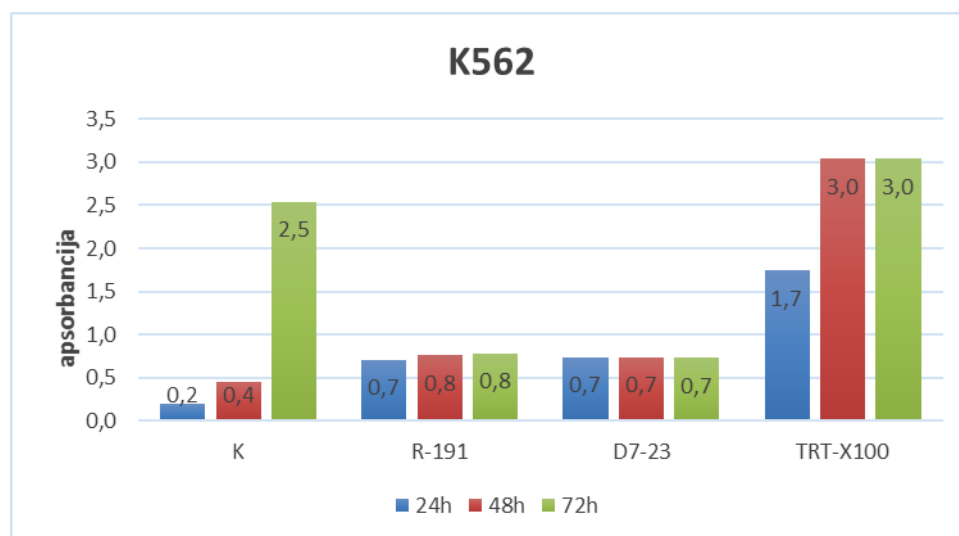
**Slika 5.** Promjena apsorbancije staničnog lizata HeLa stanica nakon 24 h, 48 h i 72 h inkubacije sa spojevima R-191 i D7-23 u konc. IC<sub>50</sub>. Apsorbancija je mjerena na 450 nm.

Iz Slike 4. iščitava se da vrijednosti otpuštenog LDH iz tretiranih HeLa stanica opadaju kroz vrijeme i proporcionalno tomu udio stanica s oštećenom membranom. Ako promatramo samo rezultate citotoksičnosti koji se računaju na temelju apsorbancije tretiranih stanica u odnosu prema apsorbanciji stanica tretiranih s Tritonom X-100 prema formuli navedenoj u metodama, prikazani rezultati nisu kompatibilni s rezultatima MTT testa. Iako je koncentracija spojeva i vrijeme izlaganja različito, graf citotoksičnosti ne može pokazivati silazni trend citotoksičnosti, jer je test vijabilnosti pokazao gotovo potpuni zastoj proliferacije. Slika 6. pokazuje razliku u dinamici promjene apsorbancija kod stanica tretiranih Tritonom X-100 i tretiranih spojevima. Promjena apsorbancije stanica tretiranih spojem R-191 nakon 24 h i 48 h je minimalna (2 %), a nakon 24 h i 48 h razlike u apsorbanciji gotovo i nema. Promjena apsorbancije stanica tretiranih spojem D7-23 nakon 24 h i 48 h je minimalna od oko 2 %, a nakon 24 h i 48 h razlika je zanemariva. Razlika apsorbancije stanica tretiranih Tritonom X-100 nakon 24 h i 48 h iznosi 15 %, a između 48 h i 72 h razlike u apsorbanciji nema. Apsorbancija kontrolnih netretiranih stanica je porasla između 24 h i 48 h 30 %, a između 48 h i 72 h 37 %. Kad se tako nerazmjerni rezultati mjerenja apsorbancija uvrste u formulu za izračunavanje citotoksičnosti, graf pokazuje prividan pad aktivnosti LDH. Na temelju podataka o citotoksičnosti bitno oštećenje stanične membrane dogodilo se u prvih 24 h nakon tretmana stanica. Slabija dinamika otpuštanja LDH kroz vrijeme može biti i

posljedica zaustavljene proliferacije tretiranih stanica, jer kontrolne stanice pokazuju porast apsorbancije kroz vrijeme, što je posljedica nastavljene proliferacije i spontanog otpuštanja enzima u medij. Citotoksično djelovanje Tritona X-100 nije osobito snažnije u odnosu na djelovanje spojeva, što govori u prilog o ozbiljnom citotoksičnom učinku testiranih spojeva, a potvrđuju i podatci MTT testa.



**Slika 6.** Stanice K562 tretirane su kroz 24 h spojevima R-191 i D7-23 u konc. njihovih IC50 vrijednosti. Aktivnost LDH u mediju je mjerena nakon 24 h, 48 h i 72 h. Graf prikazuje udio tretiranih stanica s oštećenom membranom u odnosu na stanice tretirane Tritonom X-100. Grafovi su formirani na temelju srednjih vrijednosti rezultata testova pripremljenih u triplikatu.

