

Učinci benzimidazola na stanični ciklus tumorskih stanica i određivanje apoptoze in vitro

Knežević, Marija

Undergraduate thesis / Završni 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:112679>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske
dijagnostike

Marija Knežević

UČINCI BENZIMIDAZOLA NA
STANIČNI CIKLUS TUMORSKIH
STANICA

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske
dijagnostike

Marija Knežević

UČINCI BENZIMIDAZOLA NA
STANIČNI CIKLUS TUMORSKIH
STANICA

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je izrađen u Laboratoriju za kulturu tkiva pri Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Mentorica: prof. dr. sc. Ljubica Glavaš-Obrovac.

Rad ima 26 listova i 10 slika.

Veliku i posebnu zahvalnost dugujem mentorici, prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac, na suradnji, izdvojenom vremenu i pruženoj prilici pri izradi završnog rada.

Veliko hvala dr. sc. Teuti Opačak-Bernardi na pruženoj pomoći pri izradi završnog rada. Hvala na podijeljenom znanju, savjetima i izdvojenom vremenu.

Posebnu zahvalnost upućujem svojoj obitelji na svim oblicima potpore, odricanja i brige u trenucima kada je to bilo najpotrebnije.

Na kraju, želim zahvaliti svim dragim prijateljima i kolegama uz koje su mi studentski dani bili ugodni i nezaboravni.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Benzimidazolski spojevi	1
1.2. Stanični ciklus	3
1.3. Faze staničnog ciklusa.....	3
1.4. Regulacija staničnog ciklusa	4
1.5. Protočna citometrija	6
1.6. Dijelovi protočnog citometra	6
1.7. Načelo rada protočnog citometra	6
1.8. Mjerenje sadržaja DNA protočnim citometrom.....	7
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Materijali	10
3.1.1. Ispitivani spojevi.....	10
3.1.2. Stanične linije.....	10
3.1.3. Kemikalije	10
3.2. Metode.....	10
3.2.1. Kultivacija stanica <i>in vitro</i>	10
3.2.2. Održavanje stanične kulture	11
3.2.3. Određivanje broja vijabilnih stanica u kulturi.....	11
3.2.4. Određivanje staničnog ciklusa protočnom citometrijom	12
3.2.5. Statistička obrada podataka.....	13
4. REZULTATI.....	14
5. RASPRAVA	18
6. ZAKLJUČAK.....	20
8. SUMMARY	22

9. LITERATURA	23
10. ŽIVOTOPIS	26

KRATICE:

ATP – adenzin trifosfat

CDK – kinaze ovisne o ciklinima

DMSO – dimetil sulfoksid

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

FBS – fetalni goveđi serum

MOLT – tumorske stanice akutne limfoblastične leukemije

mPTP – 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin

PBS – fosfatom puferirana otopina soli

PI – propidij jodid

Raji – tumorske stanice Burkittova limfoma

RNK – ribonukleinska kiselina

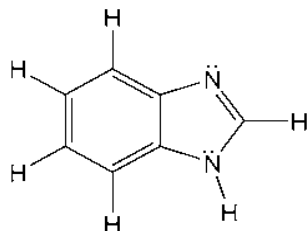
RPMI – Roswell Park Memorial Institute medij

UV – ultraljubičasto svjetlo

1. UVOD

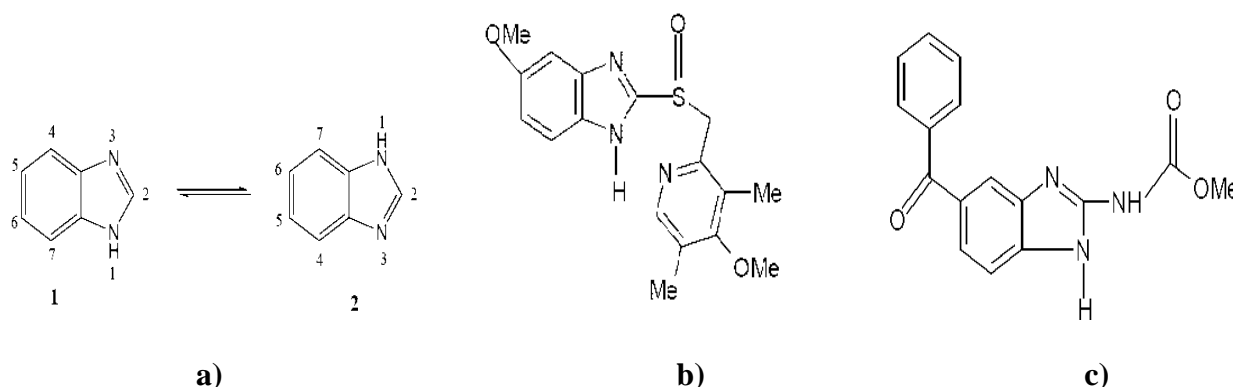
1.1. Benzimidazolski spojevi

Benzimidazoli su heterociklički organski spojevi aromatskog karaktera koji u svojoj strukturi sadrže imidazolski prsten koji je kondenziran na benzenu jezgru kao što je prikazano na Slici 1.



Slika 1. Struktura benzimidazola (preuzeto i prilagođeno) (1).

Posjeduju različita svojstva i imaju sposobnost stvaranja soli. Postoje dvije tautomerne strukture 1 i 2 (Slika 2. a), a prema nomenklaturi broji se od dušika na koji je vezan vodikov atom. Jezgra benzimidazola čini osnovnu komponentu farmakološki značajnih molekula (1).



Slika 2.a) Tautomerne strukture benzimidazola, b) Omeprazol i c) Mebendazol (preuzeto i prilagođeno) (1, 2).

