

# Antiproliferativni učinak novih N-9 sulfonilurea na stanicama koje rastu u 2D i 3D kulturi

---

**Jakuš, Nikolina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:053985>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-25**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Nikolina Jakuš**

**ANTIPROLIFERATIVNI UČINAK  
NOVIH N-9 SULFONILUREA NA  
STANICE KOJE RASTU U 2D I 3D  
KULTURI**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2017.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Nikolina Jakuš**

**ANTIPROLIFERATIVNI UČINAK  
NOVIH N-9 SULFONILUREA NA  
STANICE KOJE RASTU U 2D I 3D  
KULTURI**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2017.**

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

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

Rad ima 46 stranica i 20 slika.

## SADRŽAJ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.0. UVOD .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. Nukleozidi i nukleotidi .....  | 2         |
| 1.1.2. Nukleozidni analozi kao antitumorski lijekovi.....                                   | 4         |
| 1.2. Stanični ciklus.....   | 6         |
| 1.3. Kultura stanica .....  | 8         |
| 1.3.1. Rast stanica u in vitro kulturi.....   | 9         |
| 1.4. Razlike rasta stanica in vivo i in vitro .....   | 10        |
| 1.5. Dvodimenzionalna adherentna stanična kultura.....                                      | 11        |
| 1.6. Trodimenzionalna adherentna stanična kultura .....                                     | 12        |
| 1.6.1. Tehnike nasađivanja 3D staničnih kultura.....  | 13        |
| 1.6.2. Metode formiranja 3D staničnih kultura bez nosača .....                              | 13        |
| 1.6.3. Metode formiranja 3D kultura sa nosačima .....                                       | 16        |
| <b>2.0. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>3.0. MATERIJALI I METODE.....</b>  | <b>18</b> |
| 3.1. MATERIJALI.....  | 18        |
| 3.1.1. Derivati N-9 sulfonilureja.....  | 18        |
| 3.1.2. Kemikalije .....   | 19        |
| 3.1.3. Stanične linije .....  | 19        |
| 3.2. METODE.....  | 20        |
| 3.2.1. Kultura stanica in vitro .....   | 20        |
| 3.2.2. Određivanje vijabilnosti stanica .....   | 21        |
| 3.2.3. MTT test .....   | 22        |
| 3.2.4. Postupak MTT testa u dvodimenzionalnoj staničnoj kulturi.....                        | 22        |
| 3.2.5. Postupak MTT testa u trodimenzionalnoj staničnoj kulturi .....                       | 23        |
| 3.2.6. Stanični ciklus.....   | 24        |
| 3.2.7. Statistička analiza podataka.....  | 25        |
| <b>4.0. REZULTATI .....</b>   | <b>26</b> |
| 4.1. Određivanje antiproliferativnog učinka derivata N-9 sulfonilureja u 2D kulturi .....   | 26        |
| 4.1.1. Antiproliferativni učinak derivata N-9 sulfonilureja nakon 24 sata .....             | 26        |
| 4.1.2. Antiproliferativan učinak derivata N-9 sulfonilureja nakon 48 sati .....             | 28        |
| 4.1.3. Antiproliferativan učinak derivata N-9 sulfonilureja nakon 72 sata .....             | 30        |
| 4.2. Usporedba antiproliferativnog učinka derivata N-9 sulfonilureja u 2D i 3D kulturi .... | 31        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.2.1. Antiproliferativni učinak derivata R-194 u 2D i 3D kulturi na HeLa stanicama .....     | 31        |
| 4.2.2. Antiproliferativni učinak derivata R-194 u 2D i 3D kulturi na CaCo-2 stanicama...      | 33        |
| 4.2.3. Antiproliferativni učinak derivata R-194 u 2D i 3D kulturi na NCI-H358 stanicama ..... | 35        |
| 4.3. Analiza staničnog ciklusa protočnim citometrom .....                                     | 37        |
| <b>5.0. RASPRAVA .....</b>  | <b>39</b> |
| <b>6.0. ZAKLJUČAK.....</b>  | <b>41</b> |
| <b>7.0. SAŽETAK.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>8.0. SUMMARY.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>9.0. LITERATURA .....</b>  | <b>44</b> |
| <b>10.0. ŽIVOTOPIS.....</b>   | <b>46</b> |

## POPIS KRATICA

- DNK (*eng. deoxyribonucleic acid*) deoksiribonukleinska kiselina
- RNK (*eng. ribonucleic acid*) ribonukleinska kiselina
- hCNT (*eng. human concentrative nucleoside transporter*) humani koncentracijski nukleozidni transporter
- hENT (*eng. human equilibrative nucleoside transporter*) humani ekvibracijski nukleozidni transporter
- MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid)
- RPMI 1640 (*eng. Roswell Park Memorial Institute*) medij
- DMEM (*eng. Dulbecco's Minimal Essential Medium*) Dulbeccov minimalni esencijalni medij
- DMSO dimetil-sulfoksid
- SDS (*eng. sodium dodecyl-sulphate*) natrijev dodecil sulfat
- ATP (*eng. adenosine triphosphate*) adenzin trifosfat
- ADP (*eng. adenosine diphosphate*) adenzin difosfat
- NBMR (*eng. nitrobenzylmercaptapurine ribonucleoside*)
- RRM1 ribonukleotid-reduktaza
- 6-MP 6-merkaptopurin
- 6-TG tiogvanin
- 2-CdA 2-klorodeoksiadenozin
- ECM (*eng. extracellular matrix*) izvanstanični prostor
- QZ (*eng. quiescent or hypoxic zone*) hipoksična zona
- PZ (*eng. proliferation zone*) zona proliferacije
- NZ (*eng. necrotic zone*) zona nekroze
- PBS (*eng. phosphate buffered saline*) fosfatni pufer
- SFB (*eng. spinner flask bioreactor*) pokretna boca bioreaktora
- RCC (*eng. rotating cell culture*) sustav rotacijske kulture
- PLGA (*eng. poly lactic-co-glycolic acid*) mliječna i glikolna kiselina
- AML akutna mijeloidna leukemija
- dCTP deoksicitidin trifosfat
- dFdCDP nukleozid-difosfat
- dFdCTP nukleozid-trifosfat

- NSCLC karcinom pluća ne-malih stanica
- NASA (*eng. National Aeronautics and Space Administration*) Nacionalna Aeronautička i Svemirska Administracija
- A431 stanične linije karcinoma pločastih stanica
- SW480 stanične linije kolorektalnog adenokarcinoma
- HCT 116 stanične linije kolorektalnog karcinoma

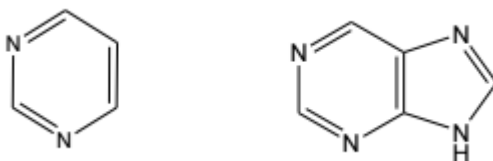


## 1.0. UVOD

Tumorske bolesti predstavljaju veliki javnozdravstveni problem s visokom stopom smrtnosti među oboljelima. Posljedice suvremenog načina života obilježenog mehanizacijom, automatizacijom sa sve manje tjelesnih aktivnosti u modernom svijetu doprinose razvoju tumorskih bolesti (1). Maligne su bolesti u Hrvatskoj drugi uzročnici smrti, od koje umire svaki četvrti oboljeli stanovnik. U 2014. godini od malignih bolesti umrlo je 13.939 osoba (7.911 muškaraca i 6.028 žena) (2). Kako se maligna oboljenja šire iz dana u dan, potreba za pronalaskom protutumorskih lijekova je velika. Predmet istraživanja protutumorskih lijekova modificirani su nukleozidi i baze nukleinskih kiselina, koje imaju klinički dokazano protutumorsko i protuvirusno djelovanje. *N*-sulfonil derivati predstavljaju dobre kandidate u traženju novih protutumorskih spojeva s toksičnim djelovanjem na tumorske stanice i pošteđnim učinkom na normalne stanice (3).

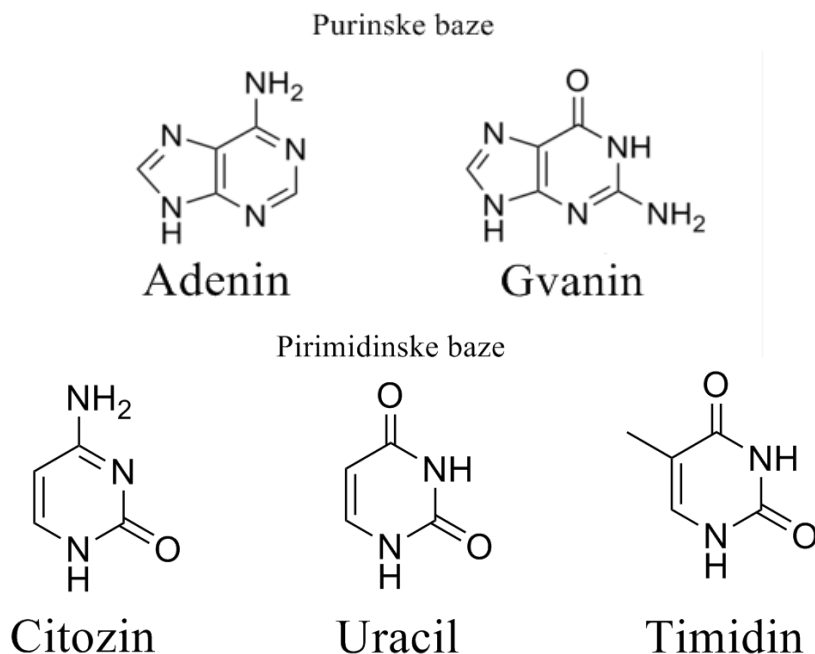
## 1.1. Nukleozidi i nukleotidi

Nukleozidi su derivati purina i pirimidina vezanih na šećernu okosnicu  $\beta$ -N-glikozidnom vezom. Vezani šećeri na atom dušika iz baze mogu biti D-riboze ili 2-deoksi-D-riboze.  $\beta$ -glikozidni derivati nastaju povezivanjem s aglikonskim komponentama u obliku purinskih i pirimidinskih baza (Slika 1) (4).



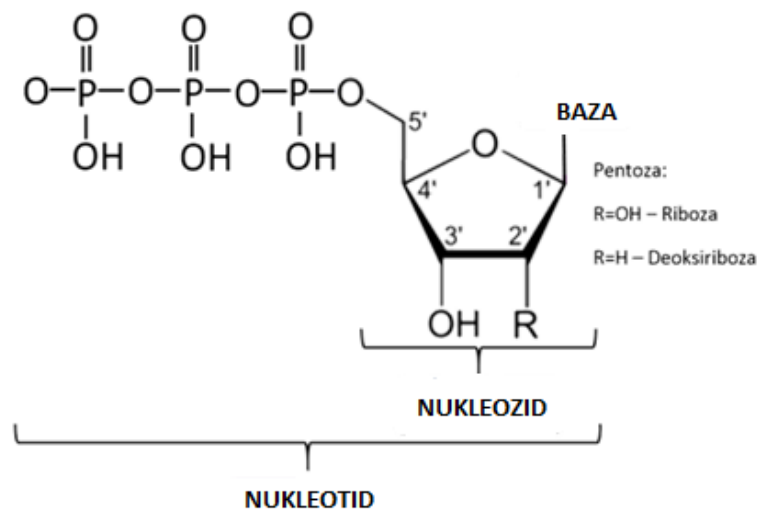
**Slika 1.** Struktura pirimidinskog i purinskog prstena

Aglikonske baze u strukturama nukleozida su adenin i gvanin koje su purinske baze te timin, citozin i uracil koje su pirimidinske baze (Slika 2) (4).



**Slika 2.** Strukture purinskih i pirimidinskih baza

Nukleotidi su nukleozidi fosfolirani na hidroksilnoj skupini na položaju C-5' šećera i predstavljaju osnovnu gradivnu jedinicu nukleinskih kiselina (Slika 3). Osim što su preteče nukleinskih kiselina, purinski i primidinski nukleotidi sudjeluju u raznim metaboličkim funkcijama kao što su prijenos energije, regulacija enzimske aktivnosti, sinteza proteina i stanična signalizacija. Nukleotidi su sastavni dio velikog broja koenzima, jer vezani su za vitamine ili vitaminske derivate. Ujedno su glavni donori ili akceptori fosforilnih skupina tijekom metabolizma. Difosfati i nukleozid-trifosfati kao što su ATP i ADP imaju glavne uloge pri prijenosima energije preko metaboličke pregradnje i oksidacijske fosforilacije (4).



**Slika 3.** Strukturne razlike između nukleotida i nukleozida

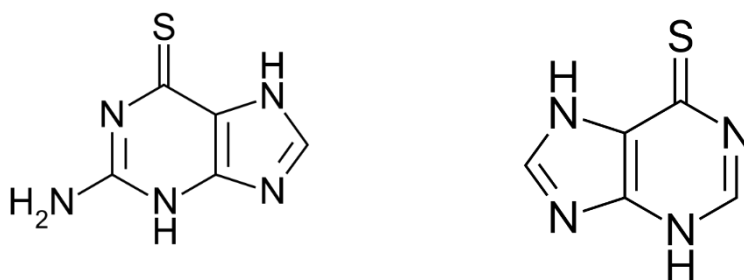
Različita fizikalna i strukturna svojstva nukleozida i nukleotida: (5,6)

- nukleotidi su topljivi u vodi (nukleozidi su topljiviji od dušičnih baza, a nukleotidi su topljiviji od nukleozida)
- nukleozidi su neutralni pri pH 5–9
- amino skupine adenina, gvanina, citozina su protonirane pri nižem pH
- nukleozidi i nukleotidi su stabilni unutar šireg pH područja, a kod izrazito lužnatih uvjeta događa se hidroliza fosfatnih estera
- u kiselom području N-glikozidna veza je nestabilna
- UV zračenje apsorbiraju molekule koje sadrže purinske i pirimidinske baze
- purini i njihovi derivati imaju viši molarni apsorpcijski koeficijent nego derivati pirimidina
- maksimum apsorpcije za purine i pirimidine je kod 260 nm