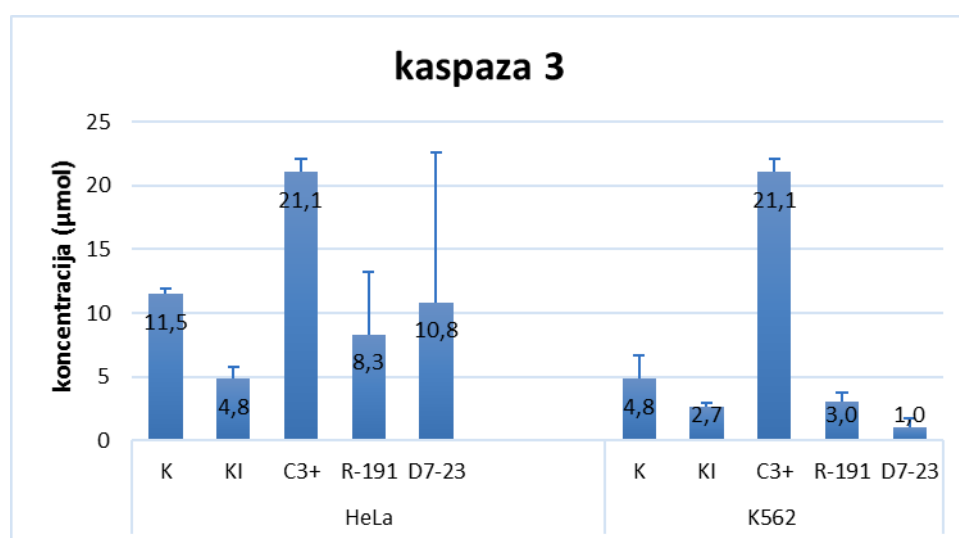


**Slika 7.** Promjena apsorbancije staničnog lizata K562 stanica nakon 24 h, 48 h i 72 h inkubacije sa spojevima R-191 i D7-23 u konc. IC<sub>50</sub>. Apsorbancija je mjerena na 450 nm.

Stanična linija K562 također pokazuje trend pada apsorbancije kroz vrijeme. Iz Slike 6. iščitava se da vrijednosti otpuštenog LDH iz tretiranih stanica opadaju kroz vrijeme i proporcionalno tomu udio stanica s oštećenom membranom. Graf promjene apsorbancija nakon 24 h, 48 h i 72 h (Slika 7.) pokazuje razliku u dinamici promjene apsorbancija kod stanica tretiranih Tritonom X-100 i tretiranih spojevima. Promjena apsorbancije stanica tretiranih spojem R-191 nakon 24 h i 48 h je oko 10 %, a nakon 24 h i 48 h razlika je minimalna oko 4 %. Razlika apsorbancije stanica tretiranih Tritonom X-100 nakon 24 h i 48 h iznosi 44 %, a između 48 h i 72 h razlike u apsorbanciji gotovo i nema. Apsorbancija kontrolnih netretiranih stanica porasla je između 24 h i 48 h za oko 50 %, a između 48 h i 72 h za gotovo 80 %. Promjena apsorbancije stanica tretiranih spojem D7-23 nakon 24 h i 48 h je minimalna za oko 1 %, a nakon 24 h i 48 h razlika je također zanemariva. Vidljivo je da se oštećenje stanične membrane i izlazak LDH u hranjivi medij dogodio u prva 24 h nakon tretmana stanica. Izraženo spontano otpuštanje LDH kontrolnih netretiranih stanica u medij nastupilo je četvrti dan od uspostavljanja testa. Nerazmjer apsorbancije kontrolnih i tretiranih stanica pojačao je pozadinski signal i onemogućio izračun citotoksičnosti spojeva nakon 72 h. Evaluacijom rezultata MTT testa i mjerenja aktivnosti LDH u mediju djelovanje spojeva R-191 i D7-23 na stanične linije HeLa i K562 je antiproliferacijsko i citotoksično.

### 4.3. Određivanje proapoptotskog djelovanja spojeva R-191 i D7-23

Na temelju dobivenih podataka o citotoksičnosti spojeva R-191 i D7-23 potrebno je utvrditi na koji način spojevi pokreću proces stanične smrti. Citotoksični učinak znak je i apoptoze i nekroze. Aktivnost kaspaze-3 određena je iz kalibracijske krivulje (Slika 2.) nacrtane prema apsorbcijama standardnih uzoraka s poznatim koncentracijama pNA s koeficijentom korelacije  $r^2$  većim od 0,99. Koncentracija aktiviranog enzima kaspaze 3 prikazana je na grafu (Slika 9.) na temelju apsorbcija spektrofotometrijski očitanih na čitaču mikrotitarskih ploča iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) na valnoj duljini 415 nm.