Spojevi benzimidazola i njegovih derivata u posljednja su dva desetljeća privukli veliku pozornost medicinskih i organskih kemičara zbog svojeg širokog spektra biološke aktivnosti (1) (Slika 2. a). Aktivni su dio brojnih sintetskih medicinskih i biokemijskih tvari što pridonosi različitim kemijskim i farmakološkim značajkama. Dokazano je njihovo protutumorsko, antiviralno, antibakterijsko i antiepileptičko djelovanje. Derivatima se benzimidazola kao što su omeprazol (inhibitor protonske pumpe) i mebendazol (antihelminetik) koristi u kliničkoj praksi (2) (slike 2. b i 2. c). Neki od istraživanih derivata benzimidazola pokazuju

antiproliferativni potencijal vezanjem za dvostruku uzvojnica molekule DNK, čije se svojstvo može primjenjivati u liječenju tumorskih, bakterijskih i virusnih bolesti (3).

Struktura benzimidazola ima vrlo važnu ulogu u razvoju protutumorskih lijekova. Neke su studije pokazale da benzimidazoli upravo zbog svoje strukture imaju visoki stupanj vezanja za dvolančanu molekulu DNK, što je iskorišteno u istraživanjima gdje su sintetizirani hibridi molekula klorikinolina (7-klorkinolina) i aromatskog amidina, benzimidazol-amidina, koji imaju obećavajuću ulogu u protutumorskoj terapiji kao kemoterapijski agensi (4). Mnogi derivati sulfonamida s ugrađenom jezgrom benzena pokazuju dobru citotoksičnu aktivnost. Ispitivani su hibridi klorkinolina i benzensulfonamida na tumorskim stanicama pluća, stanicama kolorektalnog karcinoma i HeLa stanicama gdje su pokazali protutumorsku aktivnost ugradnjom u aktivno mjesto PI3K enzima djelujući inhibitorno na njega (5).

Naime, klorikonolini i njegovi derivati, čine standardni dio u svim novosintetiziranim molekulama čiji je glavni cilj liječenje karcinoma, no nova istraživanja pokazuju da i jezgra benzimidazola pokazuje odlične rezultate u različitim mehanizmima djelovanja u borbi protiv nastanka tumora (4, 17).

Moguća je primjena cikličkih derivata benzimidazola i blokiranje mPTP blokatora u obnavljanju funkcije mitohondrija, što je zainteresiralo znanstvenike Kima i Yanga da primijene novosintetizirane derivate benzimidazola u pokusima na miševima. U rezultatima, među ispitanim spojevima, spoj 25 sa supstituiranom 2-metil 5-izopropilnom grupom, učinkovito je djelovao na oporavak kognitivne funkcije povezane s Alzheimerovom bolešću, vraćanje membranskog mitohondrijskog potencijala i produciranja energije u obliku ATP-a što daje obećavajuću ulogu benzimidazola u moduliranju mitohondrijske membranske funkcije (6).

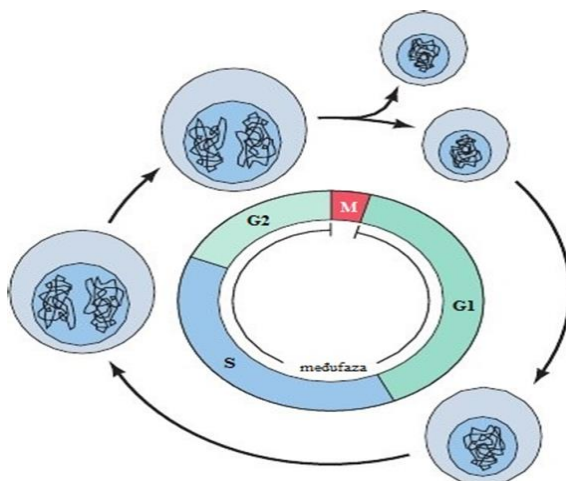
U današnje vrijeme za kliničko liječenje boli koriste se dvije skupine lijekova: opoidi, od kojih je najpoznatiji morfij i nesteroidni protuupalni lijekovi, aspirin i ibuprofen. Zbog izrazito široke biološke aktivnosti pirazoli predstavljaju novi način liječenja u vidu antiinflamatorika i antipiretika. S benzimidazolima, kao organskom heterolitičkom komponentom, istražuje se aktivnost benzimidazola kao protuinflamatornog lijeka. Sinteza 2-kloro-metil-benzimidazola i 2-fenil pirazolidin-3,5-diona, koja rezultira stvaranjem aktivnog hibrida, daje obećavajuću ulogu u liječenju boli jer prema rezultatima u korelaciji je sa standardnim lijekovima (7).

1.2. Stanični ciklus

Stanični je ciklus proces staničnoga rasta, replikacije DNA, raspodjele udvostručenih kromosoma u stanice kćeri i podjele stanica. Diobeni ciklus temeljni je životni proces, u kojem od jedne oplođene jajne stanice nastaje zreo, odrasli organizam, ali također služi i za obnavljanje stanica, tkiva i organa (10). Promatranja staničnog ciklusa u kulturi stanica i uz pomoć mikroskopa upućuju na dvije osnovne faze ciklusa: mitozu i interfazu. Mitoza, odnosno dioba stanične jezgre, faza je u kojoj dolazi do odvajanja sestrinskih kromatida i kromosoma u stanice kćeri i završava citokinezom, cjelokupnom diobom jezgre. Tijekom mitoze kromosomi se kondenziraju, reorganizira se citoskelet stvaranjem diobenog vretena i vezanjem kromosoma za mikrotubule u diobenom vretenu. Kromatide se odvajaju i kreću na suprotne polove diobenog vretena stvarajući dvije jezgre. Sama se mitozu sastoji od četiriju faza: profaze, metafaze, anafaze i telofaze. Interfaza je razdoblje staničnog rasta, tijekom koje stanica raste i akumulira hranjive tvari potrebne za daljnju diobu stanice i replikacije DNK kako bi se stanica pripremila za sljedeću diobu. Interfaza obuhvaća 95 % vremena staničnog ciklusa (9).