### 1.1.2. Nukleozidni analozi kao antitumorski lijekovi

Primjena je sintetskim putem dobivenih nukleozidnih analoga u terapijske svrhe široko rasprostranjena. Uglavnom djeluju tako da inhibiraju stanične ili virusne DNK i RNK polimeraze u postupku izgradnje nukleinskog lanca kada se umeću umjesto prirodnih nukleozida. Proučavanjem procesa replikacije virusa i tumorskih stanica s vremenom je postalo moguće identificirati razne spojeve koji imaju svojstvo selektivnog djelovanja na funkcije staničnih makromolekula. Nukleozidni analozi mogu terapijski djelovati tako što inhibiraju rast stanica raka i/ili inhibiraju replikaciju virusa. Osim njihove ugradnje u nukleinske kiseline, nukleozidni i nukleotidni analozi mogu inhibirati enzime kao što su polimeraze (DNK-ovisna DNK polimeraza, RNK-ovisna DNK polimeraza ili RNK-ovisna RNK polimeraza), kinaze, ribonukleinska reduktaza, DNK metiltransferaza, purinska i pirimidinska nukleozidna fosforilaze i timidilat sintaza (7). Nukleozidni analozi kao hidrofilne molekule koriste iste metaboličke putove poput endogenih nukleozida putem nukleozidnih transportera. Humani nukleozidni transporteri dijele se u dvije skupine, humane ekvibracijske nukleozidne transportere (eng. *human equilibrative nucleoside transporter*, hENT) i humane koncentracijske nukleozidne transportere (eng. *human concentrative nucleoside transporter*, hCNT). Predstavnici ENT su hENT1, hENT2, hENT3 i hENT4. ENT posreduju u transportu purinskih i pirimidinskih nukleozida niz njihov koncentracijski gradijent i dvosmjernom transportu olakšanom difuzijom kroz staničnu membranu. Također ENT podijeljeni su na temelju osjetljivosti prema nitrobenziltioiozinu kao NBMR (eng. *nitrobenzylmercaptapurine ribonucleoside*) osjetljivi i neosjetljivi. U nukleozidne transportere skupine CNT ubrajamo CNT1, CNT2 i CNT3. CNT omogućuju jednosmjernan transport nukleozida uz koncentracijski gradijent koji zahtjeva utrošak  $\text{Na}^+$  (8, 9). Ulaskom nukleozidnih analoga u stanicu započinje njihova fosforilacija od strane nukleozid kinaze što dovodi do stvaranja metabolita monofosfata. U sljedećim koracima fosforilacije nastaje nukleozid trifosfat djelovanjem enzima nukleozid monofosfat kinaze i difosfat kinaze. U obliku trifosfata, nukleozidni analog može ugraditi se u nukleinske kiseline. Ključni enzim u metabolizmu nukleotida je ribonukleotid-reduktaza (RRM1), koju inhibira difosfatni i trifosfatni oblik nukleozidnog analoga. Ugradnjom nukleozidnih analoga u DNK zaustavlja se stanični ciklus u S fazi staničnog ciklusa i prestaje proliferacija. Zbog navedenog nukleozidni analozi predstavljaju važnu skupinu antimetabolita koji se mogu koristiti ili se koriste u liječenju zloćudnih bolesti hematološkog sustava kao što je na primjer pirimidinski analog citozinarabinozid (citarabin) koji se često koristi u liječenju akutne leukemije (10). U terapiji raka gušterače, dojke i pluća koristi se

gemicitabin. Tiopurin 6-merkaptopurin (6-MP) i tiogvanin (6-TG) prva dva razvijena su purinska analoga (Slika 4) učinkovita u liječenju akutne limfoblastične leukemije, akutne mijeloične leukemije, autoimunog hepatitisa, reumatidnog artitisa, sistemskog eritemskog lupusa, psorijaze i upalne bolesti crijeva. Ostali su purinski analozi 2-klorodeoksiadenozin (2-CdA) i fludarabin koji se koriste u liječenju hematoloških malignih bolesti. Uvođenjem novih molekula u kliničku uporabu i širenjem njihove uporabe u područje čvrstih tumora, važnost nukleozidnih analoga kao kemoterapeutskih analoga, značajno je porasla (9,10). Purinski N-sulfonilni analozi su derivati koji se sastoje od dvije aktivne komponente: sulfonilcikloureje i purinske baze. Derivati sulfonilureje pokazuju protutumorsko, antihiperглиkemijsko, herbicidno i antikolesterolno djelovanje (11).

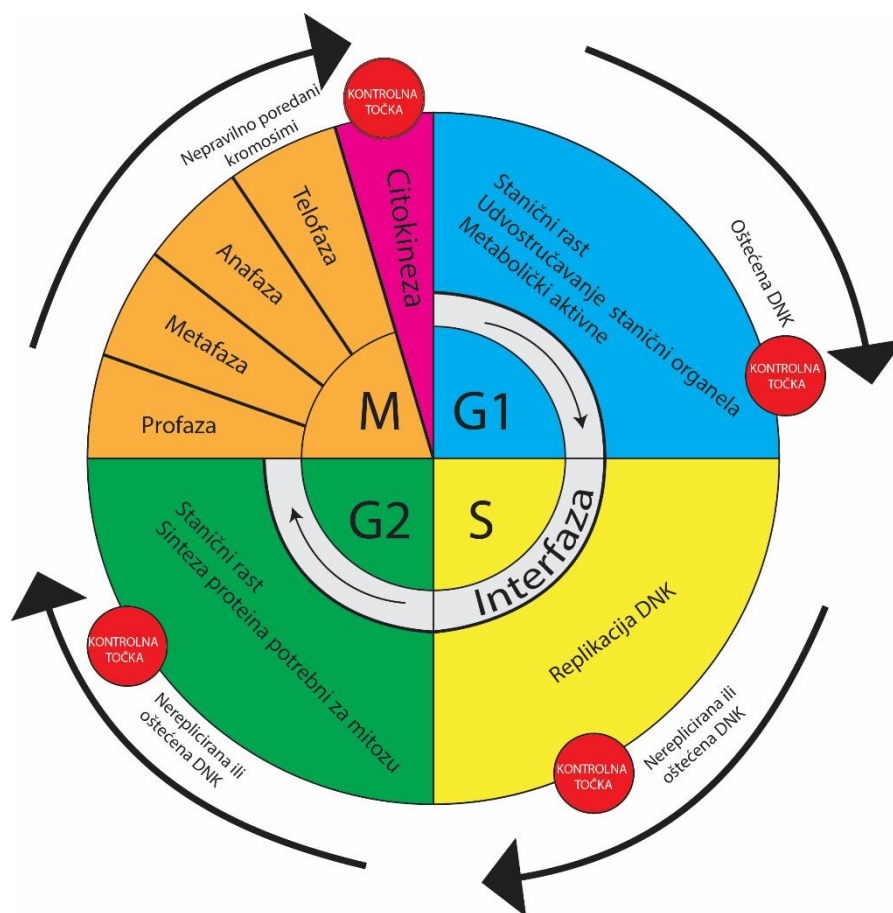


**Slika 4.** Struktura tiopurina (6-MP) i tiogvanina (6-TG)

## 1.2. Stanični ciklus

Stanični se ciklus sastoji od četiri međusobno povezana procesa: stanični rast, replikacija DNK, raspodjela udvostručenih kromosoma i podjele stanica. Približno svaka 24 sata odvija se eukariotski stanični ciklus i može podijeliti se u dva osnovna dijela, mitozu i interfazu. Interfaza se dijeli u tri faze:  $G_1$  (*eng. Gap 1*),  $S$  (*eng. Synthesis*) i  $G_2$  (*eng. Gap 2*). Tijekom faze  $G_1$  stanica je metabolički aktivna i neprestano raste, ali bez replikacije koja se događa u  $S$  fazi. Nakon sinteze DNK, stanica ulazi u fazu  $G_2$  u kojoj nastavlja se stanični rast i sinteza proteina potrebnih za mitozu. U fazi  $M$  (mitoza) dolazi do razdvajanja kromosoma i završava diobom stanice (citokineza) pri čemu nastaju stanice kćeri koje ponovo započinju svoj stanični ciklus ulaskom u fazu  $G_1$  (Slika 5). Stanica također može ući i u fazu mirovanja ( $G_0$ ) u kojoj je metabolički aktivna, ali se ne dijeli. Mitozu dijelimo u četiri faze: profaza, metafaza, anafaza i telofaza. U profazi kromosomi kondenziraju se, a centrosomi kreću se prema suprotnim stranama jezgre potičući formiranje diobenog vretena. Raspad jezgrine ovojnice dopušta mikrotubulima iz diobenog vretena da se vežu na kinetohore kromosoma. Nakon završetka profaze stanica ulazi u prometafazu, prijelaznu etapu između profaze i metafaze. Tijekom prometafaze kromosomi kreću se sve dok konačno ne poredaju se u metafaznoj ravnini u sredini diobenog vretena. Prijelaz iz metafaze u anafazu potaknut je raspadom veze između sestrinskih kromatida koje se odvajaju i kreću se prema suprotnim polovima diobenog vretena. Mitoza završava formiranjem jezgrine ovojnice i dekonenzacijom kromosoma tijekom telofaze, a citokinezom nastaju dvije stanice kćeri tijekom interfaze. U kontrolnim točkama staničnog ciklusa otkrivaju se nereplicirane ili oštećene DNK i koordiniraju daljnje napredovanje kroz stanični ciklus. Kontrolne točke osiguravaju da se samo ispravo replicirani i neoštećeni genomi prenose u stanice kćeri (Slika 5). Glavna regulatorna točka ili start točka je na kraju  $G_1$  faze. Prolazak stanice kroz prvu kontrolnu točku je moguć ukoliko su izvanstanični uvjeti povoljni uz sve prisutne čimbenike rasta i diobe. Prolaskom stanice kroz prvu kontrolnu točku, započinje dupliciranje genetskog materijala. Kontrolna točka u  $G_2$  fazi kontrolira uspješnost dupliciranja genetskog materijala i ne dopušta početak mitoze dok se ne obavi potpuna replikacija DNK. Kontrolna točka u  $M$  fazi kontrolira jesu li svi kromosomi pravilno vezani za diobeno vreteno i potiče se razdvajanje sestrinskih kromatida. Oštećenjem DNK aktiviraju se zaštitni mehanizmi koji zaustavljaju stanični ciklus u kontrolnim točkama. Kompleks senzorskih proteina veže se za oštećenu ili ne repliciranu DNK i aktivira skupine proteinskih kinaza koje zaustavljaju ciklus. Protein p53 ima ključnu ulogu u zaustavljanju staničnog ciklusa u kontrolnoj točki  $G_1$  faze. Prema sadržaju DNK, mogu raspoznati se stanice kao i faza staničnog ciklusa u kojoj se nalaze.

Tijekom  $G_0$  i  $G_1$  faze stanice su diploidne ( $2n$ ), tijekom S faze za vrijeme replikacije udvostručuje se količina DNK (s  $2n$  na  $4n$ ) i to ne mijenja se ni tijekom  $G_2$  i M faze. Nakon citokineze, kada nastanu dvije nove stanice, svaka ponovo ima  $2n$  broja kromosoma (12,13).



**Slika 5.** Shematski prikaz faza staničnog ciklusa i kontrolnih točaka

### 1.3. Kultura stanica

Temelj stanične kulture u modernom smislu postavio je Ross Harisson 1907. godine nakon što je izolirao i kultivirao komadiće tkiva iz medularnog kanala žabljeg embrija. Neuralno tkivo embrija žabe postavljeno je u kapi limfe na sterilnom stakalcu koje se držalo u zatvorenoj i vlažnoj komori. Ovaj postupak omogućuje rast tkiva i njihovu diferencijaciju te daje mogućnost da se stanice od interesa održavaju izvan tijela podrijetla i promatraju tijekom određenog vremena. Veliki napredak u kulturi stanica dolazi 1912. godine kada Carell uvodi sterilne tehnike u rad sa staničnim kulturama. Sljedeći 50 godina nije bilo značajnog pomaka sve do spoznaje da su stanicama potrebni nutritivni sastojci kako bi preživjele. Eagle 1955. godine definira sastav medija za stanični rast koji se sastoji od najmanje 13 esencijalnih aminokiselina, 8 vitamina, soli, glukoze i seruma sisavaca. Koncentracija je sastojaka hranjive podloge strogo definirana kako bi osmotski tlak medija za kultivaciju stanica bio jednak osmotskom tlaku fiziološke otopine. Suvišak ili smanjeni udio samo jedne esencijalne aminokiseline može dovesti do degeneracije stanica i njihove smrti. Veliko otkriće Dubellca 1952. godine kada je izolirao stanice uz pomoć tripsina, stanična kultura prihvaćena je kao eksperimentalna metoda. Značajna poboljšanja napravljena su na 2D tehnici kulture stanica inicijalno razvijene prema Harrisonu. Posude za uzgoj stanica su razvijene tako da omogućuju stanicama da se s lakoćom nasade i da im se pruži više prostora za njihov rast. Osim toga, tradicionalna uporaba krvne plazme kao jedinog izvora prehrane za uzgoj stanica u prošlosti promijenjena je uporabom sintetičke podloge. Postoje mnoge prednosti, uključujući činjenicu da sintetičke podloge mogu biti izrađene s lakoćom, ne sadrže antigene koji mogu izazvati alergijske reakcije i relativno su jeftine za proizvodnju. Antibiotici i antifungalna sredstva u kulturi razvijena su kako bi spriječila kontaminaciju kulture stanica bakterija i gljiva (14,15,16).



### 1.3.1. Rast stanica u *in vitro* kulturi

U današnje vrijeme smatramo kako kultura *in vitro* obuhvaća različite tehnike koje omogućuju život stanica, dijela tkiva u strogo kontroliranim uvjetima izvan organizma. Uzgoj stanica u *in vitro* uvjetima omogućava kontrolu i mogućnost prilagodbe kako bi se dobio uvid u mehanizam djelovanja pojedinih molekula. Rast stanica *in vitro* započinje s primarnom kulturom, a ona predstavlja kulturu koja pripremljena je od tkiva ili organa dobivenog direktno iz organizma. Uspostavljanjem kulture stanica od željenog tkiva postiže se usitnjavanje izdvojenog tkiva na manje fragmente te može biti mehaničko, enzimsko ili kombinirano. Pojedinačne stanice koje imaju tendenciju adherentnosti spustit će se i prihvatiti za podlogu na kojoj se uzgajaju. Kada stanice dostignu konfluentnost potrebno ih je odvojiti od podloge pomoću tripsina te ih pokupiti medijem za uzgoj stanica. Kao takva stanična suspenzija može se ponovo nasaditi kako bi se nastavila kultura stanica.

Stanice u kulturi su metabolički aktivne, dijele se, rastu i prolaze kroz faze staničnog ciklusa. Stanične populacije mogu se podijeliti na asinkroni i sinkroni rast ovisno u kojoj su fazi staničnog ciklusa. Sinkroni rast prikazuje staničnu populaciju koja se nalazi u istoj fazi staničnog ciklusa. Sinkroni rast prikazuje staničnu populaciju koja se nalazi u istoj fazi staničnog ciklusa. Asinkrona se stanična populacija prikazuje kada se svaka stanica nalazi u drugoj fazi staničnog ciklusa. Asinkroni rast sastoji se od tri faze nakon presađivanja stanica: faza zastoja ili odgode (*lag* faza), eksponencijalna faza ili faza logaritamskog rasta (*log* faza) i stacionarna faza ili plateau faza. Faza zastoja ili odgode (*lag* faza) predstavlja proces pričvršćivanja stanica za podlogu i njihovu adaptaciju na nove uvjete. U ovoj fazi stanice metabolički su aktivne, ali ne razmnožavaju se. Eksponencijalna faza ili faza logaritamskog rasta (*log* faza) čini fazu učestalih dioba. Vrijeme diobe stanica diobenog ciklusa identično je vremenu umnožavanja stanica. Usporavanje vremena umnožavanja dolazi pri kraju eksponencijalne faze rasta. U stacionarnoj fazi više se ne mijenja broj stanica, stanice ulaze u fazu mirovanja odnosno  $G_0$  fazu. U ranoj ili srednjoj stacionarnoj fazi vijabilnost i preživljavanje stanica moguće je, ako se prebace u svježiji medij. Tada stanice ulaze u diobeni ciklus sa  $G_1$  fazom (14,15).