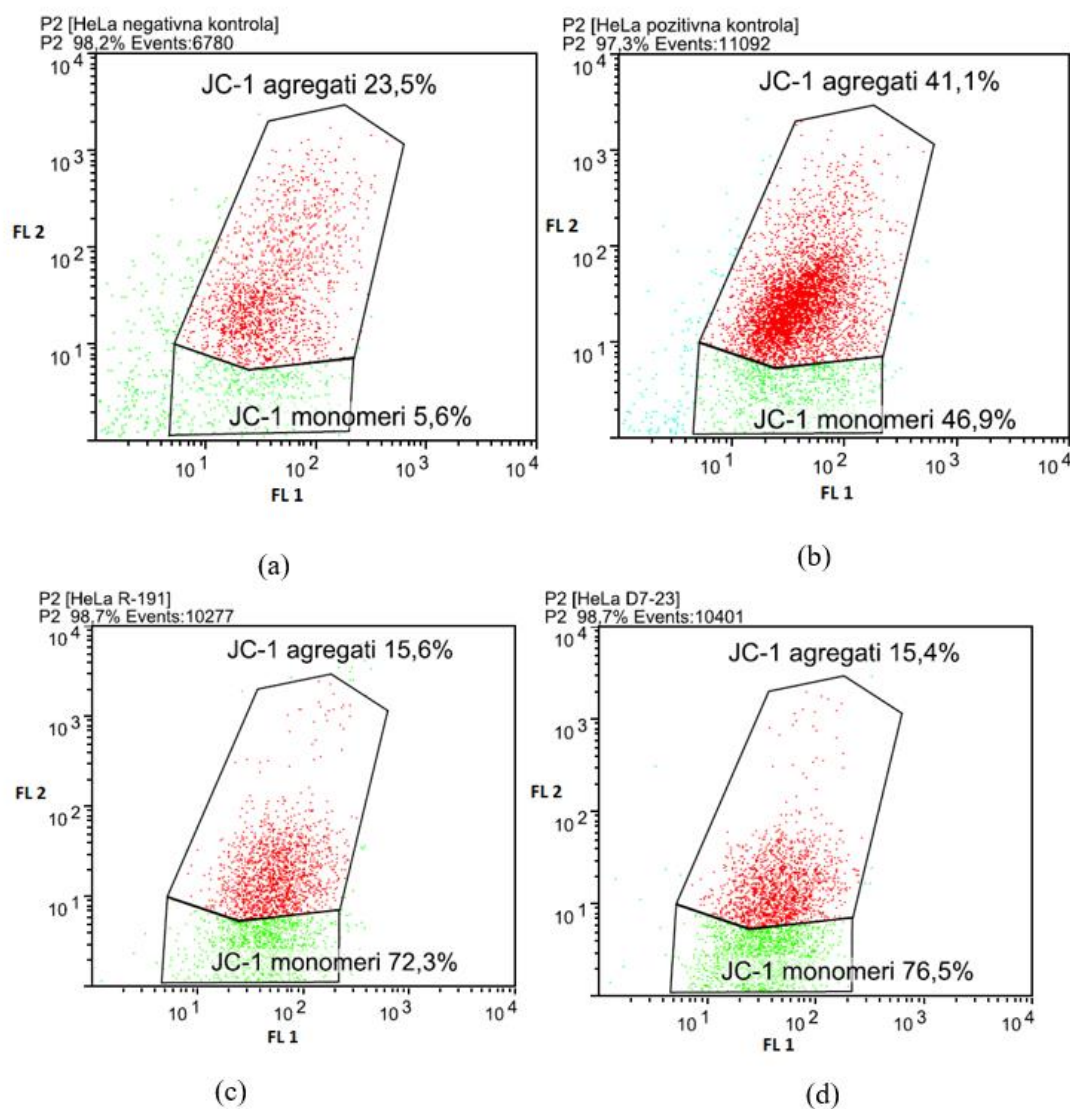


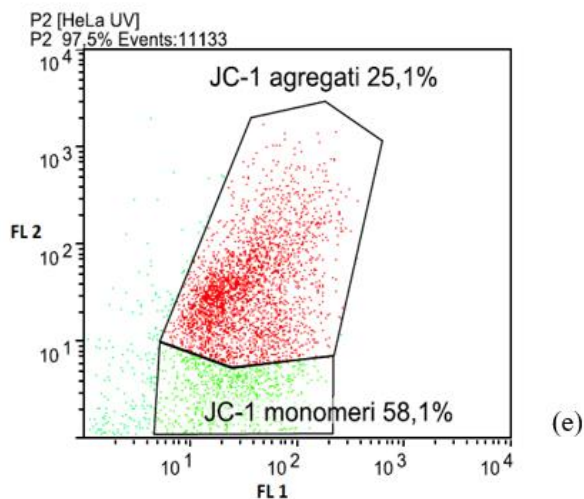
**Slika 8.** Koncentracija ( $\mu\text{mol}$ ) aktiviranog enzima kaspaze 3. Aktivnost enzima kaspaze 3 određena je kolorimetrijskim testom nakon 24 h tretmana. Rezultati testova prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD triju neovisnih mjerenja.