1.3. Faze staničnog ciklusa

Stanični ciklus svih eukariotskih stanica podijeljen je u četiri faze: G₁ (engl. gap), S (sinteza), G₂ i M (mitozu) (Slika 3.).



Slika 3. Faze staničnog ciklusa (9).

Tijekom G₁-faze, stanica se priprema za udvostručenje DNK koje se događa u S-fazi. Stanica raste i rezultira povećavanjem svoga volumena sintetizirajući tRNA, mRNA, ribosome i

enzime nakon čega slijedi S-faza u kojoj se odvija replikacija DNK. G₂-faza započinje dovršenjem DNK u kojoj slijedi odvajanje kromosoma, stanični rast i sinteza proteina potrebnih za mitozu. M-faza odgovara mitozu nakon koje slijedi citokineza te povratak dviju stanica kćeri u G₁ fazu. Tijekom faze mirovanja (G₀ faze) stanice ostaju metabolički aktivne, ali proliferiraju tek kada ih na to potaknu pogodni signali. Neke stanice pak ostaju zauvijek u G₀ fazi. To je često kod stanica koje su visoko diferencirane (npr. živčane stanice) ili u stanjima stanične starosti kada stanice zbog skraćanja telomera ili oštećenja DNA gube diobeni potencijal. Za tipičnu proliferirajuću eukariotsku stanicu stanični ciklus traje 24 sata, gdje G₁-faza traje 11 sati, S-faza oko 8 sati, G₂-faza oko 4 sata i M-faza oko sat vremena (9, 10).

Stanice različitih faza ciklusa razlikuju se prema količini DNA. Oznaka n označuje haploidne količine DNA u G₁ fazi staničnog ciklusa. Eukariotske su ljudske stanice diploidne, što se označava kao $2n$. U procesu replikacije, broj se povećava na $4n$, time i količina DNA tijekom G₂ i M faze. Podjelom citoplazme smanjuje se na $2n$. U tipičnoj staničnoj populaciji normalnih ljudskih tkiva, 95 – 98 % stanica u G₀/G₁ fazi je staničnog ciklusa, 1 – 5 % u S-fazi, i 2 – 5 % u G₂/M fazi staničnog ciklusa. Ukupna količina DNA u stanici određuje se inkubacijom stanica s fluorescentnom bojom koja ima svojstvo vezanja za DNA nakon koje se pomoću protočnog citometra mjeri intenzitet fluorescencije pojedinačnih stanica. Prilikom određivanja promjena u staničnom ciklusu razlikuju se: sub G₀, G₀, G₁, S, G₂ i M faza. Sub G₀ predstavljaju stanice u apoptozi koje zbog fragmentacije DNA gube DNA iz stanice i sadrže nižu količinu DNA nego stanice u fazi G₀/G₁ (stanice u mirovanju), posljedično bojenjem fluorescentnom bojom, npr. propidij jodidom, na histogramu prikazuju se kao pik slijeva do G₀ faze. Stanice u G₀/G₁ fazi imaju ekvivalentnu količinu DNA jer njihova DNA nije replicirana (8, 10, 11).

1.4. Regulacija staničnog ciklusa

Zbog bliske povezanosti između staničnog ciklusa i apoptoze važno je prepoznati i ukloniti stanice koje pokazuju nepravilnu proliferaciju. Kontrolnim ili restricijskim točkama regulirano je vrijeme i redoslijed zbivanja unutar staničnog ciklusa (13). Kontrolne točke u G₁, S i G₂ fazi diobenog ciklusa otkrivaju oštećenu ili neudvostručenu DNK, osiguravaju da se u slučaju oštećenja DNK ciklus ne nastavlja i prenosi na stanice kćeri. Oštećenje DNK znatno povećava mogućnost da se stanica pretvori u stanicu raka, a važnu ulogu u tome imaju određeni produkti tumorsupresorskih gena, koji u slučaju oštećenja DNK aktiviraju popravak DNK ili potiču apoptozu, programiranu smrt stanice. Veliku ulogu u regulaciji staničnog ciklusa imaju ciklini,

kinaze ovisne o ciklinima (CDK) i inhibitori kinaza ovisnih o ciklinima. U normalnim uvjetima stimuliraju daljnje napredovanje kroz stanični ciklus (12). Prva je kontrolna (startna) točka na kraju G_1 faze, u kojoj se provjerava jesu li svi uvjeti povoljni za daljnje dupliciranje materijala, uz potrebne čimbenike rasta i diobe. Kontrola u S-fazi provjerava kvalitetu ispravno replicirane DNA, osigurava provjeru DNA i signalizira oštećenje DNA kako se oštećenje ne bi prenijelo na stanice kćeri. Kontrolna točka na kraju G_2 faze (G_2/M) kontrolira uspješnost repliciranog genoma i prisutnost mitogenih čimbenika i uspješnost popravka oštećenja DNK. Na kraju mitoze provjerava se formiranje diobenog vretena, pravilno vezanje kromosoma za niti diobenog vretena osiguravajući stanicama kćeri pravilnu raspodjelu kromosomskog seta. Rezultat je te kontrolne točke diobenog vretena neodvajanje kromosoma sve dok setovi kromosoma nisu pravilno prihvaćeni za niti diobenog vretena (9, 13).

Prolazak stanica kroz stanični ciklus vrlo je složen i pod utjecajem je različitih čimbenika iz same stanice i njezine okoline (12).