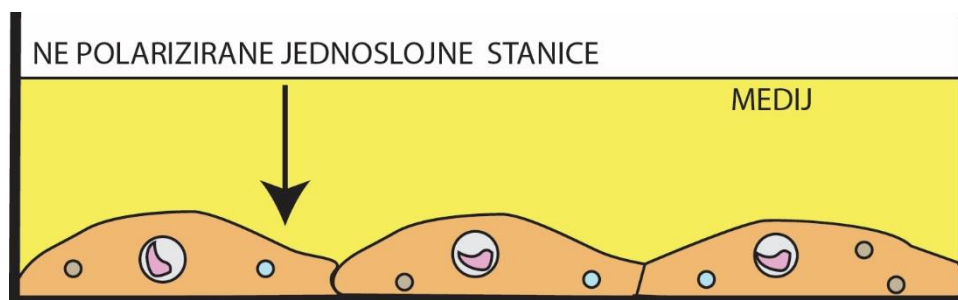
#### 1.4. Razlike rasta stanica *in vivo* i *in vitro*

Između kultiviranih stanica i istovjetnih stanica *in vivo* postoje razlike u ponašanju: (14)

1. karakteristične interakcije između stanica specifične za histologiju tkiva gube se pri kultivaciji *in vitro*.
2. *in vitro* prikazuje vrlo veliku rastuću frakciju stanične populacije. Stvaranjem staničnih linija može se prikazivati karakteristike jednog ili dva stanična tipa, dok su heterotipične značajke stanica izgubljene.
3. u uvjetima kultivacije često nestaju systemske komponente koje uključene su u homeostatsku regulaciju *in vivo*, posebno one iz živčanog i endokrinog sustava. Bez te kontrole stanični metabolizam stabilniji je *in vitro* nego *in vivo*, ali ne mora prikazivati u potpunosti odlike tipičnog predstavnika tkiva od kojeg su stanice dobivene. Zato u medij za uzgoj stanica uvode se različiti hormoni.
4. energetskei metabolizam *in vitro* ide putem glikolize iako je ciklus limunske kiseline još uvijek funkcionalan, ali ima manju ulogu u energetskom metabolizmu.

### 1.5. Dvodimenzionalna adherentna stanična kultura

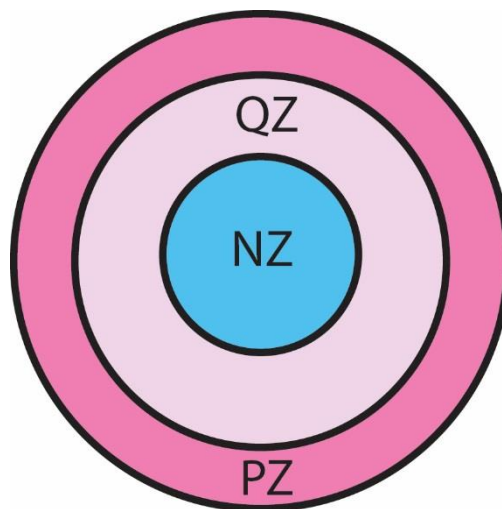
Pokusi osnovani na kulturi adherentnih stanica najčešće se provode na dvodimenzionalnim (2D) kulturama gdje stanice rastu u jednom sloju na ravnim podlogama (Slika 6). 2D kultura ne podržava u cijelosti prirodnu okolinu stanica, jer stanice koje rastu u *in vivo* okolišu okružene su drugim stanicama i izvanstaničnim prostorom (*eng. extracellular matrix*, ECM). Ispod 2D kulture stanica nalazi se plastika ili staklo te ne postoji gradijent kisika i hranjivih tvari čime je stvaranje višedimenzionalnih struktura i višestaničnog mikrookoliša, kao u uvjetima *in vivo*, onemogućeno. Stanice u 2D kulturi ne predstavljaju stvarno okruženje stanica. Uzgoj na ravnim površinama u jednom sloju ne predstavljaju vjerni prikaz staničnog rasta i funkcioniranja u ljudskom tijelu, gdje su okružene s drugim stanicama (14,17).



**Slika 6.** Shematski prikaz 2D kulture stanica

## 1.6. Trodimenzionalna adherentna stanična kultura

Trodimenzionalne (3D) kulture daju odraz *in vivo* okruženja stanica. U 3D kulturama stanice nakupljaju se u sferoide, odnosno kolonijske nakupine stanica koje su prvi put dokumentirane 1944. godine od strane Johannes Holtfretera (16). Sferoidi rastu u tri dimenzije i sastoje se od stanica koje se nalaze u različitim fazama rasta. Struktura sferoida sastoji se od zone proliferacije (*eng. proliferation zone, PZ*) koja sastoji se od živih stanica u vanjskom sloju, stanica oko jezgre koje stvaraju neaktivnu ili hipoksičnu zonu (*eng. quiescent or hypoxic zone, QZ*) i nekrotičnog područja s umirućim stanicama (*eng. necrotic zone, NZ*) (Slika 7). Uzgojem stanica u 3D kulturi može proučavati se stanični odgovor koji nalikuje *in vivo* okruženju (16,18).



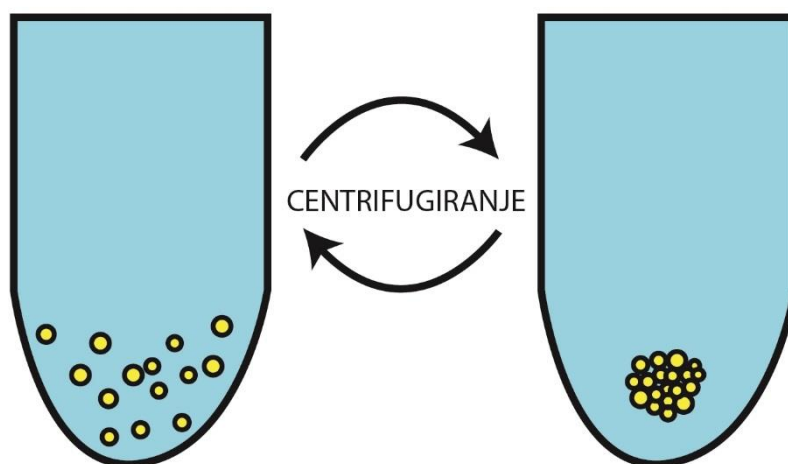
**Slika 7.** Shematski prikaz građe 3D sferoida

### 1.6.1. Tehnike nasađivanja 3D staničnih kultura

Najčešće se koriste tehnike nasađivanja 3D stanične kulture na nosačima i nasađivanje bez nosača.

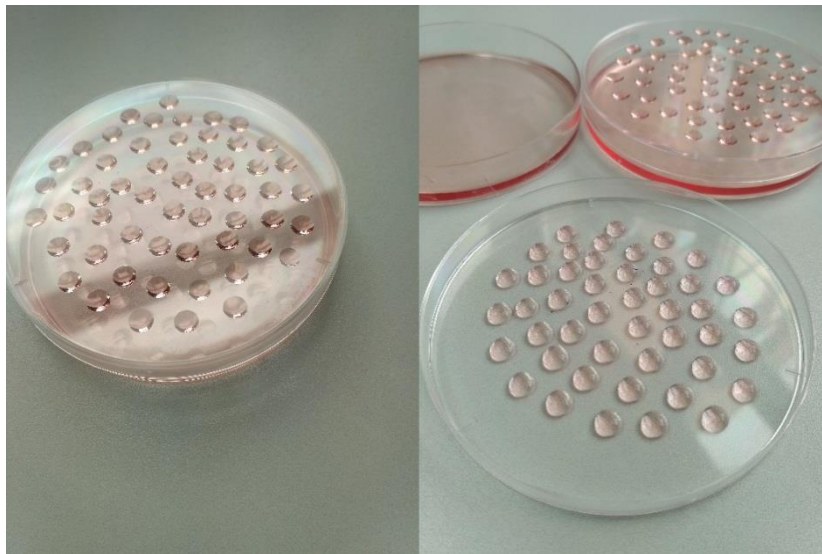
### 1.6.2. Metode formiranja 3D staničnih kultura bez nosača

Metoda plutajućih stanica (*eng. forcing floating, FF*) brza je i jednostavna metoda za stvaranje 3D sferoida iz tumorskih ili ne tumorskih staničnih linija u jažicama s konusnim dnom kojima je u cilju spriječiti njihovo vezanje na površinu stijenke (Slika 8). Stijenke mikrotitarske ploče obložene su s 0,5 % poli-hemom (poli-2-hidroksietilethyl metakrilatom) koji sprječava da se stanice vežu na površinu jažice. Nakon nasađivanja stanice centrifugiraju se kako bi potaknule se na kolonizaciju, odnosno na stvaranje željenog sferoida. FF metoda ima svoje prednosti u svojoj jednostavnosti i ponovljivosti. Veličina sferoida regulira se brojem nasađenih stanica. Za veće sferoide nasađuje se više stanica, što predstavlja laganu proizvodnju ujednačenih sferoida koji se koriste za testiranja djelotvornosti i toksičnosti lijekova, ekspresije gena u sferoidima, kao i u drugim brojnim staničnim i biokemijskim testovima (17).



**Slika 8.** Shematski prikaz FF metode formiranja sferoida

Metoda viseće kapi (Slika 9) jednostavna je metoda koja ne zahtijeva specijaliziranu opremu te stvara 3D kulturu bez nosača. Ovu metodu najjednostavnije prikazujemo u Petrijevoj zdjelici gdje je potreban mali alikvot suspenzije stanica koje pipetiramo u obliku kapljica na samom poklopcu zdjelice, dok u zdjelicu postavljamo određeni volumen PBS zbog prisutnosti vlažnosti. Zatvaranjem zdjelice poklopcem na koji smo postavili kapljice stanične linije formiramo viseće kapi pod utjecajem slobodnog pada. Petrijevu zdjelicu postavljamo u inkubator na 37 °C i tijekom inkubacije na dnu viseće kapi formiraju se željeni trodimenzionalni sferoidi (19).



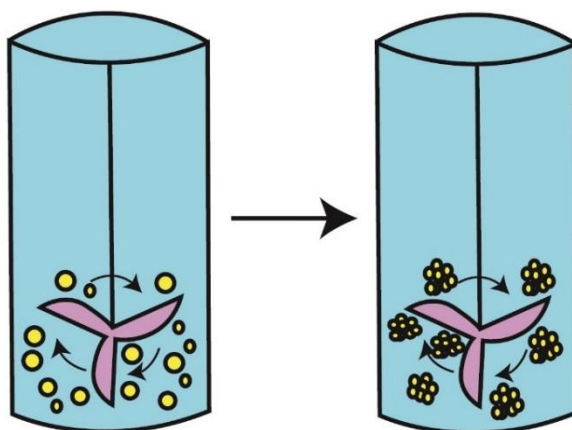
**Slika 9.** Metoda viseće kapi u Petrijevoj zdjelici

Tehnika rotacije zasnovana je na održavanju stanične suspenzije u stalnom pokretu laganim miješanjem ili rotacijom spremnika. Kontinuirano gibanje suspendiranih stanica onemogućuje stanicama prihvaćanje za podlogu spremnika što dovodi do interakcije stanica-stanica. Pristup ove metode ima dvije kategorije:

- pokretna boca bioreaktora (*eng. spinner flask bioreactor, SFB*)
- sustav rotacijske kulture (*eng. rotating cell culture, RCC*)

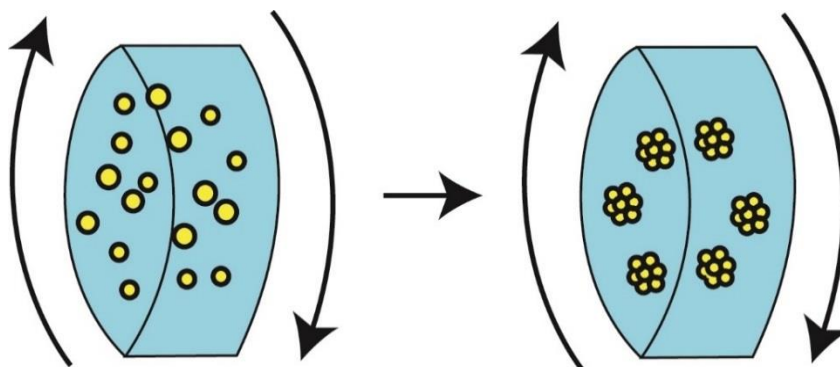
SFB (Slika 10) tehnika uključuje spremnik za držanje suspenzije stanica i miješanja elementa kako bi se osiguralo stalno miješanje stanične suspenzije. Ovom metodom transport hranjivih tvari i odstranjivanje otpadnih produkata od sferoida je olakšano, dok je nedostatak metode sila koju stvara kretanje miješalice kroz staničnu suspenziju koja može negativno utjecati na staničnu fiziologiju. Također, zahtjevi su medija mnogo veći od standardnih kultura stanica na

pločama. Obično je potrebno oko 100-300 ml u boci (ovisno o veličini boce) u usporedbi s približno 15- 20 ml za standardne ploče (16,17).



**Slika 10.** Shematski prikaz SFB tehnike formiranja sferoida

RCC funkcija je slična kao SFB, ali razlika ove metode je u tome da se ne miješa stanična suspenzija nego boca rotira (Slika 11). RCC sustav dizajniran je po principu rotirajuće stijenke posude prema NASA-i 1992. godine kako bi oponašala mikro gravitaciju koja vrši malu silu na stanicama u kulturi. Ovaj sustav obuhvaća komoru za kulturu u kojoj valjci na rotoru polako rotiraju komoru oko vodoravne osi i gibanje sprječava da se stanice priljube za stijenke. Brzina gibanja komore kulture je 15 rpm (okretaja u minuti) na početku kulture kada su stanice u suspenziji raspršene kao pojedinačne stanice, a kada stanice započnu formiranje trodimenzionalni struktura sferoida, brzina rotacije poveća se tako da se sferoidi drže u suspenziji (16,17).

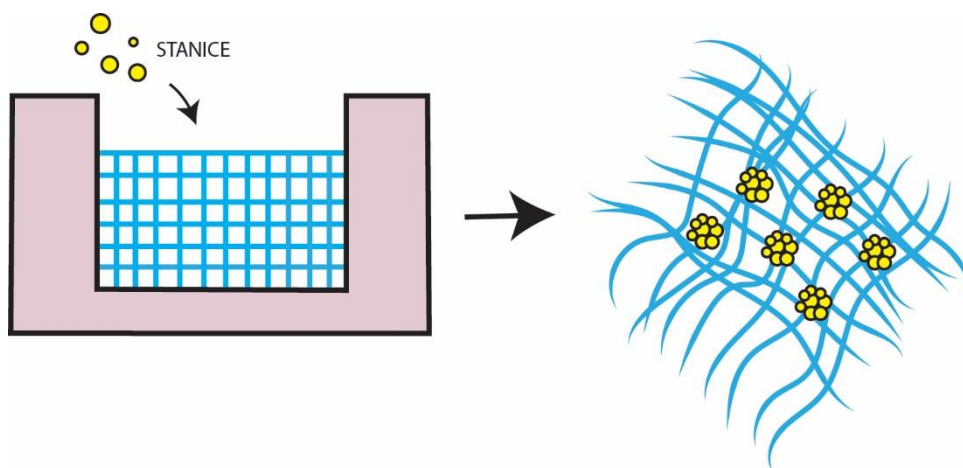


**Slika 11.** Shematski prikaz RCC metode u formiranju 3D sferoida

### 1.6.3. Metode formiranja 3D kultura sa nosačima

Matrice su nosači dostupni u različitim izvedbama, različite poroznosti, propusnosti i mehaničkih karakteristika. Matrice stanicama osiguravaju izvanstanični prostor (ECM) koji je sličan *in vivo* okruženju što ima utjecaja na staničnu organizaciju i funkciju.