Stanična linija HeLa nakon 24 h tretmana spojevima R-191 i D7-23 u koncentracijama njihovih  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti usporedbom s kontrolnim stanicama s inhibitorom ne pokazuje aktivnost kaspaze 3. Kontrolne stanice tretirane inhibitorom pokazuju aktivnost kaspaze 3 enzima za 50 % manju u odnosu na kontrolne stanice bez inhibitora. Kod stanične linije K562 aktivnost kaspaze 3 tretiranih stanica niža je od vrijednosti kontrolnih stanica bez inhibitora, kao i s inhibitorom, što upućuje na inhibicijski učinak spojeva usmjeren na aktivnost enzima kaspaze.

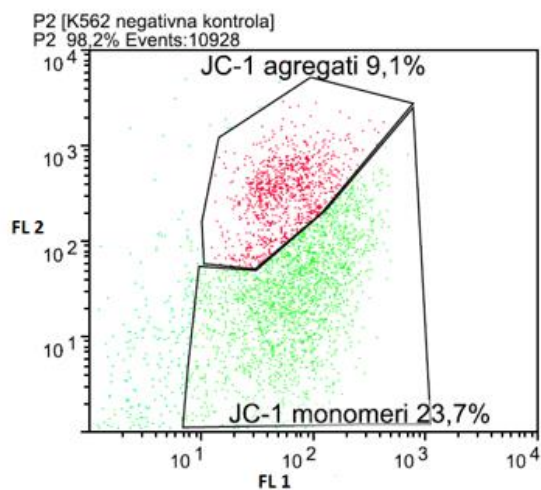
#### 4.4. Utjecaj novosintetiziranih N-9 sulfonil purina na mitohondrijski potencijal

Analiza je provedena na 10 000 stanica, a rezultati su prikazani u 'logicle' skali kao grafički prikaz gustoće boje. Spojevi D7-23 i R-191 izazvali su znatno smanjenje membranskog potencijala mitohondrija, što je prezentirano padom odnosa crvene i zelene fluorescencije (FL2/FL1) u odnosu na netretirane stanice.

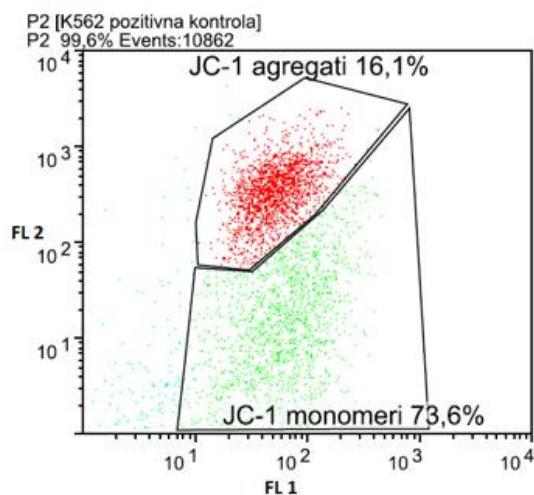




**Slika 9.** HeLa stanična linija izložena je 24 h djelovanju spojeva R-191 (9c) i D7-23 (9d) u konc.  $IC_{50}$  vrijednosti. Stanice pozitivne kontrole (9b) izložene su djelovanju Valinomicina (1 mg/ml). Druga skupina pozitivnih kontrolnih stanica (9e) izložena je 20 min. djelovanju UV zračenja. Stanice su obojene JC-1 bojom i analizirane na FACSCalibur uređaju. Fluorescencija je izmjerena na FL1 i FL2 kanalu.