1.5. Protočna citometrija

Protočna je citometrija jednostavna, kvantitativna i visokoinformativna metoda kojom se mogu analizirati strukturne, fiziološke i funkcijske osobine stanica, a u širem smislu i drugih bioloških čestica. Koristi se za ispitivanje strukturnih osobina stanica, odnosno za fenotipske analize, određivanje leukocitnih diferencijacijskih CD antigena i analize sadržaja nukleinskih kiselina. Imunofenotipizacijom dobiju se podatci o podrijetlu stanica, stupnju diferencijacije i klonalnosti (14). Glavna je značajka protočne citometrije mogućnost istodobnog mjerenja velikog broja parametara svake stanice u suspenziji, stoga se naziva i multiparametrijskom metodom.

1.6. Dijelovi protočnog citometra

Suvremeni protočni citometar sastoji se od triju međusobno povezanih sustava: protočnog, optičkog i elektronskih dijelova te uključuje računalo za primanje i obradu podataka. Protočni sustav čine: pokretačka tekućina, koja je nosač stanične suspenzije, stanična suspenzija i zračni potisak (15) (Slika 4.).

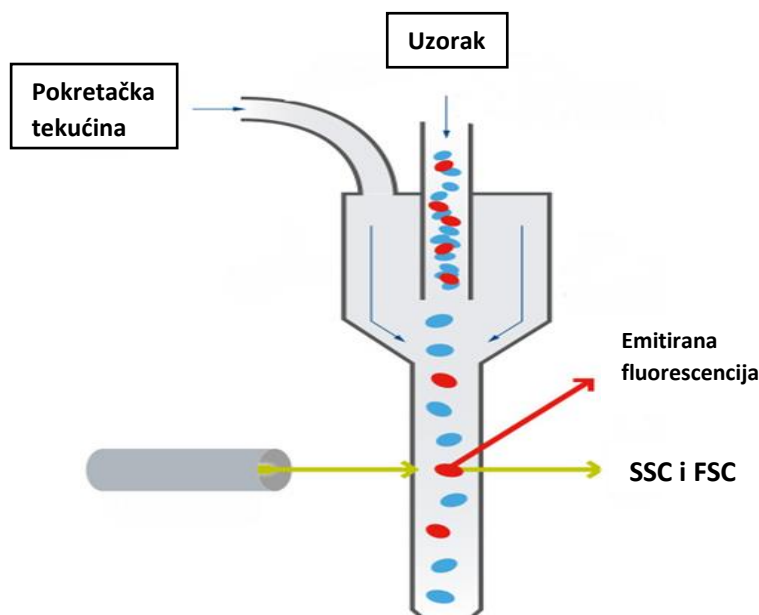


Slika 4. Protočni citometar (8).

1.7. Načelo rada protočnog citometra

Protočnim sustavom omogućeno je da stanice iz stanične suspenzije pojedinačno laminarnim protokom kroz sustav uske kapilare dolaze do optičkog sustava koji čine snop laserskog svjetla zajedno s lećama, filtrima i osjetnicima. Brzina protoka iznosi 100 – 5000 stanica u sekundi, no može se prilagođavati. Stanice se obasjavaju laserskim svjetlom, a stupanj

raspršenja svjetlosti iste valne duljine pokazatelj je fizičkih osobina stanica – veličine (svjetlost koja se raspršila pod malim kutom - prema engl. *forward scatter*) i zrnatosti (svjetlost raspršena pod pravim kutom – S, prema engl. *side scatter*). Dio svjetlosti koji se postranično rasprši sa stanica odgovara staničnoj granuliranosti, tj. kompleksnosti unutrašnje strukture stanice, dok dio raspršen u smjeru laserske zrake korelira veličini stanice (8). Fluorescentni signali koji potječu od fluorokroma, koji su vezani za stanice, otkrivaju se detektorima za fluorescenciju, gdje za svaku pojedinu valnu duljinu postoji odgovarajući detektor. Shematski je prikaz na Slici 5.



Slika 5. Prikaz rada protočne citometrije, (preuzeto i prilagođeno (15)).

Prikaz protočno-citometrijske analize prikazuje se u numeričkom formatu (statistička analiza) ili u grafičkom prikazu u obliku histograma, gdje je frekvencija izravna prezentacija broja stanica za svaki kanal mjerene vrijednosti kao i dvoparametrijskim dijagramima, citogramom ili točkastim prikazima (dot-plot) (14).

1.8. Mjerenje sadržaja DNA protočnim citometrom

Protočnom citometrijom može se izravno mjeriti sadržaj jezgrine DNA. Primjenom specifičnih fluorescentnih boja koje se izravno vežu za DNA, najčešće se koristi propidij jodid, ali i relativno određivanje količine DNK u stanicama, mjerenjem zastupljenosti udjela stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa.

Načelo same detekcije temelji se na obasjavanju stanica s UV svjetlošću, nakon koje obilježena stanica fluorescentnom bojom emitira fluorescencijski signal koji je proporcionalan količini DNA u stanici. Prema samoj količini DNA u stanicama, moguće je razvrstati stanice po jednoj od faza staničnog ciklusa: G_0 , G_1 , S, ili G_2/M . Program koji je ugrađen u protočni citometar pretvara emitirane svjetlosne signale u histogram u kojem su prikazani intenziteti fluorescencije koji odgovaraju određenim fazama ciklusa (G_0 , G_1 , S i G_2/M fazi) i broj stanica. Tom se metodom mogu dobiti značajni podatci o utjecaju raznih čimbenika na stanice koje se promatraju, primjerice utjecaj određenih spojeva, prijenosa gena ili primjene lijekova, na stanični ciklus u odnosu na kontrolne stanice (8, 14).