Ovisno o njihovoj čvrstoći matrice dijelimo na hidrogelove i mikroporozne (spužvaste) matrice. Hidrogelovi posjeduju visok sadržaj vode i prirodne materije (agaroza, fibrin, kolagen, lamin), koji stvarju lagano okruženje za rast stanica. Mikroporozni materijali građeni su od polistirena i PLGA (eng. *poly lactic-co-glycolic acid*). Glavna prednost ovog nosača je definirana geometrija te fiksna veličina pora (5). Stanice koje nasadujemo razvijaju se u strukture slične onima u tkivu iz kojeg je nastala stanica. Ovom metodom stanice možemo nasadivati tako da ih ugrađujemo unutar gela ili na vrhu gela. Cilj je gela oponašati ECM stanica. Gelovi su napravljeni od smjese ECM prirodnog podrijetla, kao što su kolagen i alginat, također gelovi koji mogu sadržavati i određene faktore rasta. Struktura gela mijenja se s vremenom ovisno o organizaciji stanica u kulturi. Upotreba gela omogućuje generiranje 3D sferoida koji razvijaju se na prirodan način (Slika 12) (16,17).



**Slika 12.** Shematski prikaz matrice



## 2.0. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

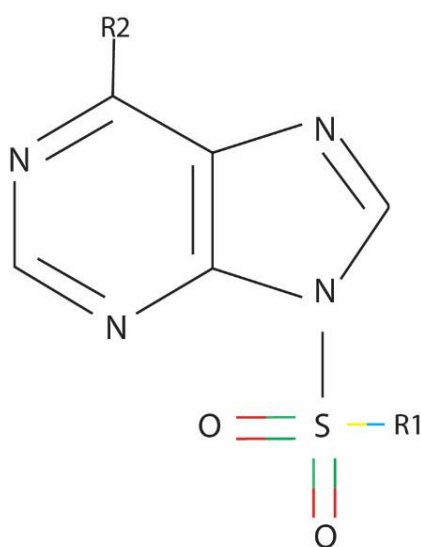
1. Odrediti razlikuje li se antiproliferativni potencijal derivata *N*-9 sulfonilureja na rast normalnih i tumorskih stanica u uvjetima 2D i 3D kulture *in vitro*.
2. Ustanoviti povezanost između strukture i koncentracije novih spojeva i inhibicije staničnog rasta.
3. Definirati spoj koji ima najveću učinkovitost na rast tumorskih stanica, a da istovremeno ne djeluje inhibitorno na rast kulture epitelnih stanica.
4. Odrediti dolazi li do promjena u staničnom ciklusu stanica izloženih ispitivanim spojevima.

### 3.0. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Derivati *N*-9 sulfonilureja

Tumorske i normalne stanične linije tretirane su derivatima purinskih nukleozida *N*-9 sulfonilureja koji su sintetizirani u Laboratoriju za supramolekularnu i nukleozidnu kemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu (Slika 13). Spojevi su dobiveni u prahu određene mase i otopljeni u dimetil sulfoksidu (DMSO) kao  $1 \times 10^{-2}$  mol/L koncentrirane otopine, a potom pohranjeni na  $-20$  °C do uporabe. Priprema radnih otopina odvija se otapanjem stock otopine ( $1 \times 10^{-2}$  mol/L) u sterilnoj destiliranoj vodi u određenom volumenu.



**Slika 13.** Osnovna molekularna struktura novosintetiziranih purina

### 3.1.2. Kemikalije

Korištene su kemikalije i reagensi različitih proizvođača: Dulbecco modificirani Eagleov medij (DMEM) Lonza, Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640) Lonza, fetalni goveđi serum (FBS) GIBCO Invitrogen, 0,25 % tripsin EDTA GIBCO Invitrogen, penicilin/streptomycin (100 x) GIBCO Invitrogen, tripansko plavilo 0,4 % GIBCO Invitrogen, (4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) Sigma-Aldrich, 13 glutamin 200 mM GIBCO Invitrogen, 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (HEPES) Sigma, natrij dodecil sulfat (SDS) Sigma-Aldrich, dimetil sulfoksid (DMSO) Acros Organics, fosfatni pufer (*eng. Phosphate Buffered Saline*, PBS), MTT reagens (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolijev bromid).

### 3.1.3. Stanične linije

Učinak novih *N*-9 sulfonilrea derivata proučavan je na humanim staničnim linijama i jednoj animalnoj staničnoj liniji u dvodimenzionalnoj i trodimenzionalnoj staničnoj kulturi.

Adherentne stanične linije koje korištene su u radu:

- HeLa - adenokarcinom vrata maternice
- NCI-H358 - bronhioalveolarni karcinom
- CaCo-2 - karcinom debelog crijeva
- MDCK1 - epitelne stanice bubrega psa

Stanične linije u trodimenzionalnoj kulturi su:

- HeLa - adenokarcinom vrata maternice
- NCI-H358 - bronhioalveolarni karcinom
- CaCo-2 - karcinom debelog crijeva

Sljedeće stanične linije u suspenziji su:

- K562 - kronična mijeloidna leukoemija u bastičnoj krizi
- Raji - Burkittov limfom
- Hut 78 - limfom T-stanica
- CCRF-CEM - akutna limfoblastična leukemija
- MOLT4 - leukemija T-stanica; akutna limfoblastična leukemija

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Kultura stanica *in vitro*

Kultura stanica izvodi se u laboratoriju koji zahtjeva osigurane uvjete za uzgoj stanica kao što su kabineti za rad koji omogućuju uvjete sterilnog rada uz laminarni protok zraka i sterilan pribor u cilju sprječavanja kontaminacije kultura stanica.

Stanice su nasađivane u boce za uzgoj površine rasta 25 i 75 cm<sup>2</sup> (BD, Falcon, Njemačka) u CO<sub>2</sub> inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u uvjetima na 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>, uz prisutnost vlažnosti zraka.

Adherentne stanične linije HeLa, CaCo-2 i MDCK1, uzgajane su u DMEM mediju uz dodatak 10 % FBS, 2 mM glutamina i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomicina. NCI-H358 stanice su uzgajane u RPMI 1640 mediju obogaćenom s 10 % FBS, 2 mM L-glutamina, 1 mM natrijevim piruvatom, 10 mM HEPES-a i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomicin antibiotika. Za odvajanje adherentnih stanica od podloge korišten je proteolitički enzim tripsin. Nakon uklanjanja medija stanice su tripsinizirane 6 min u CO<sub>2</sub> inkubatoru nakon čega je tripsin inaktiviran dodatkom medija za uzgoj stanica.

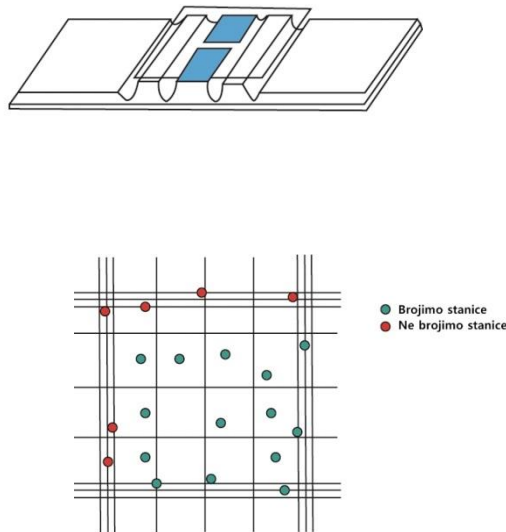
Stanične linije koje rastu u suspenziji K562, Raji, HuT 78, CCRF-CEM, MOLT4 kultiviramo u RPMI 1640 mediju obogaćenom s 10 % FBS, 2 mM L-glutamina, 1 mM natrijevim piruvatom, 10 mM HEPES-a i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomicin antibiotika. Održavanje staničnih linija u suspenziji provedeno je oduzimanjem određenog volumena stanica koji je nadoknađen svježim medijem RPMI 1640.

### 3.2.2. Određivanje vijabilnosti stanica

Vijabilnost stanica određivana je testom s tripan plavilom. Za test tripan plavilom uzimamo 50  $\mu\text{l}$  stanične suspenzije koju smo prethodno dobili postupkom tripsinizacije kod adherentne stanične linije ili oduzimanjem volumena kod stanica u suspenziji i resuspendiramo je sa 100  $\mu\text{l}$  tripan plavila. Brojanje stanica nam je omogućeno uz Bürker-Türk-ovu komoricu koju gledamo na invertnom mikroskopu (Slika 14). Razlika između živih i mrtvih stanica vidljiva je u samoj obojanosti stanice. Žive su stanice s neoštećenom membranom i ne dopuštaju prodor boje u stanicu te ostaju neobojene, dok su mrtve stanice zbog oštećene membrane obojane tripan plavilom u plavo.

Broj živih stanica određene linije određen je pomoću formule:

$$R = \frac{N \text{ ukupni broj stanica} \times 3 \text{ faktor razrjeđenja}}{4 \text{ broj polja u komorici}} \text{ stanica } 10^4$$



**Slika 14.** Shematski prikaz Bürker-Türk komorice

### 3.2.3. MTT test

Učinak kemijskog spoja na rast stanica određen je MTT testom. Temelj MTT testa žuta je tetrazolijeva MTT sol (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) koja reducira se u metabolički aktivnim stanicama uz djelovanje enzimima dehidrogenaze koje stvaraju intracelularne ljubičaste kristale formazana. Intenzitet obojenja proporcionalan je broju metabolički aktivnih odnosno živih stanica i očitava se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 570 do 590 nm pomoću mikročitača (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA).

### 3.2.4. Postupak MTT testa u dvodimenzionalnoj staničnoj kulturi

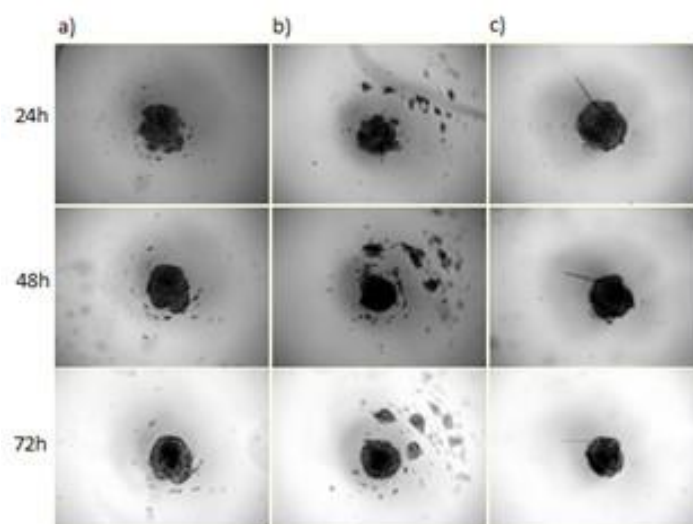
Adherentne stanične linije (Hela, CaCo-2, MDCK1, NCI-H358) nasadene su na mikrotitarske ploče namijenjene uzgoju adherentnih stanica u određenoj koncentraciji  $2 \times 10^4$  stanica/ml u volumenu od 200  $\mu$ l (180  $\mu$ l stanične suspenzije i 20  $\mu$ l spoja). U istim uvjetima nasadujemo kontrolne stanice koje ostavljamo ne tretirane. Također pohranjujemo kontrole s početnim brojem stanica na  $-20$  °C u epruvetama od 1 ml. Nasadene stanice ostavljene su 24 sata u inkubator na 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> radi prihvaćanja na podlogu. Nakon inkubacije stanice tretiramo dodavanjem 20  $\mu$ l spoja derivata *N*-9 sulfonilureja u različitim radnim koncentracijama s kojima ostvarujemo željene finalne koncentracije. Finalne koncentracije derivata *N*-9 sulfonilureja spoja **DS-V-37**:  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  i  $5 \times 10^{-5}$  mol/L, također finalne koncentracije spojeva **R-194** i **TsA**:  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-4}$  mol/L. MTT test provodio se u vremenskom razdoblju od 24, 48 i 72 sata. Nakon tretmana uklonjen je medij i dodano je 40  $\mu$ l 1xMTT/PBS koncentracije 4 mg/ml u svaku jažicu i sve je zatim inkubirano tijekom 4 sata. Zatim je u svaku jažicu dodano 160  $\mu$ l DMSO i nakon miješanja mikrotitarskih ploča na tresilici u vremenu od 30 minuta očitani su na mikročitaču.

Stanice u suspenziji (K562, Raji, HuT 78, CCRF-CEM, MOLT4) nasadene su na mikrotitarske ploče za uzgoj stanica u suspenziji u koncentraciji  $1 \times 10^5$  stanica/ml u ukupnom volumenu od 100  $\mu$ l (90  $\mu$ l stanične suspenzije i 10  $\mu$ l spoja), te nasadujemo kontrolne stanice koje ostavljamo ne tretirane. Nakon nasadivanja odmah dodajemo 10  $\mu$ l spoja derivata *N*-9 sulfonilureja u različitim finalnim koncentracijama **DS-V-37**:  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  i  $5 \times 10^{-5}$  mol/L i koncentracije spojeva **R-194** i **TsA**:  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-4}$  mol/L. Stanice su inkubirane tijekom 24, 48 i 72 sata nakon kojega dodano je 10  $\mu$ l MTT (10 x koncentriran), sve je inkubirano 4

sata, zatim dodano je 100  $\mu\text{l}$  SDS-a u svaku jažicu. Nakon inkubacije preko noći i rezultati očitani su na mikročitaču.

### 3.2.5. Postupak MTT testa u trodimenzionalnoj staničnoj kulturi

3D kulture stanica (HeLa, CaCo-2, NCI-H358) nasadene su na mikrotitarske ploče s koničnim dnom u određenoj koncentraciji  $1 \times 10^4$  stanica/ml u volumenu od 200  $\mu\text{l}$ . Nakon nasađivanja mikrotitarske ploče centrifugirane su na 1100 okretaja 10 minuta na 25 °C. Nakon centrifugiranja nasadene ploče trodimenzionalne kulture stavljene su u inkubator u vremenskom razdoblju od 3 dana na 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> radi formiranja sferoida (Slika 15). Nakon 24 sata zamijenjen je medij i dodano je 20  $\mu\text{l}$  istraživanih derivata *N*-9 sulfonilureja. Finalne pripremljene koncentracije za ispitivane spojeve bile su: **DS-V-37**:  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  i  $5 \times 10^{-5}$  mol/L, također finalne koncentracije spojeva **R-194** i **TsA**:  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-4}$  mol/L. Nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije uklonjen je medij i dodano je 40  $\mu\text{l}$  1xMTT/PBS koncentracije 8 mg/ml u svaku jažicu. Slijedila je inkubacija u trajanju od 4 sata. Završetkom inkubacije u svaku jažicu dodajemo 160  $\mu\text{l}$  DMSO, zatim mikrotitarske ploče postavljamo na tresilicu u razdoblju od 30 minuta uz laganu trešnju koja potiče otapanje nastalih formazanskih kristala i krajnji rezultat, odnosno intenzitet obojenja očitavamo na mikročitaču.