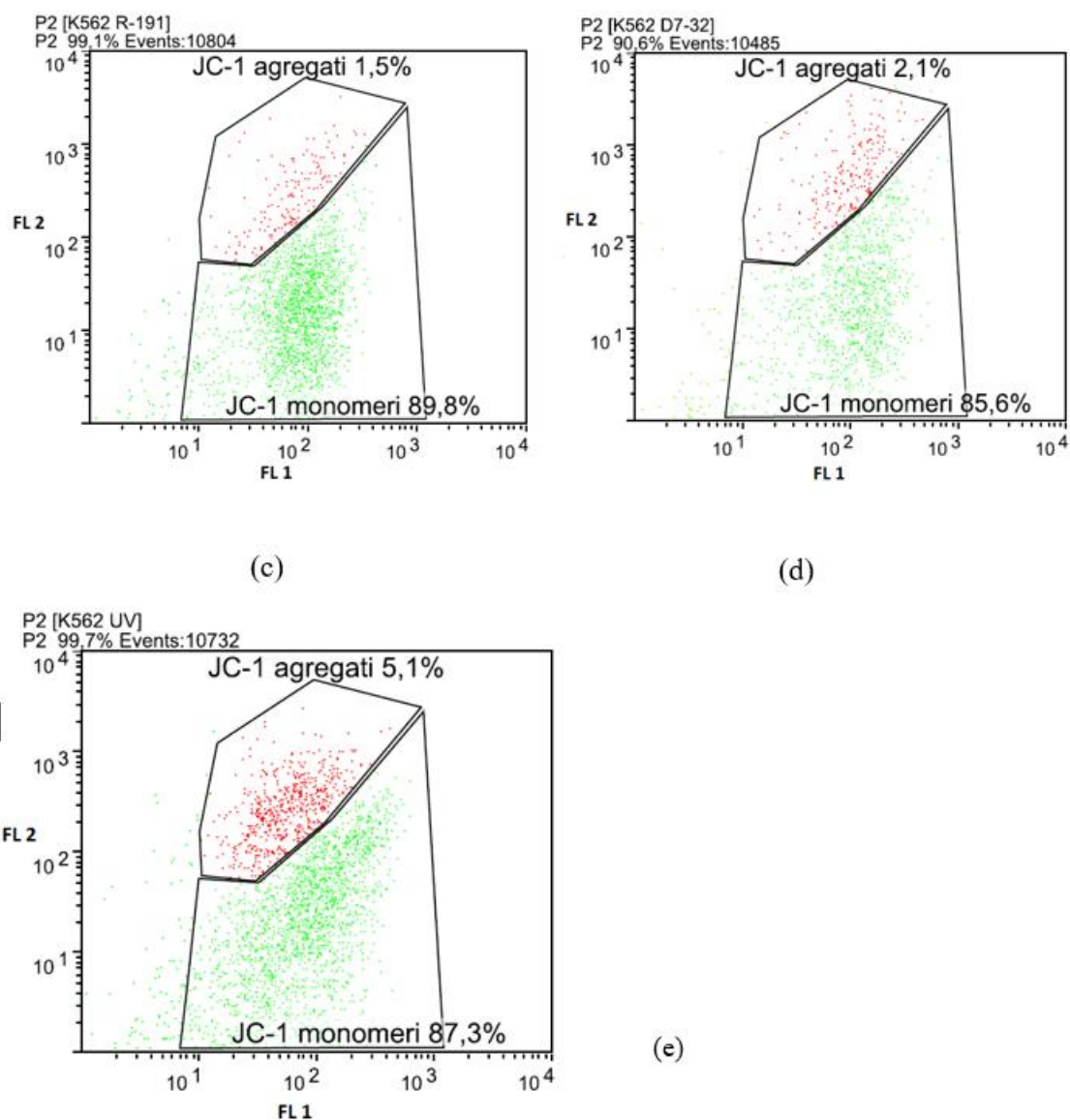


(a)



(b)





**Slika 10.** K562 stanična linija izložena je 24 h djelovanju spojeva R-191 (10c) i D7-23 (10d) u konc.  $IC_{50}$  vrijednosti. Stanice pozitivne kontrole (10b) izložene su djelovanju Valinomicina (1 mg/ml). Druga skupina pozitivnih kontrolnih stanica (10e) izložena je 20 min. djelovanju UV zračenja. Stanice su obojene JC-1 bojom i analizirane na FACSCalibur uređaju. Fluorescencija je izmjerena na FL1 i FL2 kanalu.