Protočna je citometrija sastavni dio kliničko-laboratorijske prakse u dijagnostici mnogobrojnih bolesti. Glavni je nedostatak protočne citometrije skupoća, s obzirom na cijene ostalih imunokemijskih metoda i nemogućnost uvođenja u sve dijelove laboratorija. Isto tako, priprema uzorka za analizu protočnom citometrijom zahtijeva posebnu pozornost kada je riječ o izboru fluorescentnih boja i odabir protutijela te je unaprijed potrebno uključiti moguće smetnje među stanicama (15).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj derivata benzimidazola na stanični ciklus tumorskih stanica u uvjetima *in vitro*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Ispitivani spojevi

Derivati benzimidazola pripremljeni su u Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Za svrhu *in vitro* istraživanja, neposredno prije ispitivanja, pripremljene su finalne otopine razrjeđivanjem stock otopine novosintetiziranih spojeva (1×10^{-2} mol/L) u mediju. Definirana finalna koncentracija novosintetiziranog spoja bila je 10^{-5} mol/L.

3.1.2. Stanične linije

U svrhu istraživanja ispitivan je učinak derivata benzimidazola na humanim staničnim linijama u suspenziji. Humane su stanične linije:

- stanice akutne limfoblastične leukemije (MOLT)
- stanice Burkittova limfoma (Raji).

3.1.3. Kemikalije

Tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada upotrijebljeni su reagensi i kemikalije različitih proizvođača:

- Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640) Lonza (Basel, Switzerland)
- PBS (fosfatom puferirana otopina soli), propidij jodid (PI)
- 70 %-tni etanol, RNase, Tripan plavilo
- Dimetil sulfoksid (DMSO).

3.2. Metode

3.2.1. Kultivacija stanica *in vitro*

Rad sa staničnim kulturama odvija se u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka. Pribor, posuđe, medij, puferi i otopine moraju biti sterilni.

3.2.2. Održavanje stanične kulture

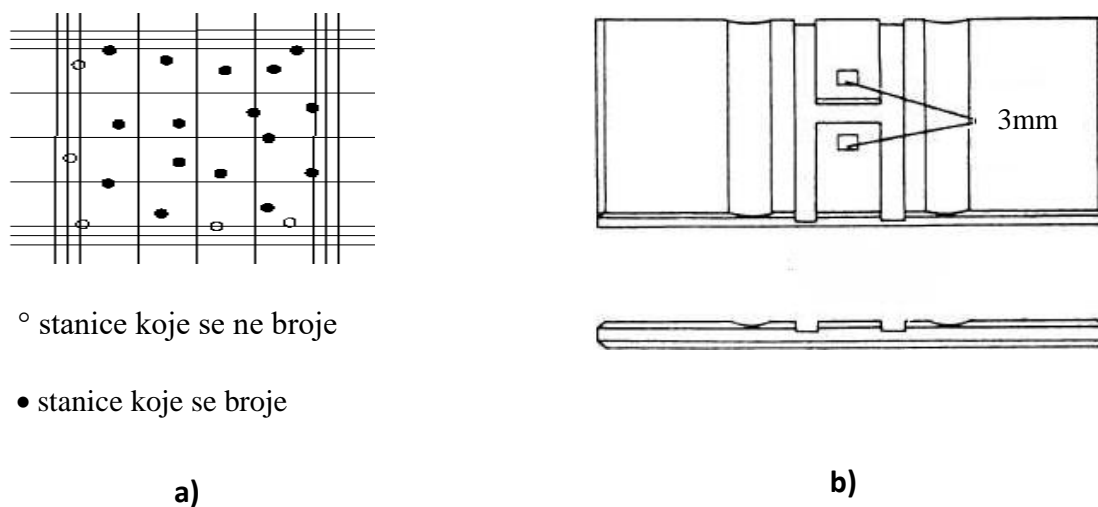
Stanice se uzgajaju u bocama za uzgoj aktivne površine od 25 cm² i 75 cm² u CO₂ inkubatoru u uvjetima 37 °C i 5 % uz visoku vlažnost atmosfere. Stanične linije, kojima se koristilo u istraživanju, uzgajaju se u RPMI 1640 mediju.

RPMI medij koristi se za održavanje suspenzijskih staničnih linija i u sebi sadrži dodatak 10% temperaturno inaktiviranog FBS-a, 2 mM L-glutamina, 1 mM natrij-piruvata, 10mM HEPES-a i 100U/0,1mg penicilin/ streptomycin antibiotika. RPMI medij, koji se rabi za pokus uz prikazane sastojke, ne sadrži penicilin/ streptomycin antibiotik.

Za održavanje stanica u suspenziji potrebno je razrijediti ili oduzeti dio volumena ovisno o gustoći stanica u bočici i dodavanjem svježeg medija.

3.2.3. Određivanje broja vijabilnih stanica u kulturi

Kako bi rezultati istraživanja bili kvalitetni, broj stanica u svakom eksperimentu mora biti definiran, stoga je potrebno prije svakog pokusa utvrditi broj stanica u suspenziji. Vijabilnost i brojnost stanica određuje se bojenjem tripan plavilom u Bürker-Türk komorici. Za određivanje broja stanica potrebno je oduzeti 50 µL stanične suspenzije i prenijeti ju u jažicu. U jažicu se zatim doda 100 µL tripan plavila. Žive stanice s neoštećenom staničnom membranom aktivno izbacuju boju i tako ostaju neobojene, za razliku od mrtvih koje ostaju obojene nakon ulaska boje u stanicu kroz oštećenu membranu (Slika 6.).



Slika 6. Bürker-Türk komorica. Preuzeto i prilagođeno s weba (21, 22).