**Slika 15.** Stanični sferoidi formirani od a) CaCo-2 stanica, b) HeLa stanica c) NCI-H358 stanica u koncentraciji od  $1 \times 10^4$  st/ml nakon 24, 48 i 72 sata. Sferoidi su slikani pod povećanjem od 50x na mikroskopu Axiovert 200M, Zeiss.

Preživljenje stanica određujemo prema formuli:

$$\text{Preživljenje (\%)} = \frac{\text{Apsorbancija tretmana} - \text{Apsorbancija blank}}{\text{Apsorbancija kontrola} - \text{Apsorbancija blank}} \times 100$$

*Blank* za adherentne stanice: MTT 1:10, DMSO

*Blank* za stanice u suspenziji: medij bez stanica, MTT 10x, 10 % SDS

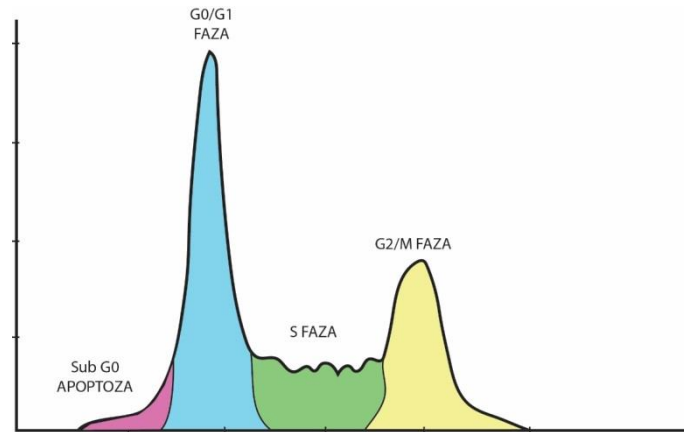
### 3.2.6. Stanični ciklus

Stanice u različitim fazama staničnog ciklusa razlikuju se u sadržaju DNK. Utjecaj strane supstance može utjecati na promjene u staničnom ciklusu. Učinak novih *N*-9 sulfonilureja derivata spoja **R-194** na stanični ciklus tumorskih stanica (HeLa, Raji) praćeno je u vremenskom razdoblju od 24 sata. Promjene u staničnom ciklusu očitavaju se upotrebom fluorescentne boje propijeva jodida (PI) koji se veže na DNK. Mjerenjem fluorescencije protočnim citometrom moguće je odrediti udio stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa (Slika 16).

Postupak:

HeLa stanice nasadene su na ploči od 6 jažica u koncentraciji  $3 \times 10^5$  stanica po jažici u volumenu od 3 ml. Nakon nasadivanja ploču inkubiramo u CO<sub>2</sub> inkubatoru preko noći. Stanice su tretirane R-194 derivatom u finalnoj koncentraciji od  $1 \times 10^{-5}$  M u vremenskom razdoblju od 24 sata. Koncentracija leukemijske stanične linije Raji je  $5 \times 10^5$  stanica u volumenu od 3 ml. Nakon nasadivanja stanice odmah tretiramo spojem R-194 također inkubirani kroz 24 sata. Po isteku vremena inkubacije stanice prenesene su u kivete s konusnim dnom gdje su adherentne stanice najprije odvojene od podloge pomoću tripsina. Stanice su zatim centrifugirane 6 minuta pri 1100 rpm. Sa stanica uklonjen je supernatant, a stanice resuspendirane su u PBS-u. Stanice su fiksirane s 3 ml hladnog 70 % etanola te pohranjene na -20°C do trenutka analize. Na dan analize stanice centrifugirane su i ispirane s 1 ml PBS-a. Sa stanica uklonjen je supernatant, a stanice resuspendirane su u 350 µl PBS-a. Na stanice je dodana RNaze A u finalnoj koncentraciji od 0,2 µg/µl te su se stanice inkubirale 5 min na RT. Stanice su obojane sa 150 µl PI u finalnoj koncentraciji od 15 µg/ml kroz 30 min pri RT. Nakon bojanja stanice prebačene su u epruvete za protočni citometar i analizirane su na protočnom citometru (FascCanto II, BD Bioscience) korištenjem Flowlogic software (Imviva Technologies).





**Slika 16.** Shematski prikaz histograma. Tipična krivulja s dva vrha od kojih jedan odgovara broju stanica u fazama  $G_0$  i  $G_1$ , a drugi broju stanica u fazama  $G_2$  i  $M$ . Stanice u fazi  $S$  raspoređene su na histogramu između dva vrha. Početak histograma započinje sa stanicama u apoptozi.

### 3.2.7. Statistička analiza podataka

Rezultati stanične proliferacije dobiveni MTT testom analizirani su primjenom statističkog programa Statistica for Windows v. 13.1. Rezultati su prikazani u obliku grafičkog prikaza srednjih vrijednosti sa standardnim devijacijama ( $\pm$  SD) rezultata od tri nezavisna ponavljanja u triplikatu. Za analizu statističke značajnosti između tretiranih i kontrolnih stanica u kulturi korištena je neparametrijska analiza primjenom Kolmogorov-Smirnov test. Svi podatci su prikazanu sa statističkom značajnošću od  $P < 0,05$ .

## 4.0. REZULTATI

### 4.1. Određivanje antiproliferativnog učinka derivata *N*-9 sulfonilureja u 2D kulturi

Testiranjem različitih koncentracija novih sintetiziranih derivata *N*-9 sulfonilureja ispitivana je vijabilnost tretiranih stanica (MDCK1, HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562, Raji, Hut 78, CCRF-CEM, MOLT4) MTT testom. Rezultati su prikazani na temelju srednjih vrijednosti dobivenih rezultata testa i prikazuju postotak rasta tretiranih stanica u odnosu na kontrolne (netretirane) stanice. Derivat **R-194** iz grupe novosintetiziranih *N*-9 sulfonilureja pokazao je najbolji inhibicijski rast na pojedinim staničnim linijama, u odnosu na spojeve **DS-V-37** i **TsA** koji ne ostvaruju značajan učinak na testiranim tumorskim stanicama.

Spojevi **R-194** i **TsA** testirani su u finalnom koncentracijskom nizu od  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-4}$  M, a spoj **DS-V-37** u finalnom koncentracijskom nizu od  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M i  $5 \times 10^{-5}$  M. Citotoksičnost je određena u vremenskom razdoblju od 24, 48 i 72 sata. Rezultati testa prikazani su na slikama (17a-i).

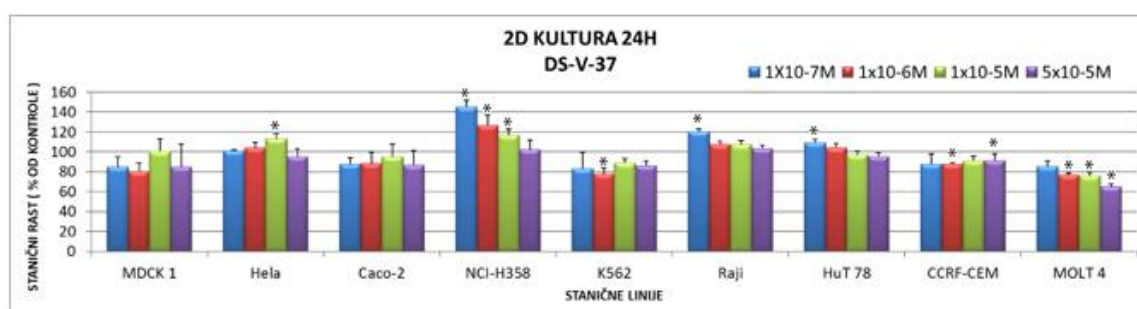
#### 4.1.1. Antiproliferativni učinak derivata *N*-9 sulfonilureja nakon 24 sata

Spoj **DS-V-37** (Slika 17a) testiran u koncentraciji od  $1 \times 10^{-7}$  M ne pokazuje statistički značajan inhibicijski učinak na testiranim staničnim linijama. Testirane stanice limfoma (Raji i HuT 78) pokazuju otpornost na djelovanje **DS-V-37**, dok su se leukemijske stanice pokazale bitno osjetljivije (Slika 17a-c). Od testiranih leukemijskih stanica **DS-V-37** u postotku većem od 20 % inhibira MOLT4 stanice, s izraženom inhibicijom od 35 % pri koncentraciji od  $5 \times 10^{-5}$  M, dok **DS-V-37** inhibira stanični rast K562 stanica u više od 13 % pri svim apliciranim koncentracijama. Učinak derivata **DS-V-37** na testirane stanice karcinoma vidljiv je na CaCo-2 stanicama s inhibicijom rasta stanica od 13 % pri svim testiranim koncentracijama, dok derivat ne inhibira rast HeLa i NCI-H358 stanica. Normalne stanične linije pokazuju blagu osjetljivost na **DS-V-37** u ovisnosti o koncentraciji.

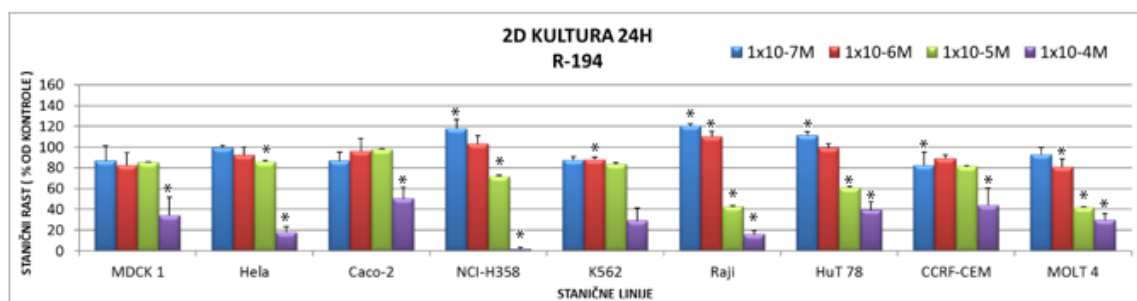
Spoj **R-194** (Slika 17b) u koncentraciji od  $1 \times 10^{-7}$  M prikazuje minimalan inhibicijski učinak na testirane stanice s progresivnom inhibicijom staničnog rasta s povećanjem aplicirane koncentracije. Spoj **R-194** u koncentraciji od  $1 \times 10^{-4}$  M, inhibira stanični rast NCI-H358 stanica gotovo u potpunosti, rast HeLa stanica 82 % i CaCo-2 stanica 50 %. Istovremeno, **R-194** u

koncentraciji  $1 \times 10^{-4}$  M inhibira tek 25 % rasta normalnih MDCK1 stanica. Uočava se graduirano djelovanje **R-194** derivata prema svim testiranim leukemijskim stanicama, gdje su Raji stanice pokazale se najosjetljivijima s inhibicijom od 84 %.

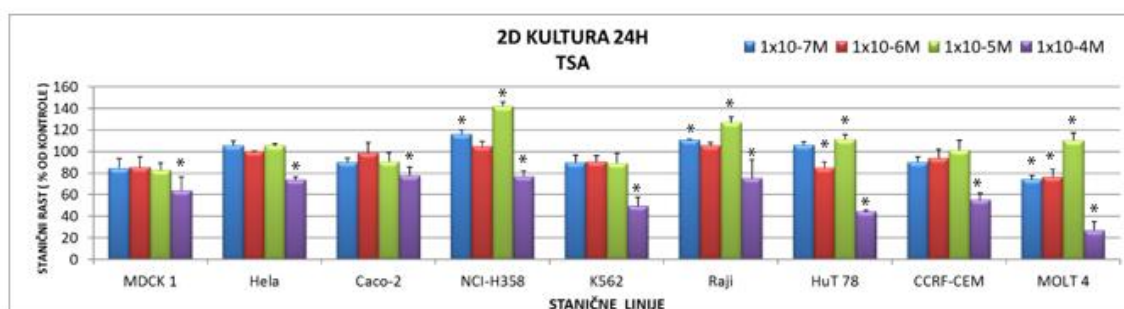
Blagi inhibicijski učinak pokazuje spoj **TsA** (Slika 17c) pri koncentraciji od  $1 \times 10^{-7}$  M. Apliciran u koncentraciji od  $1 \times 10^{-4}$  M **TsA** inhibira rast leukemijskih stanica za 25 %. Najosjetljivija stanična linija bila je MOLT4 s inhibicijom od oko 73 %. **TsA** inhibirao je rast normalnih MDCK1 stanica za oko 36 %, dok na stanične linije karcinoma HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 pokazuje neznatan učinak (oko 20 %).



17a



17b



17c

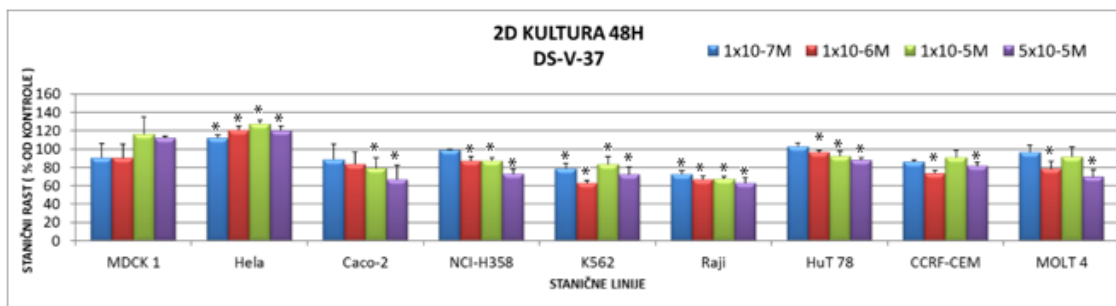
**Slika 17.** (a-c) MTT testom određena je vijabilnost tretiranih stanica. Stanice su tretirane *N-9* sulfonilureja derivatima pri različitim koncentracijama kroz vremensko razdoblje od 24 sata. Rezultati su prikazani prema srednjem udjelu vijabilnih tretiranih stanica u odnosu na kontrolne (ne tretirane) stanice. Statistički značajna *P* vrijednost definirana je  $P < 0,05$  (\*) u odnosu na kontrolne stanice.