## 5. RASPRAVA

U ovom radu određena je antiproliferativna aktivnost novosintetiziranih N-9 sulfonil purinskih nukleozida na odabranim tumorskim staničnim linijama te na stanicama normalnih fibroblasta. Na temelju rezultata citotoksičnosti i naglašenog antiproliferativnog djelovanja, osobito na staničnim linijama humanih leukemija i limfoma, izdvojeni su spojevi R-191 i D7-23. Mjerenjem LDH u staničnom lizatu staničnih linija HeLa i K562 potvrđeno je citotoksično djelovanje odabranih spojeva. Nakon što je nedvojbeno dokazana stanična smrt, pristupilo se utvrđivanju tipa stanične smrti u podlozi citotoksičnog djelovanja novosintetiziranih spojeva. Kolorimetrijskim određivanjem aktivnosti enzima kaspaze 3 nije detektirana pojačana aktivnost tog ključnog enzima u indukciji apoptoze. Kaspaza 3 je izvršna kaspaza čija je aktivacija siguran znak da je proces apoptoze nepovratno započet i poveznica između vanjskog i unutarnjeg puta apoptoze (20). Izostanak aktivacije kaspaze 3 enzima govori da se citotoksično djelovanje odabranih spojeva ne temelji na kaspaza-ovisnom putu apoptoze te da se aktivira drugim mehanizmima indukcije apoptoze. Mjerenjem membranskog potencijala nakon 24 h izlaganja stanica djelovanju navedenih spojeva u  $IC_{50}$  koncentracijama ustanovljen je njegov pad u velikom udjelu tretiranih stanica što upućuje na aktivaciju unutarnjeg ili mitohondrijskog puta apoptoze (20). Na temelju dostupnih rezultata, nametnula se pretpostavka o kaspaza-neovisnom putu apoptoze tretiranih stanica. Nefunkcionalni mehanizmi stanične smrti povezuju se s različitim patološkim stanjima i s nastankom tumora. Veliki izazov u liječenju tumora predstavljaju mutacije gena uključenih u apoptozu kao što je p53. U tom se slučaju tumorske stanice usmjeravaju alternativnim načinima pokretanja stanične smrti. Prema radu Lartigue i sur. (33) stanice potaknute MOMP-om (*eng. mitochondrial outer membrane permeabilization*) pokrenut će proces stanične smrti i u slučaju inhibicije kaspaza. MOMP se smatra pokretačem kaspaza-ovisnog i kaspaza-neovisnog puta apoptoze, a učinak se prema navedenim autorima ostvaruje kroz dva mehanizma kaspaza-neovisnog puta (33). Prvi mehanizam podrazumijeva tradicionalni način koji se ostvaruje poticanjem funkcija stanične smrti otpuštanjem citotoksičnih proteina iz mitohondrijskog međumembranskog prostora; AIF i endonukleaza G, koji odlaze u jezgu i sudjeluju u DNA fragmentaciji. Lartigue i sur. uočavaju da se otpuštanje AIF-a dogodilo 24 h nakon *in vitro* pokrenutog MOMP-a. AIF je flavoprotein smješten u intermembranskom prostoru mitohondrija koji, osim što je uključen u proces apoptoze, obavlja i regulativnu oksidacijsko-redukcijsku funkciju (25). Pad mitohondrijskog membranskog potencijala ( $\delta\psi$ ) rani je događaj kaspaza-ovisnog MOMP-a. Autori uočavaju gubitak  $\delta\psi$  dva sata nakon

induciranog MOMP-a, dok je kod stanica tretiranih pankaspaznim inhibitorom uočena blokada gubitka  $\delta\psi$ . Drugi mehanizam kaspaza-neovisnog puta temelji se na gubitku elemenata preživljenja. Autori su dokazali da indukcija MOMP-a uz inhibiciju kaspaza neće odmah uzrokovati prekid stanične proliferacije, kao u slučaju oslobađanja citotoksičnih proteina AIF-a i endonukleaze G. Zaustavljanje proliferacije nastupit će zbog postupnog slabljenja bioenergetskog potencijala mitohondrija, čime je naglašena važnost mitohondrijskog respiracijskog lanca za odvijanje stanične proliferacije. Uočili su postupan pad  $\delta\psi$  kroz 72 h, a količina staničnog ATP-a je kroz 48 h opala za oko 50 %, a nakon 72 h zabilježen je zastoj proliferacije. Indukcija MOMP-a uz izostanak inhibicije kaspaza, uzrokovat će gubitak respiracijske aktivnosti nakon 4 – 8 h. MOMP je uzrokovao gubitak bioenergetskih funkcija i posljedični pad staničnog ATP-a. Deplecija ATP-a i drugih staničnih NTP-a vodi postupnom zastoj proliferacije. U ovom radu ispitivani spojevi uzrokovali su zastoj proliferacije u prva 24 h. Potrebno je utvrditi je li razlog tomu postupni gubitak bioenergetskog statusa ili je zastoj proliferacije uzrokovao izlazak citotoksičnih proteina iz međumembranskog prostora. Prema literaturi, AIF-posredovana apoptoza pozitivno je regulirana razinom staničnih ROS-a (*eng. reactive oxygen species*), a aktivacija tog puta ovisna je o vrsti stanica (34). Na temelju dobivenih rezultata, daljnje istraživanje može se usmjeriti određivanju koncentracije staničnog ATP-a te utvrđivanju fragmentiranosti stanične DNA. Aktivacija se kaspaze 3 u literaturi spominje kao rani događaj apoptoze (35), stoga aktivaciju apoptoze treba provjeriti nakon kraćeg razdoblja tretmana. Pad membranskog potencijala i otpuštanje citoplazmatskog enzima LDH u medij znaci su i apoptoze i nekroze. Prema preporukama NCCD-a, nekrozu kao mogući oblik kontrolirane stanične smrti također ne treba zanemariti (18). Znaci apoptoze i nekroze, kao i drugih predloženih modela stanične smrti često se preklapaju, stoga je primjena minimalno dvije metode potrebna da bi se potvrdio oblik stanične smrti. Tzv. multipleksiranje je najnoviji pristup u detekciji apoptoze, a podrazumijeva okupljanje više od jednog skupa podataka iz istog uzorka (6).