Pod invertnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka) prebrojavaju se žive stanice unutar četiri kvadratića brojenjem gornjeg i jednog od postraničnog brida kvadratića. Broj živih stanica preračunava se prema formuli:

$$\text{broj stanica} \frac{N}{4} \times 3 = X \times 10^4 \text{ stanica/mL}$$

gdje je:

N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – faktor razrjeđenja

3.2.4. Određivanje staničnog ciklusa protočnom citometrijom

Tijekom mitotičke diobe stanice prolaze niz fizioloških faza koje rezultiraju stvaranjem dviju novih stanica kćeri od jedne stanice. Učinak novosintetiziranih derivata spojeva benzimidazola utječe na uobičajen tijek staničnog ciklusa time što dovodi do zaustavljanja ciklusa u nekoj od faza (S, G₁, G₂ ili M), odnosno izazivanja apoptoze stanice. Nakon tretiranja stanica navedenim spojevima, stanice su inkubirane 24 sata. Nakon fiksacije alkoholom, stanice su prikupljene i obilježene propidijskim jodidom, bojom koja ima sposobnost ugrađivanja u DNK, a potom su stanice analizirane na protočnom citometru. Propidijski je jodid fluorescentna crvena boja koja se ugrađuje u dvostruki lanac molekule DNK. Količina ugrađenog PI proporcionalna je količini DNK u staničnoj jezgri u mitotičkoj diobi, čime je omogućeno razlikovanje faza staničnog ciklusa. Protočni citometar razvrstava stanice prema intenzitetu emisijskog spektra PI, koji je razmjern sadržaju fluorescentne boje u jezgri, a time i količini DNK. S obzirom na količinu DNK, na DNK histogramu pikovi predstavljaju pojedinu fazu diobenog ciklusa (8). Tako normalan sadržaj DNK upućuje na stanice koje su u G₁ fazi (2N kromosoma), u našem pokusu gleda se postotak stanica u G₀/G₁ u kojima je jednaka količina DNK, na histogramu se prikazuje kao prvi pik, drugi su pik stanice G₂ i M faze s dvostrukim sadržajem DNK s tetraploidnim brojem kromosoma i stanice u S fazi u kojima količina DNK varira ovisno o stupnju replikacijskog ciklusa.

Materijal: stanice (MOLT, Raji), medij (RPMI), PBS, 70 %-tni etanol, destilirana voda, derivati benzimidazola br.127, 128, 147, 164, 166, 167, RNasa, PI

Postupak: Raji i MOLT stanice nasađene su na ploče sa šest jažica s ravnim dnom u koncentraciji $1,7 \times 10^5$ st/mL u ukupnom volumenu od 3 mL/jažici uz kontrole. Kako se u radu upotrebljavaju suspenzijske stanične linije, odmah nakon nasađivanja stanice su tretirane ispitivanim spojevima finalne koncentracije 1×10^{-5} mol/L i inkubirane kroz 24 sata u CO₂ inkubatoru. Nakon inkubacije uzgojene se stanice s medijem prebace u Falcon epruvete od 15 mL, isperu se 1 mL PBS-a i stave na centrifugu (na 4 °C, 5 min, 3000 rpm). Nakon centrifugiranja, stanice sedimentiraju, a supernatant se odlije dekantacijom. Sedimentu stanica dodano je 200µL PBS-a, zatim su stanice fiksirane s 3 mL hladnog 70 %-tnog etanola uz lagano, stalno miješanje i ostavljene na -20 °C do trenutka analiziranja. Stanice fiksirane alkoholom stabilne su nekoliko tjedana na 4 °C. Na dan analiziranja stanice su centrifugirane, zatim isprane s 1 mL PBS-a pa ponovno centrifugirane (na 5 min, 3000rpm) i promiješane s 350µl PBS-a. Nakon dodavanja PBS-a uzorak je prebačen u posebne staklene epruvete. Na svaki uzorak stanica dodano je 30µL RNase koncentracije 10mg/mL kojoj je potrebno pet minuta da djeluje. Nakon djelovanja RNase u svaki je uzorak dodano 150µL propidij jodida, u finalnoj koncentraciji 50µg/mL. Uzorci su ostavljeni u mraku 30 minuta na hladnom do analize, a zatim analizirani na *BD FACScanto* protočnom citometru.

3.2.5. Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja obrađeni su metodom deskriptivne statistike i prikazani grafikonima i histogramima. Podatci su prikazani statističkim parametrima, srednjom vrijednosti (\bar{X}) i standardnom devijacijom ($\pm SD$). Normalnost raspodjele podataka dobivenih testovima protočne citometrije određena je Mann-Whitneyjevim testom. Statistički značajan utjecaj koncentracije onaj je kod kojeg je izračunata vrijednost P bila manja od 0,05 ($P < 0,05$)

4. REZULTATI

Antiproliferativan učinak šest derivata benzimidazola praćen je na dvjema staničnim linijama (MOLT– akutna limfoblastična leukemija T-stanica i Raji – B limfocitni Burkitt-ov limfom). Stanice su podijeljene u četiri faze: subG₀, G₀/G₁, S, G₂/M na osnovi intenziteta fluorescentnog signala. Stanice su bile izložene spojevima MB-127, MB-128, MB-147, MB-164, MB-166, MB-167 koncentracije 10⁻⁵ mol/dm³ i ostavljeni njihovom djelovanju 24 sata. Rezultati prikazuju udio staničnog rasta navedenih staničnih linija u odnosu na kontrolu te su prikazani dijagramima (slike 7. i 8.).

Spoj MB-127 uzrokuje značajnu statističku promjenu u G₀/G₁ fazi diobenog ciklusa Raji stanične linije u odnosu na kontrolu, dok u S i G₂/M fazi nema značajnog odstupanja od kontrole. Na MOLT staničnu liniju MB-127 najviše djeluje u G₀/G₁, gdje je zapaženo smanjenje stanica i ima značajnu statističku vrijednost (P = 0,036), u G₀ fazi primjećuje se razlika povećanja broja stanica u odnosu na kontrolu bez statističke značajne vrijednosti, S i G₂/M faza ne razlikuju se od kontrole.