#### 4.1.2. Antiproliferativan učinak derivata *N-9* sulfonilureja nakon 48 sati

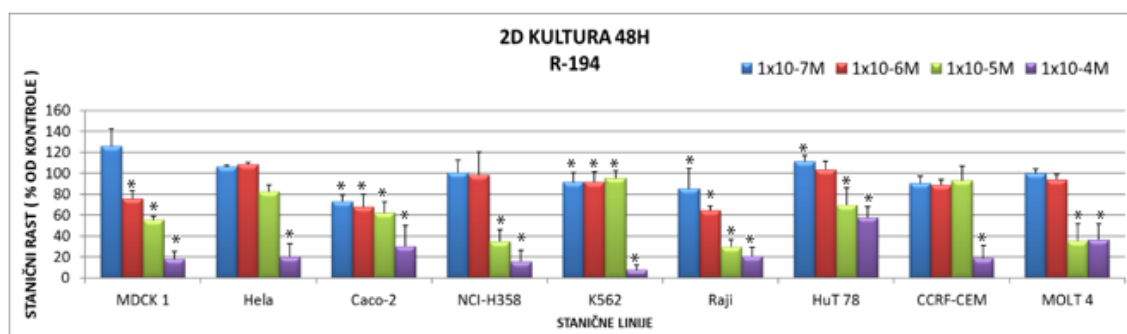
Spoj **DS-V-37** (Slika 17d) nakon 48 sati inkubacije pri koncentraciji  $1 \times 10^{-7}$  M prikazuje lagani inhibicijski učinak od 10-20 % prema svim testiranim staničnim linijama. Pri većim koncentracijama derivata od  $5 \times 10^{-5}$  M ostvaruje se blagi inhibicijski učinak od 30 % na leukemijske stanične linije MOLT4 i K562 s oko 27 % te nešto slabiji učinak na Raji, HuT 78 i CCRF-CEM s više od 20 %. Djelovanje je **DS-V-37** gotovo neprimjetno.

Osjetljivost većine testiranih staničnih linija na tretman s **R-194** u koncentraciji od  $1 \times 10^{-4}$  M vidljiva je s inhibicijom staničnog rasta koja je viša od 60 %. Izuzetak je HuT 78 stanična linija (Slika 17e).

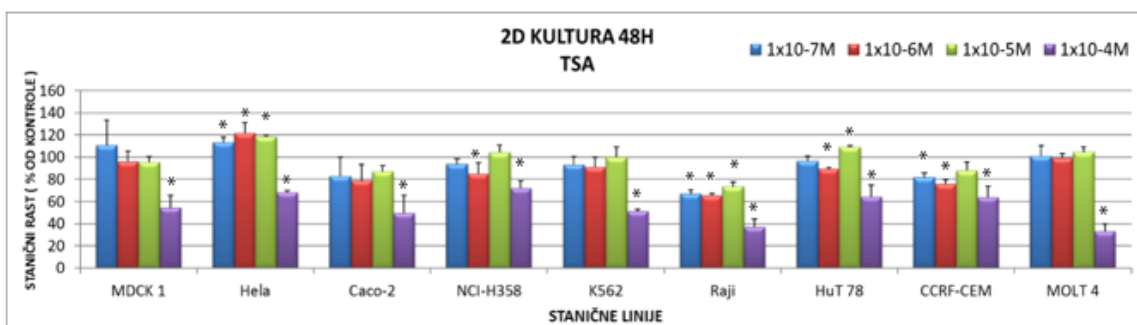
**TsA** pripremljen u koncentraciji od  $1 \times 10^{-7}$  M (Slika 17f) značajno ne inhibira rast stanica osim stanica Raji kod kojih je rast inhibiran oko 34 %. Značajniju inhibiciju rasta stanica, veću od 50 % **TsA** postiže pri koncentraciji od  $1 \times 10^{-4}$  M na leukemijskim staničnim linijama. Inhibicija na adherentnim stanicama je nešto manja za CaCo-2 stanice oko 50 % i na normalne stanične linije MDCK1 djeluje na inhibiciju rasta 54 % stanica.



17d



17e



17f

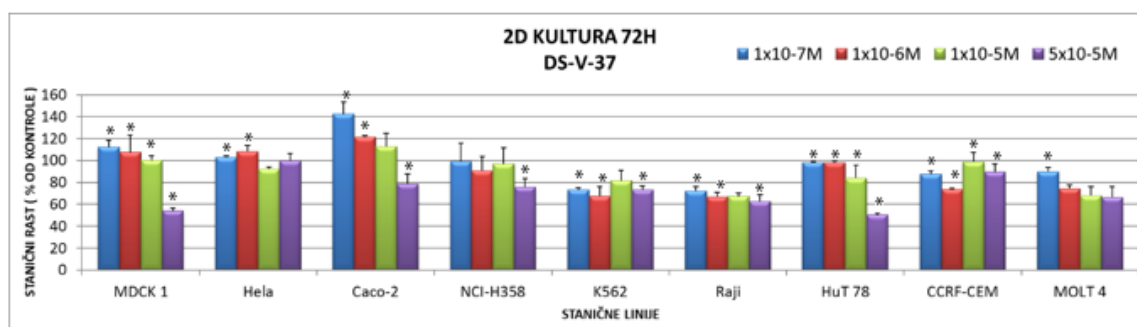
**Slika 17.** (d-f) MTT testom određena je vijabilnost tretiranih stanica. Stanice su tretirane *N*-9 sulfonilureja derivatima pri različitim koncentracijama tijekom 48 sati. Rezultati su prikazani prema srednjem udjelu vijabilnih tretiranih stanica u odnosu na kontrolne (ne tretirane) stanice. Statistički značajna *P* vrijednost definirana je  $P < 0,05$  (\*) u odnosu na kontrolne stanice.

#### 4.1.3. Antiproliferativan učinak derivata *N*-9 sulfonilureja nakon 72 sata

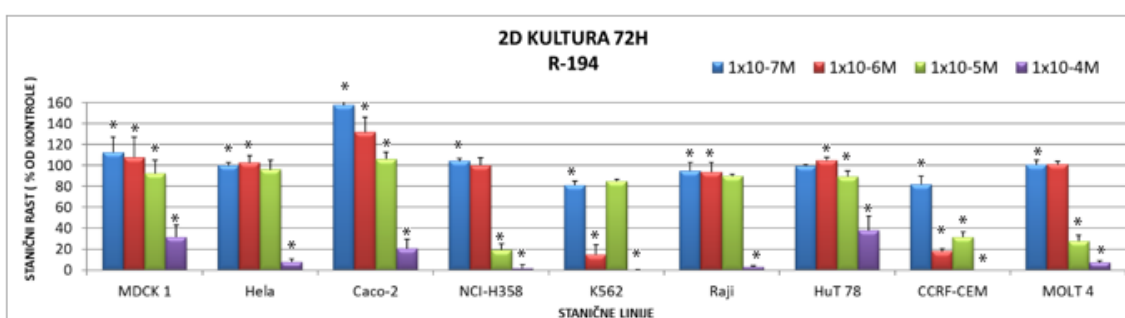
Pripremljen u koncentraciji  $1 \times 10^{-7}$  M spoj **DS-V-37** (Slika 17g) ne ostvaruje značajan učinak na testiranim stanicama, dok u koncentraciji  $5 \times 10^{-5}$  M inhibira rast HuT 78 stanica za 50 %, MOLT4 stanica od 34 %, s inhibicijom rasta od oko 45 % normalne stanične linije MDCK1.

Spoj **R-194** (Slika 17h) primijenjen u koncentraciji  $1 \times 10^{-4}$  M gotovo potpuno inhibira rast svih staničnih tumorskih linija, s izuzetkom HuT 78 stanica, dok su normalne MDCK1 stanice inhibirane oko 30 %.

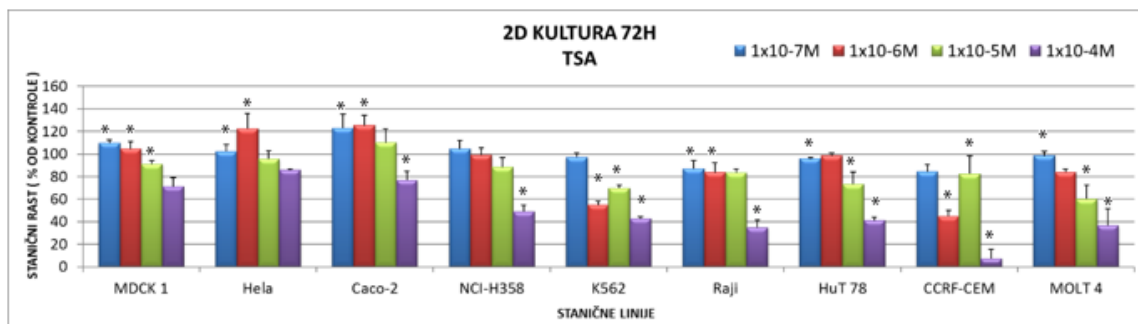
Spoj **TsA**, primijenjen u koncentraciji  $1 \times 10^{-4}$  M inhibira rast leukemijskih stanica, posebno CCRF-CEM stanica od 92 %, a rast NCI-H358 stanica za 52 %, dok je rast MDCK1 stanica smanjen za 29 % u odnosu na kontrolne stanice (Slika 17i).



17g



17h



17i

**Slika 17.** (g-i) MTT testom određena je vijabilnost tretiranih stanica. Stanice su tretirane derivatima *N*-9 sulfonilureje pri različitim koncentracijama tijekom 72 sata. Rezultati su prikazani prema srednjem udjelu vijabilnih tretiranih stanica u odnosu na kontrolne (ne tretirane) stanice. Statistički značajna *P* vrijednost definirana je  $P < 0,05$  (\*) u odnosu na kontrolne stanice.

#### 4.2. Usporedba antiproliferativnog učinka derivata *N*-9 sulfonilureja u 2D i 3D kulturi

Usporedba rezultata dobivenih uzgojem stanica u 2D i 3D kulturi *in vitro* na tumorskim staničnim linijama HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 koje tretirane su spojem **R-194** tijekom 24, 48 i 72 sata dana je na slici 18 (a-i). Ispitano je djelovanje **R-194** u koncentracijama  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M i  $1 \times 10^{-4}$  M.

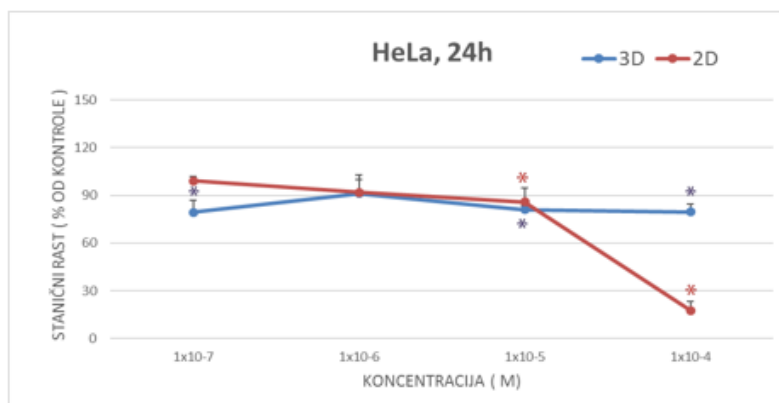
##### 4.2.1. Antiproliferativni učinak derivata **R-194** u 2D i 3D kulturi na HeLa stanicama

Utjecaj derivata **R-194** na HeLa stanice nakon inkubacije od 24 sata, pri koncentraciji od  $1 \times 10^{-7}$  M u 2D kulturi prikazuje slabi inhibicijski učinak, dok u 3D kulturi inhibicija rasta tumorskih stanica je oko 20 %. Pri koncentracijama  $1 \times 10^{-6}$  M i  $1 \times 10^{-5}$  M učinak derivata jednak je u 2D i 3D kulturi stanica. Nakon tretmana stanica s  $1 \times 10^{-7}$  M derivat **R-194** vidljiva je razlika između 2D i 3D kulture, gdje se 2D kultura pokazala osjetljivijom za 62 % od 3D kulture (Slika 18a).

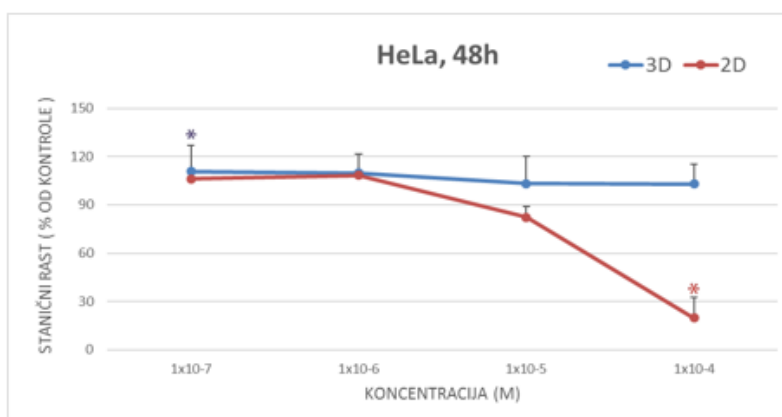
Nakon 48 satne inkubacije s  $1 \times 10^{-7}$  M **R-194** nema razlike u inhibiciji rasta stanica između 2D i 3D kulture. Postupno s povećanjem koncentracije dolazi do inhibicije rasta stanica u 2D kulturi dok u 3D kulturi i dalje nema pomaka u inhibiciji rasta HeLa stanica. Pri najvećoj

koncentraciji  $1 \times 10^{-4}$  M u 2D kulturi postignuta je inhibicija rasta stanične linije HeLa s 80 %, a u 3D kulturi stanica inhibicija rasta stanica nije uočena (Slika 18b).

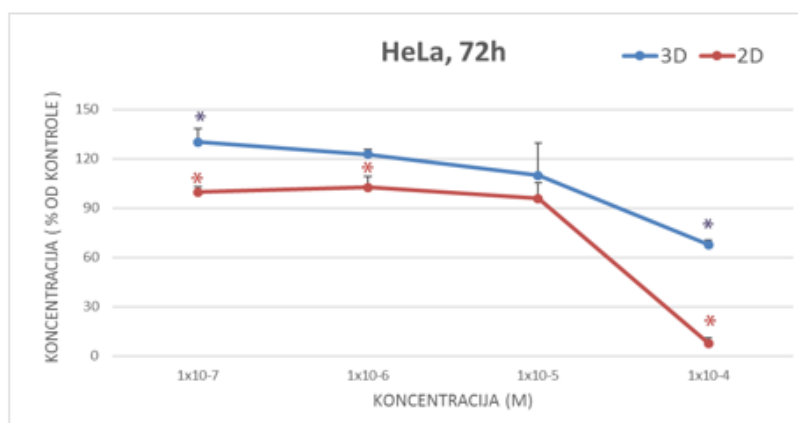
Nakon inkubacije od 72 sata, pri koncentraciji od  $1 \times 10^{-7}$  M nije uočena inhibicija rasta niti u 2D i 3D kulturi. Primjenom ovog spoja u koncentraciji  $1 \times 10^{-4}$  M u 2D kulturi dolazi do gotovo potpune inhibicije rasta HeLa tumorskih stanica, dok u 3D kulturi inhibicija rasta stanica je oko 35 % (Slika 18c).