## 6. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da novosintetizirani N-9 sulfonil purini R-191 i D7-23 pokazuju izrazito antiproliferativno i citotoksično djelovanje, osobito na staničnim linijama humanih leukemija i limfoma uz relativno pošteđan učinak na normalne stanice humanih fibroblasta. Izostanak aktivacije enzima kaspaze 3, uz narušeni mitohondrijski membranski potencijal, nametnuo je smjernicu da se detaljno istraži i potvrdi kaspaza-neovisan put apoptoze.

## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Tumorske bolesti, kao vodeći uzrok smrtnosti u svijetu, nameću potrebu za pronalaskom učinkovite tumorske terapije. Purinski nukleozidni analozi (PNA) prema dosadašnjem pokazanom farmakološkom djelovanju zaslužuju pažnju i daljnje istraživanje.

**Cilj istraživanja:** Odrediti citotoksični učinak N-9 sulfonilpurina na tumorske i normalne stanične linije i utvrditi mogući način stanične smrti.

**Materijali i metode:** Citotoksični učinak 14 novosintetiziranih N-9 sulfonilpurina utvrđen je na panelu humanih tumorskih stanica (HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562, Raji, HUT-78, CCRF-CEM, MOLT-4), normalnim humanim fibroblastima (BJ) i normalnim epitelnim stanicama psećeg bubrega (MDCK). Vijabilnost stanica nakon tretmana s navedenim spojevima utvrđena je MTT testom, a citotoksični učinak potvrđen je mjerenjem LDH enzima u staničnom mediju. Način stanične smrti istražen je mjerenjem aktivnosti enzima kaspaze 3 u staničnom lizatu, a apoptotski put utvrđen je mjerenjem mitohondrijskog membranskog potencijala protočnom citofluorimetrijom.

**Rezultati:** Testirani N-9 sulfonilpurini pokazuju citotoksičan učinak u ovisnosti o primjenjenoj koncentraciji i staničnoj liniji. Na temelju rezultata izražene citotoksičnosti na humanim staničnim linijama leukemija i limfoma, izdvojeni su spojevi R-191 i D7-23. Navedeni spojevi ne pokazuju aktivaciju kaspaze 3, ali je narušen mitohondrijski membranski potencijal.

**Zaključak:** Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da određeni novosintetizirani N-9 sulfonil purini pokazuju izrazito antiproliferativno i citotoksično djelovanje, osobito na staničnim linijama humanih leukemija i limfoma. Izostanak aktivacije enzima kaspaze 3 nametnuo je smjernicu da se detaljno istraži i potvrdi kaspaza-neovisan put apoptoze.

**Ključne riječi:** analozi purinskih nukleozida, citotoksičnost, apoptoza

## 8. SUMMARY

**Introduction:** Tumor diseases are a leading cause of death worldwide and there is a need to discover an efficient form of tumor treatment. According to recently shown pharmacological activity, purine nucleoside analogs (PNA) deserve attention and further research.

**Study aim:** To determine the cytotoxic effect of N-9 sulfonyl purine on tumor and normal cell lines and to determine a possible mechanism behind cell deaths.

**Materials and methods:** The cytotoxic effect of 14 newly synthesized N-9 sulfonyl purines were identified on a panel of human tumor cells (HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562, Raji, HUT-78, CCRF-CEM, MOLT-4), normal human fibroblasts (BJ) and normal epithelial cells of a dog's kidney (MDCK). After the treatment, which involved the previously mentioned compounds, cell viability was determined by a MTT test and the cytotoxic effect was confirmed by measuring the LDH enzyme in the cell culture medium. The mechanism behind cell death was examined by measuring the caspase-3 enzymatic activity in the cell lysate, while the apoptotic pathway was determined by measuring the mitochondrial membrane potential by means of flow cytometry.

**Results:** The examined N-P sulfonyl purine shows the cytotoxic effect depending on the applied concentration and cell line. Based on the results, cytotoxicity was expressed on human leukemia and lymphoma cell lines and compounds R-191 and D7-23 were isolated. The previously mentioned compounds did not show caspase-3 activity, but the mitochondrial membrane potential was distorted.

**Conclusion:** Based on the obtained results we can conclude that certain newly synthesized N-9 sulfonyl purines show high anti-proliferative and cytotoxic activity, especially on the human leukemia and lymphoma cell lines. The absence of caspase-3 activity demands further detailed research and confirmation of a caspase-independent apoptotic pathway.