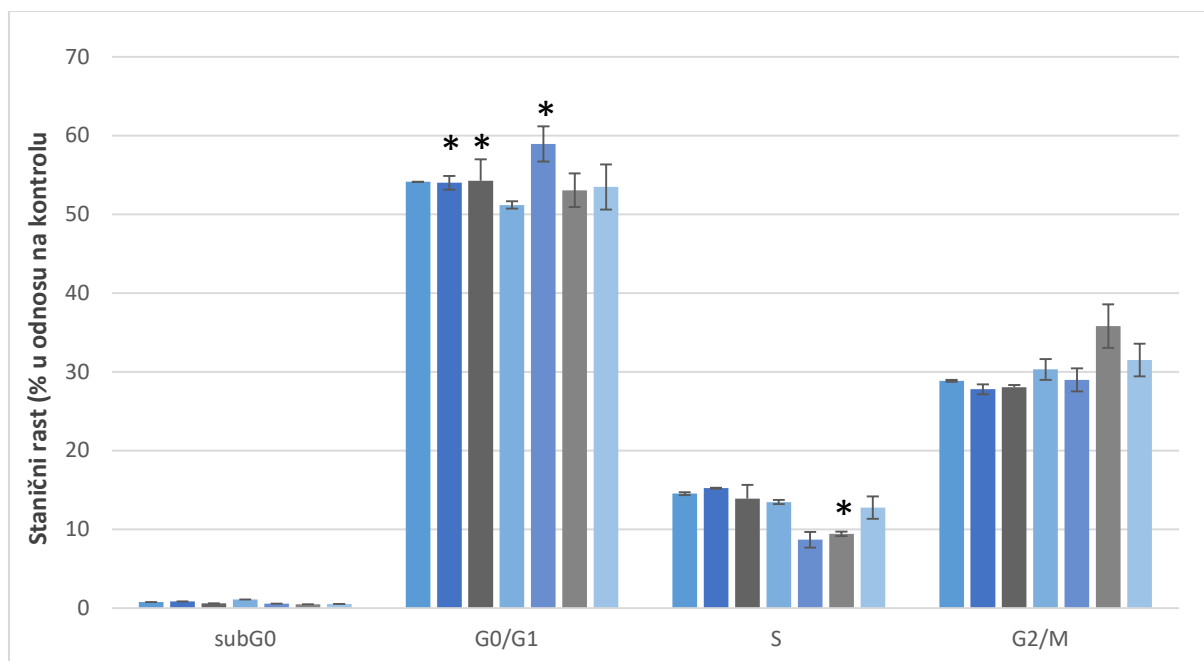
Spoj MB-128 apliciran na Raji staničnu liniju u odnosu na kontrolne stanice uzrokuje statistički značajnu promjenu u G₀/G₁ fazi, u S fazi uzrokuje nezatno smanjenje broja stanica, a u G₀ i G₂/M fazama nema značajnih promjena u odnosu na kontrolne stanice. Na MOLT staničnoj liniji može se primijetiti da spoj djeluje u G₀/G₁ i S fazi, gdje je u G₀/G₁ P vrijednost jednaka 0,024, u S fazi P = 0,048, a svoj učinak znatnije izražava u G₀/G₁ fazi.

Spoj MB-147 nakon 24 sata inkubacije na Raji stanicama ne uzrokuje značajne promjene. U S fazi primjećuje se nezatno smanjenje stanica na 13,45 % u odnosu na kontrolne stanice 14,53 %, dok se na MOLT stanicama učinak spoja očituje u S fazi sa statističkom promjenom P = 0,034. Smanjenje dijela stanica u G₀/G₁ fazi popraćeno je povećanjem udjela stanica u G₂/M fazi u odnosu na kontrolne stanice.

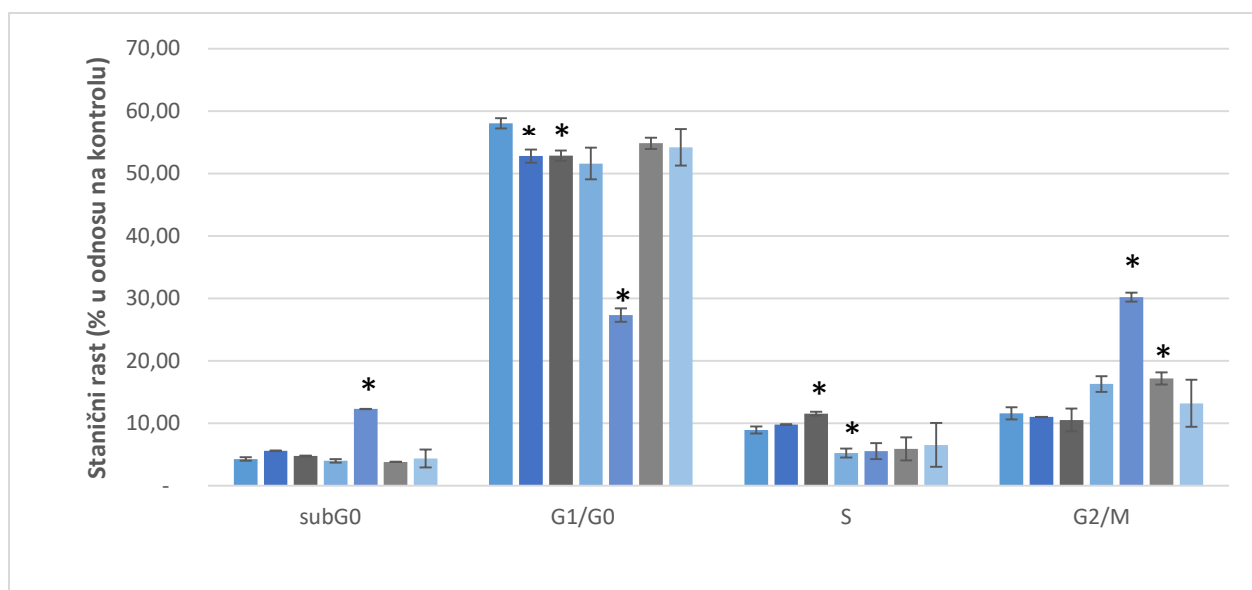
Spoj MB-164 uzrokuje antiproliferativan učinak na Raji stanicama u G₀/G₁ fazi gdje je značajnost statističke promjene P < 0,001, dok se u S fazi smanjuje rast stanica na 7,96 % u odnosu na kontrolne stanice 14,53 % (Slika 9.). Svakako, najbolji inhibični učinak pokazuje na MOLT stanicama gdje pokazuje znatnu statističku vrijednost, u G₀ P = 0,015, u G₀/G₁ P < 0,001, u S fazi P = 0,003 dok je u G₂/M fazi značajan porast stanica na 30,26 % u odnosu na kontrolne stanice 11,61 % (Slika 10).