18a



18b



18c



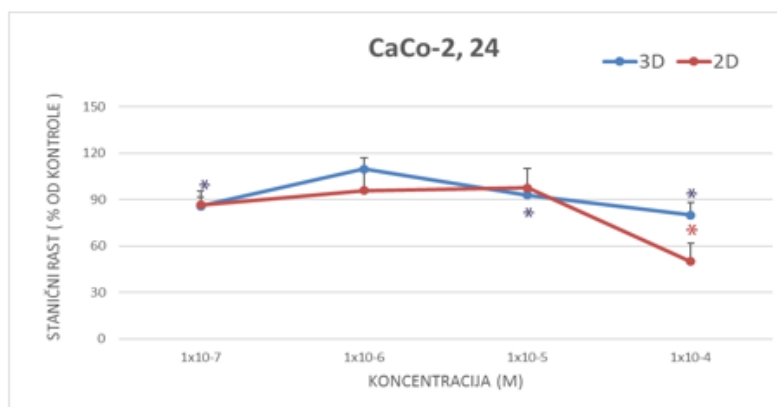
**Slika 18.** (a-c) MTT testom određena je vijabilnost tretiranih HeLa stanica u 2D i 3D kulturi. Stanice su tretirane derivatom *N*-9 sulfonilurea **R-194** pri različitim koncentracijama kroz vremensko razdoblje od 24, 48 i 72 sata. Rezultati su prikazani prema srednjem udjelu vijabilnih tretiranih stanica u odnosu na kontrolne (ne tretirane) stanice. Statistički značajna *P* vrijednost definirana je  $P < 0,05$  (\*) u odnosu na kontrolne stanice.

#### 4.2.2. Antiproliferativni učinak derivata **R-194** u 2D i 3D kulturi na CaCo-2 stanicama

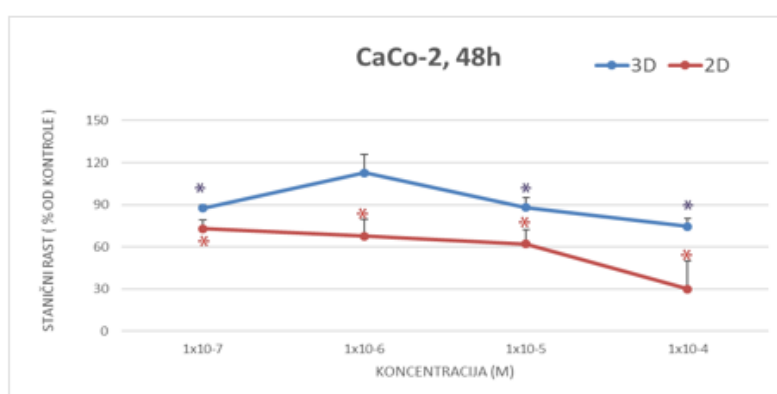
Djelovanje spoja **R-194** na staničnu liniju CaCo-2 u 2D i 3D kulturi nakon inkubacije od 24 sata pri najmanjoj koncentraciji od  $1 \times 10^{-7}$  M učinak je isti na obje kulture s laganom inhibicijom oko 10 %, dok pri najvećoj koncentraciji derivata od  $1 \times 10^{-4}$  M vidimo razliku u 2D kulturi koja je osjetljivija i prikazuje inhibiciju rasta stanične linije CaCo-2 oko 50 %, a u 3D kulturi inhibicija staničnog rasta je 20 % (Slika 18d).

Vidljivu razliku u kulturama vidimo nakon završene inkubacije od 48 sati. Inhibicija rasta stanične linije CaCo-2 pri koncentraciji od  $1 \times 10^{-7}$  M u 2D kulturi inhibicija rasta je veća za 15 % od 3D kulture. Kod koncentracije od  $1 \times 10^{-4}$  M inhibicija rasta CaCo-2 stanične linije u 2D kulturi je veća od inhibicije rasta stanica u 3D kulturi za 45 % (Slika 18e).

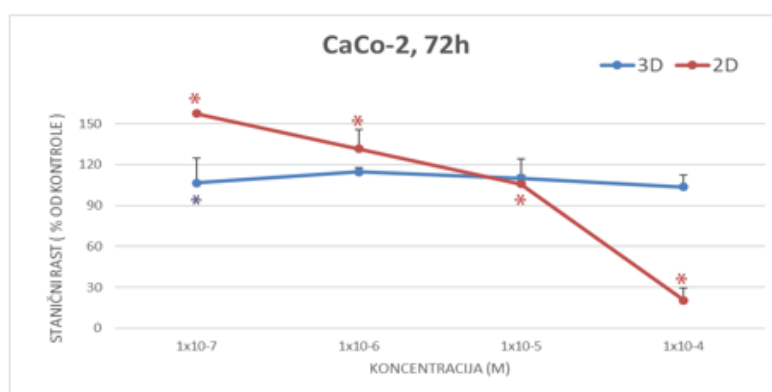
Inkubacijom stanica nakon 72 sata spojem **R-194** pri koncentraciji od  $1 \times 10^{-7}$  M ne prikazuje se inhibicijski učinak u nijednoj staničnoj kulturi (2D i 3D). Povećanjem koncentracije započinje povećana inhibicija staničnog rasta u 2D kulturi, dok u 3D nema značajnog pomaka inhibicije staničnog rasta u CaCo-2 stanicama (Slika 18f).



18d



18e



18f

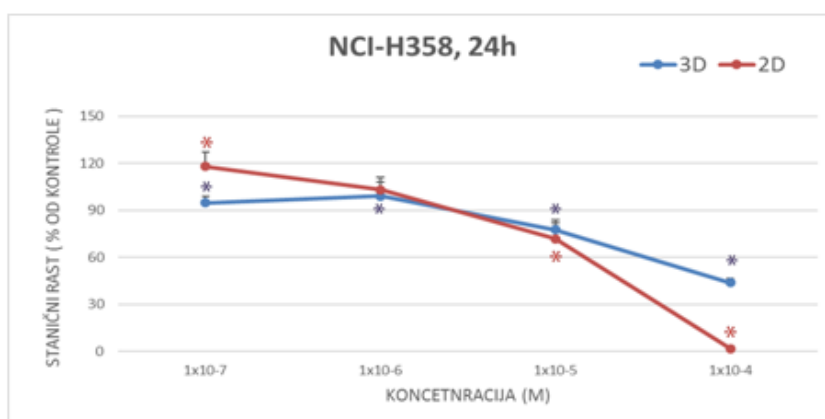
**Slika 18.** (d-f) MTT testom određena je vijabilnost tretiranih CaCo-2 stanica u 2D i 3D kulturi. Stanice su tretirane derivatom *N*-9 sulfonilurea **R-194** pri različitim koncentracijama kroz vremensko razdoblje od 24, 48 i 72 sata. Rezultati su prikazani prema srednjem udjelu vijabilnih tretiranih stanica u odnosu na kontrolne (ne tretirane) stanice. Statistički značajna *P* vrijednost definirana je  $P < 0,05$  (\*) u odnosu na kontrolne stanice.

### 4.2.3. Antiproliferativni učinak derivata **R-194** u 2D i 3D kulturi na NCI-H358 stanicama

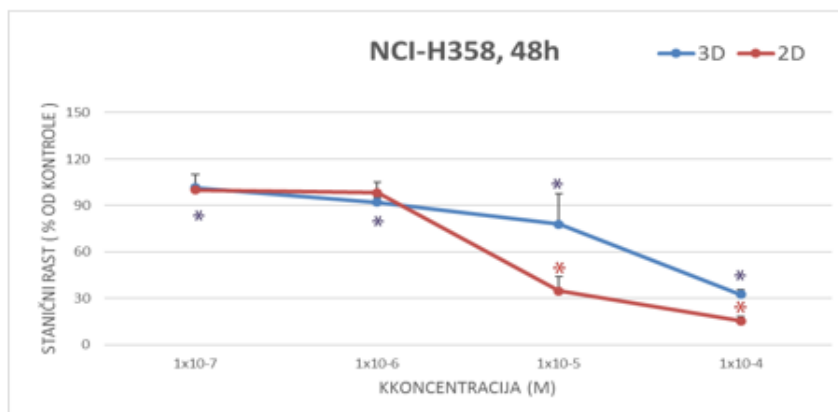
Razlika u 2D i 3D kulturi pri tretmanu derivata **R-194** nakon inkubacije od 24h na NCI-H358 pri koncentraciji od  $1 \times 10^{-7}$  M ne prikazuje značajan utjecaj na obje kulture. Pri povećanju koncentracije dolazi do progresivne inhibicije rasta tumorskih stanica u 2D kulturi gdje je postignuta gotovo potpuna inhibicija rasta stanica, dok ju slijedi i 3D kultura stanica NCI-H358 s inhibicijom od 60 % (Slika 18g).

Osjetljivost u 2D i 3D kulturi nakon inkubacije od 48h vidljiva je inhibicija rasta tumorski stanica koja je proporcionalna s povećanjem koncentracije derivata **R-194**. Razlika 2D i 3D kulture u inhibiciji rasta tumorski stanica NCI-H358 je oko 15 % (Slika 18h).

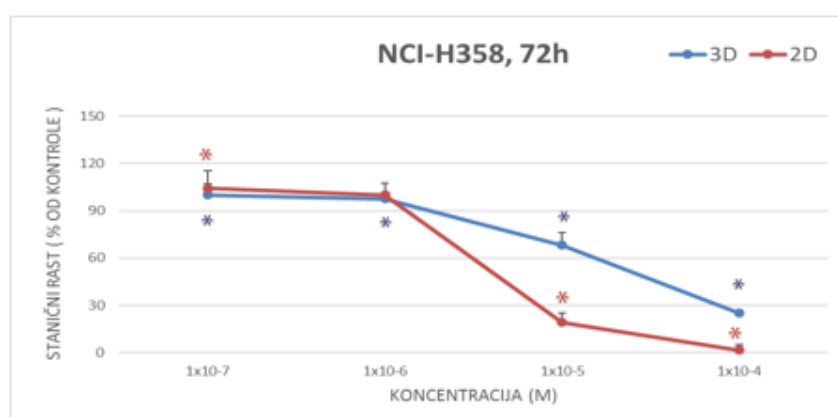
Nakon inkubacije od 72 sata, prikazana je slična osjetljivost kao i nakon 48 sati inkubacije. Proporcionalni pad s povećanjem koncentracije spoja **R-194** koja u 2D kulturi dovodi do potpune inhibicije rasta tumorski stanica NCI-H358, a u 3D kulturi inhibicija rasta stanica je oko 75 % (Slika 18i).



18g



18h



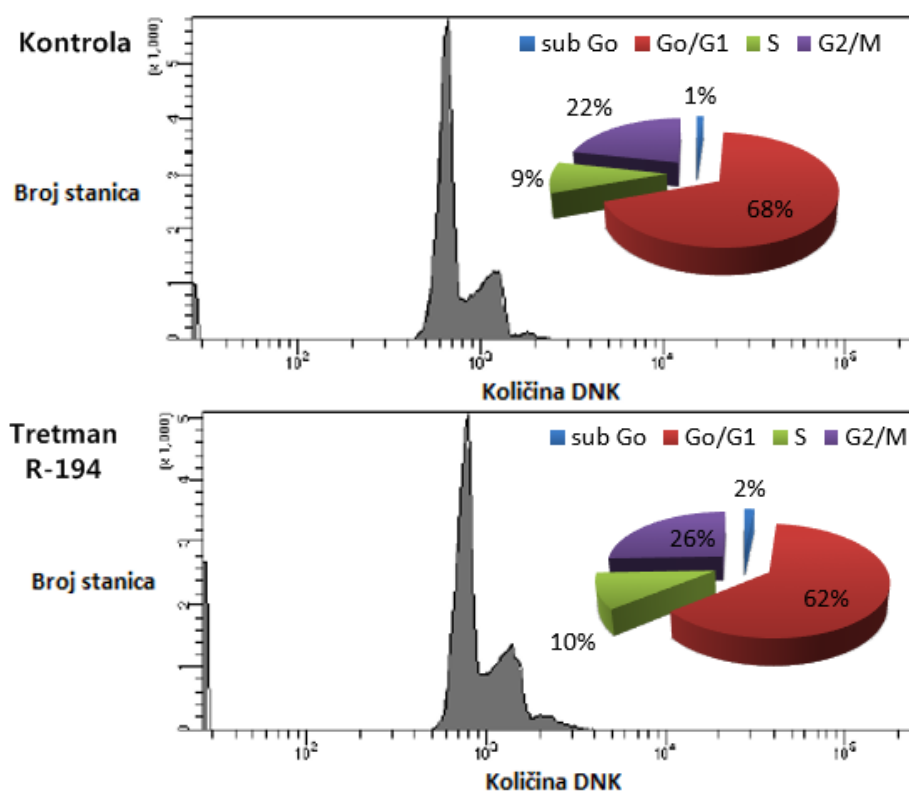
18i

**Slika 18.** (g-i) MTT testom određena je vijabilnost tretiranih NCI-H358 stanica u 2D i 3D kulturi. Stanice su tretirane derivatom *N*-9 sulfonilurea **R-194** pri različitim koncentracijama kroz vremensko razdoblje od 24, 48 i 72 sata. Rezultati su prikazani prema srednjem udjelu vijabilnih tretiranih stanica u odnosu na kontrolne (ne tretirane) stanice. Statistički značajna *P* vrijednost definirana je  $P < 0,05$  (\*) u odnosu na kontrolne stanice.

### 4.3. Analiza staničnog ciklusa protočnim citometrom

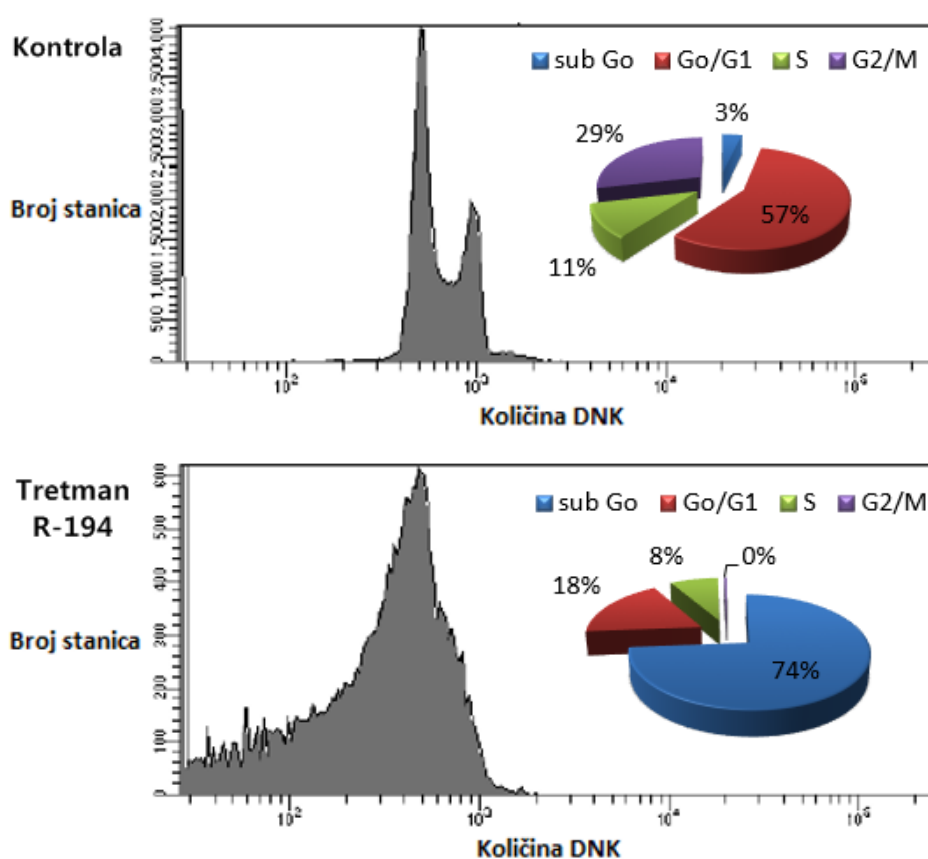
Nakon izlaganja stanica HeLa i Raji, derivatu **R-194** u finalnoj koncentraciji  $1 \times 10^{-5}$  M tijekom 24 sata testirane su promjene u staničnom ciklusu protočnom citometrijom.