**Key words:** analogs of purine nucleoside, cytotoxicity, apoptosis

## 9. LITERATURA

- 1 [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Cancer\\_statistics](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Cancer_statistics)
- 2 Pavlak M, Radačić M, Jerčić J, Stojković R, Vlahović K, Žinić B. Acute toxicity of novel N-sulfonylpyrimidine derivatives in vivo. *Veterinarski arhiv*. 2005; 75(4): 311-316.
- 3 Žinić B, Krizmanić I, Vikić-Topić D, Srzić D, Žinić M. Synthesis, NMR and MS study of novel N-sulfonylated purine derivatives. *Croat Chem Acta*. 2001; 74(2): 399-414.
- 4 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5):646-674.
- 5 Cooper GM, Hausman RE. *Stanica: Molekularni pristup*. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
- 6 Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35: 495-516.
- 7 Wu, W, & Zhao, S. Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. *Acta Bioch Bioph Sin*. 2013;45(1):18-26.
- 8 Nowell P. The Clonal Evolution Of Tumor Cell Populations. *Science*. 1976;194(4260):23-28.
- 9 Luqmani YA. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Prin Pract*. 2005;14(Suppl.1):35-48.
- 10 Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Temeljna i klinička farmakologija*. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
- 11 Palchaudhuri R, Hergenrother PJ. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Curr Opin Biotechnol*. 2007;18:497-503.
- 12 Nafisi S, Saboury AA, Keramat N, Neault JF, Tajmir-Riahi HA. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *J Mol Struct* 2007;827(1):35-43.
- 13 Winston CT, Boger DL. Sequence-selective DNA recognition: natural products and nature's lessons. *Chem Biol*. 2004;11(12):1607-1617.
- 14 Murray RK, Bender DA, Botham K, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. *Harperova ilustrirana biokemija*. 28. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.

- 15 Zhang J, Visser ., King K, Baldwin SA, Young JD, Cass CE. The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. *Cancer Metast Rev.*2007;26(1):85-110.
- 16 Galmarini CM, Mackey JR, Dumonte C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2002;3(7):415-424.
- 17 Savić D, Stanković T, Lavrnja I, Podolski-Renić A, Banković J, Peković S, i sur. Purine nucleoside analogs in the therapy of cancer and neuroinflammation. *Molecular inhibitors in targeted therapy.* 2015;1:1.
- 18 Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri E, Baehrecke S, Blagosklonny EH, i sur.. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):107-120.
- 19 Kerr JF, Wyllie A, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit J Cancer.* 1972;26(4):239.
- 20 Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.*2007;35(4):495-516.
- 21 Movassagh M, Foo RSY. Simplified apoptotic cascades. *Heart fail Rev.* 2008;13(2):111-119.
- 22 McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspec Biol.* 2015;7:(4).
- 23 Fulda , Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006;25(34):4798-4811.
- 24 Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat Med.*2005;11(7):725-730.
- 25 Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010;221(1):3-12.
- 26 Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev cell.* 2004;6(4):463-477.
- 27 Hitomi J, Christofferson DE, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, Yuan J. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell.* 2008;135(7):1311-1323.
- 28 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.



- 29 Haslam G, Wyatt D, Kitos PA. Estimating the number of viable animal cells in multi-well cultures based on their lactate dehydrogenase activities. *Cytotechnology*. 2000;32(1):63-75
- 30 Baba C, Yanagida K, Kanzaki T, Baba M. Colorimetric lactate dehydrogenase (LDH) assay for evaluation of antiviral activity against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in vitro. *Antivir Chem Chemother*. 2005;16(1):33-39.
- 31 Salvoli S, Ardizzoni A, Franceschi C, Cossarizza A. JC-1, but not DiOC 6 (3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess  $\Psi$  changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett*. 1997;411:77-82.
- 32 Lartigue L, Kushnareva Y, Seong, Y, Lin H, Faustin B, Newmeyer D D. Caspase-independent mitochondrial cell death results from loss of respiration, not cytotoxic protein release. *Mol Biol Cell*. 2009; 20(23): 4871-4884.
- 33 Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Bioph Res Co* . 2010; 396(1): 95-100.
- 34 Sundquist T, Moravec R, Niles A, O'Brien M, Riss T. Timing your apoptosis assays. *Cell Notes*.2006; 16: 18-21.

## 10. ŽIVOTOPIS

Jasna Leović

Datum i mjesto rođenja: 7.9.1973., Slavonski Brod.

Obrazovanje:

- 1989. - 1992. Srednja medicinska škola Slavonski Brod
- 2011. – 2013. Preddiplomski sveučilišni studij biomedicinsko-laboratorijskih tehnologija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- 2013. – 2015. Diplomski sveučilišni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Od 2014. godine zaposlena na Medicinskom fakultetu Osijek na Katedri za kemiju, biokemiju i kliničku kemiju na radnom mjestu viši laborant u Laboratoriju za kulturu stanica i DNA laboratoriju.