Nakon 24 sata najviše kontrolnih stanica HeLa nalazi se u fazama  $G_1$  i  $G_0$  (68 %),  $G_2$  i M (22 %), zatim u S fazi (9 %) te naposljetku u sub  $G_0$  (1 %). Nakon tretmana HeLa stanica s **R-194** nema značajne promijene raspodjele stanica u određenim fazama staničnog ciklusa, u odnosu na netretirane stanice (Slika 19).



**Slika 19.** Prikaz udjela HeLa stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa u kontrolnim stanicama i tretiranim stanicama derivatom **R-194** nakon 24 sata.

Tretman derivatom **R-194** na staničnoj liniji Raji nakon 24 sata, uzrokuje nakupljanje stanica u sub  $G_0$  fazi od 74 % u odnosu na kontrolne stanice gdje je nakupljanje u istoj fazi staničnog ciklusa od 3 %. Smanjeni udio tretiranih stanica u  $G_0$  i  $G_1$  fazi je 18 % u usporedbi s kontrolnim stanicama kod kojih je udio stanica od 57 %. Raspodjela kontrolnih stanica u  $G_2$  i M fazi je 29 % dok nakon tretmana derivatom **R-194** Raji stanice nisu prisutne. Minimalna je razlika u udjelu stanica u S fazi, kontrolne stanice prikazuju udio od 11 % dok tretirane stanice prikazuju udio od 8 % (Slika 20).



**Slika 20.** Prikaz udjela Raji stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa u kontrolnim stanicama i tretiranim stanicama derivatom **R-194** nakon 24 sata

## 5.0. RASPRAVA

U ovom radu određen je antiproliferativni učinak tretmana derivata *N*-9 sulfonilureje, **DS-V-37**, **TsA** i **R-194**, na staničnim linijama nasadenim u 2D i 3D kulturi stanica u vremenskom razdoblju od 24, 48 i 72 sata. Najbolji inhibicijski učinak na rast tumorskih stanica imao je derivat **R-194**. Uočeno je statistički značajno graduirano djelovanje derivata **R-194** na svim testiranim leukemijskim stanicama (K562, Raji, CCRF-CEM, HuT 78, MOLT4), dok učinak na stanice karcinoma bio je slabiji (HeLa, CaCo-2, NCI-H358), uz blagi inhibicijski utjecaj na rast normalnih stanica (MDCK1).

Danas je poznato kako se stanice ponašaju strukturno i funkcionalno različito, ako se uzgajaju u 2D kulturi u odnosu na funkciju stanica u *in vivo* sustavu. 3D kultura tumorskih stanica je dobar model za testiranje novih spojeva, s visokim potencijalom oponašanja kompleksa trodimenzionalne organizacije tumorskog tkiva *in vivo*. Slično nativnom tumorskom tkivu, stanice uzgojene kao tumorski sferoidi pokazuju jaki proliferacijski gradijent koji odražava raspodjelu kisika, hranjivih tvari i energije, kao i nakupljanje metabolita od vanjske prema unutrašnjoj strani sferoida (20). Iz tog razloga u posljednjih nekoliko godina u istraživanjima sve više koriste se 3D stanične kulture, koje pokazuju veći stupanj strukturne složenosti i homeostaze, a koja je analogna građi i funkciji tkiva i organa (21). U ovom radu ispitano je postoje li razlike u djelovanju testiranih derivata između 2D i 3D kulture HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 stanica, tijekom 24, 48 i 72 sata (Slika 18.a-i). 2D kultura pokazala se osjetljivijom na ispitivane derivate od 3D kulture. Na osnovu dostupnih literaturnih podataka ovaj rezultat može se objasniti građom formiranih sfera (22). Kako su u 3D kulturi stanica zastupljene stanice u različitim fazama staničnog ciklusa moguće je da ispitivani spojevi različito utječu na ove stanice i izazivaju različitu inhibiciju staničnog rasta u odnosu na 2D kulturu. Nadalje, zbog slabijeg transporta testiranih spojeva moguće je kako nisu uspjeli ući u stanice koje se nalaze unutar sferoida. Objavljeni rezultati drugih studija, u kojima ispitivani su učinci sintetiziranih purinskih analoga u ulozi protutumorskih lijekova na staničnim linijama koje rastu u 2D i 3D kulturi pokazuju isto tako različitu osjetljivost stanica u kulturi *in vitro* u ovisnosti o porijeklu stanica iz kojih su generirane stanične linije (22). Ovisno o mehanizmu djelovanja bilježi se učinak na stanice koje rastu u 2D i 3D kulturi. Stoga, kemoterapeutik 5-fluorouracil ostvaruje veći inhibicijski rast stanica u 2D kulturi A431 stanica, dok tirapazamin pokazuje veću učinkovitost u 3D kulturi (23, 24).

Nekontrolirana stanična proliferacija obilježje je tumorskih stanica (25). Mnogi protutumorski lijekovi djeluju tako da zaustavljaju stanični ciklus tretiranih stanica (26). Kako bi se stekao uvid u mehanizam antiproliferativnog djelovanja ispitivanih derivata određene su i uspoređene promjene u staničnom ciklusu tretiranih i kontrolnih stanica. Mjerenjem promjene udjela stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa na odabranim stanicama HeLa i Raji potvrđeno je antiproliferativno djelovanje spoja **R-194**. Statistički značajna promjena u udjelu stanica pojedinih faza staničnog ciklusa ostvarena je na humanoj staničnoj liniji Raji, koja nakon 24-satnog tretmana pokazuje kako je većina tretiranih stanica zastala u  $G_0$  i  $G_1$  fazi staničnog ciklusa, što je obilježje stanica kod kojih je inducirana programirana smrt stanica (Slika 20) (27). Apoptoza je programirana smrt stanice, koja je nužna za održavanje stanične homeostaze. Indukcija apoptoze poželjan je mehanizam umiranja stanica izloženih kemoterapeuticima (28). Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju kako učinak tretmana ispitivanim analogima strukturno sličnog 5-fluorouracila na stanice SW480 i HCT116 nema značajne promjene kod tretiranih i kontrolnih stanica, dok promjene u staničnom ciklusu uočavamo tretiranjem stanica tiogvaninom (6-TG) koja nakon tretmana ostvaruje smanjeni udio stanica u  $G_2$  i M fazi staničnog ciklusa (29). Usporedbom rezultata dosadašnjih istraživanja, nukleozidni derivati predstavljaju dobre kandidate u istraživanju novih spojeva s protutumorskim djelovanjem.



## 6.0. ZAKLJUČAK

Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. kako novosintetizirani derivati *N*-9 sulfonilureje izazivaju različite antiproliferativne učinke na stanice koje rastu u 2D i 3D kulturi.
2. najučinkovitiji je derivat **R-194** u koncentraciji  $1 \times 10^{-4}$  M koji ima statistički značajan antiproliferativni učinak na ispitivanim tumorskim staničnim linijama.
3. stanice koje rastu u 2D kulturi osjetljivije su na djelovanje derivata **R-194** od HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 stanica koje rastu u 3D kulturi.
4. derivat **R-194** zaustavlja progresiju Raji stanica kroz stanični ciklus.
5. istraživani nukleozidni derivat **R-194** je dobar kandidat za daljnja istraživanja mehanizma njegovog protutumorskog djelovanja.

## 7.0. SAŽETAK

**Uvod:** Vodeći uzrok smrtnosti u svijetu čine tumorske bolesti koje nastaju kao posljedica zagađenja okoliša i starenja svjetske populacije. Velika je potreba za pronalaskom učinkovitih antitumorskih lijekova. Modificirani nukleozidi i baze nukleinskih kiselina predmet su mnogih istraživanja radi njihove potencijalne antitumorske i antivirusne aktivnosti.

**Cilj istraživanja:** Odrediti razlikuje li se antiproliferativni potencijal derivata *N*-9 sulfonil urea na rast normalnih i tumorskih stanica u dvodimenzionalnim i trodimenzionalnim kulturama *in vitro*.

**Materijali i metode:** Učinci derivata *N*-9 sulfonilureje na rast stanica određeni su MTT testom na panelu humanih tumorskih stanica u 2D kulturi (HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562, Raji, HuT 78, MOLT4 i CCRF-CEM), normalnim stanicama (MDCK1) i 3D kulturi stanica HeLa, CaCo-2 i NCI-H358. Promjene u staničnom ciklusu određene su protočnom citometrijom.

**Rezultati:** Testirani derivati *N*-9 sulfonilureja prikazuju antiproliferativni učinak ovisno o primijenjenoj koncentraciji i staničnoj liniji u 2D i 3D kulturi. Najbolji inhibicijski učinak na rast tumorskih stanica imao je spoj **R-194**. Raji stanice nakon izlaganja spoju **R-194** pokazuju statistički značajne promjene u udjelu stanica pojedinih faza staničnog ciklusa, a posebno nakupljanje stanica u sub G<sub>0</sub> fazi u odnosu na kontrolne stanice.

**Zaključak:** Razlikuje se odgovor stanica koje rastu u 2D i 3D kulturi na toksične učinke novositetiziranih derivata *N*-9-sulfonilureje. Najučinkovitiji je derivat **R-194**, koji značajno mijenja udio Raji stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa u odnosu na normalne stanice.

**Ključne riječi:** derivati purinskih nukleozida, antiproliferativnost, stanični ciklus

## 8.0. SUMMARY

Antiproliferative effects of novel *N*-9 sulphonylurea derivatives on 2D and 3D cell cultures

**Introduction:** Leading cause of death in the world are tumour diseases as a result of environmental pollution and aging of the world population. Therefore, there is a huge need for discovering effective anticancer drugs. Nucleoside analogs are the subject of numerous researches because of their potential anti-tumour and antiviral activity.

**Study aim:** The aim was to determine whether there is difference in anti-proliferation potential of *N*-9 sulphonylurea growth of normal and tumour cells in the two-dimensional and three-dimensional cultures *in vitro*.

**Material and methods:** Effects of *N*-9 sulphonylureas are set on the panel of human tumour cells in 2D culture (HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562, Raji, HuT 78, MOLT4 and CCRF-CEM), normal cells (MDCK1) and 3D culture (HeLa, CaCo-2, NCI-H358). Changes in cell cycle were determined by flow cytometric analysis.

**Results:** Test of *N*-9 sulphonylureas shows antiproliferative activity depending on concentration and prepared in a cell line of 2D and 3D culture. The best inhibitory effect on tumour cell growth is **R-194** compound. Raji human cell line, after the exposure to the **R-194** compound, indicated a statistically significant change in the proportion of cells in cell cycle, and particular accumulation of cells in sub G<sub>0</sub> phase compared to control cells.

**Conclusion:** There were different responses of cells grown in 2D and 3D culture on toxic effects of *N*-9-sulphonylurea. The most effective derivative is **R-194**, which significantly changes the proportion of Raji cells in specific phases of the cell cycle compared to control cells.

**Key words:** purine nucleoside derivatives, anti-proliferation, cell cycle

## 9.0. LITERATURA

1. Kralj V. Služba za epidemiologiju kroničnih masovnih bolesti Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo - ocjena stanja i perspektive na području epidemiologije kroničnih bolesti. Hrvatski časopis za javno zdravstvo. Zagreb:2011;7(28).
2. Stevanović R, Capak K, Benjak T. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2015. godinu, Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Zagreb:2016;287-289.
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. Murray RK, Bender DA, Botham K, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
5. Raven PH, Johnson GB. Biology. 6. izd. Boston,MA: McGraw Hill; 2002.
6. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry, 5. izd. New York: W. H. Freeman; 2002.
7. Jordheim LP, Durantel D, Zoulim F, Dumontet C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. Nat Rev Drug Discov. 2013;12:447-464.
8. Zhang J, Visser F, King KM, Baldwin SA, Young JD, Cass CE. The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. Cancer Metastasis Rev. 2007;26(1):85-110.
9. 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. Open Medicine. 2015;1:3-14.
10. Galmarini, CM, Mackey JR, Dumontet C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. Leukemia. 2001;15:875–890.
11. Pavlak M, Radačić M, Jerčić J, Stojković R, Vlahović K, Žinić B. Acute toxicity of novel N-sulfonylpyrimidine derivatives *in vivo*. Vet Arh. 2005;75(4):311-316.
12. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
13. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 5 izd. New York: Garland Science; 2008.
14. Glavaš-Obrovac Lj. Kultura stanica. interna skripta za studente doktorskog studija Biomedicina i zdravstvo. Osijek: Medicinski fakultet Osijek Sveučilište „J. J. Strossmayer“; 2008.

15. Crnek-Kunstelj V. Medicinska biologija. Zagreb: Medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu; 2003.
16. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today Technol.* 2013;18:240-249.
17. Arbor A. 3D cell culture 101: an introduction to 3D cell culture tools and techniques. *3D Biomatrix.* 2012;1:11.
18. Brajša K, Trzun M, Zlatar I, Jelić D. Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. *Period Biol.* 2016;118(1):59-65.
19. Foty R. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *JoVE.* 2011;51:1-5.
20. Wenzela C, Riefke B, Gründemann S, Krebs A, Christian S, Prinz F, i sur. 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Exp. Cell Res.* 2014;323(1):131-43.
21. Huh D, Geraldine A. Hamilton GA, Ingber DE. From three-dimensional cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* 2011;21(12):745-754.
22. Edmondson R, Jenkins Broglie J, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 2014;12(4):207-218.
23. Galmarini CM, Jordheim L, Dumontet C. Pyrimidine nucleoside analogs in cancer treatment. *Drugs Future.* 2003;3(5):717-728.
24. Tung YC, Hsiao, AY, Allen SG, Torisawa Y, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hangingdrop array, *Analyst.* 2011;136(3):473-478.
25. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996;274:1672-1677.
26. Medema, RH, Macurek, L. Checkpoint control and cancer. *Oncogene.* 2012;31:2601-2613.
27. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4):495-516.
28. Natesan S, Rivera VM, Molinari E, Gilman M. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 1997;390:350-351.
29. Carethers JM, Chauhan P, Fink D, Nebel S, Bresalier RS, Howell SB, i sur. Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology.* 1999;117:123-131.

## 10.0. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Nikolina Jakuš

**Datum i mjesto rođenja:** 6.12.1991., Zagreb

**e-mail:** nina.jakus12@gmail.com

### **Obrazovanje:**

2007. - 2010. - Zdravstvena i veterinarska škola dr. Andrije Štampara, Vinkovci

2010. - 2014. - Zdravstveno veleučilište Zagreb

stručni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike

2014. - 2017. - Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera Osijek

diplomski sveučilišni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike

### **Radno iskustvo:**

Studeni 2015. – studeni 2016. – Klinički bolnički centar Osijek, stručno osposobljavanje za  
prvostupnicu medicinsko laboratorijske dijagnostike