Spoj MB-166 apliciran na Raji staničnu liniju izaziva promjene u S fazi $P = 0,005$, u G_2/M fazi primijećen je porast stanica, a u G_0/G_1 fazi broj je stanica smanjen (Slika 9.). Na MOLT stanicama statistička promjena zamijećena je u G_2/M fazi $P = 0,029$, dok je u G_0 , S i G_2/M fazi primijećen pad rasta stanica (Slika 10.).

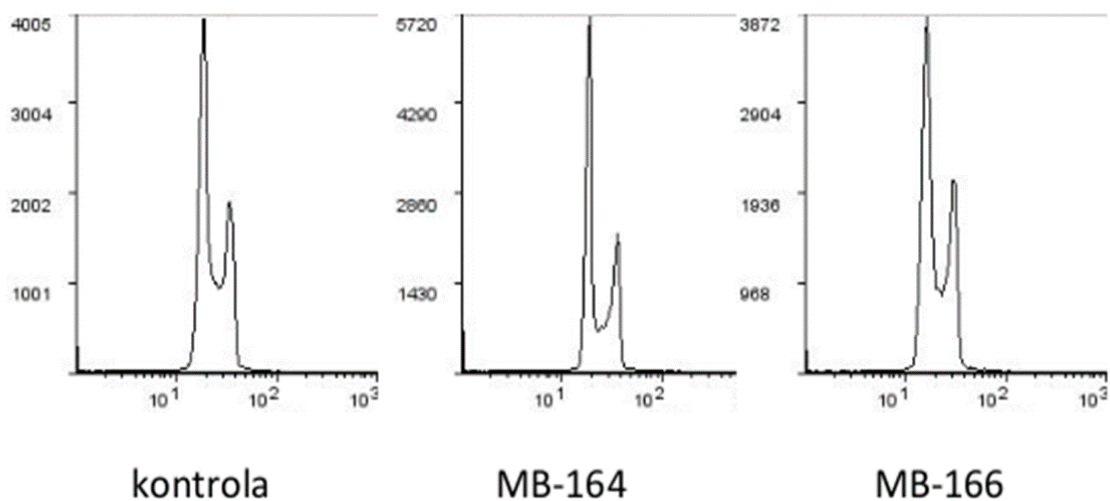
Spoj MB-167 nakon 24 sata inkubacije ne pokazuje značajan antiproliferativan učinak na Raji stanicama ni na MOLT stanicama.



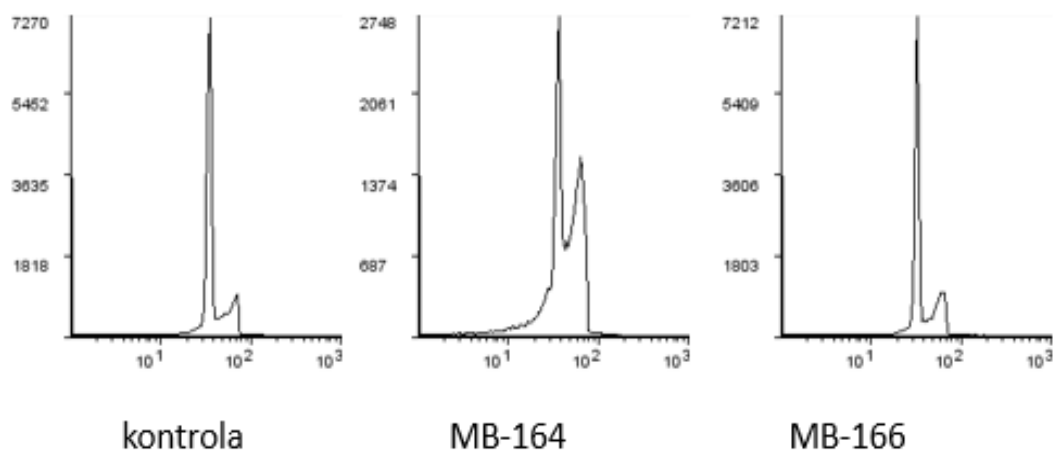
Slika 7. Raji stanična linija. Prikazani derivati pokazuju različite razine antiproliferativne aktivnosti na staničnim linijama ovisno o njihovoj strukturi. Nijedan od spojeva ne djeluje u G_0 i G_2/M fazi. Od ispitivanih derivata, ističu se MB-127, MB-128, MB-164, koji djeluju na stanice u G_0/G_1 fazi, dok spoj MB-166 djeluje na stanice u S fazi staničnog ciklusa.



Slika 8. MOLT stanična linija. S obzirom na strukturu ispitivanih derivata, uočljiv je antiproliferativan učinak na staničnim linijama. Od ispitivanih derivata, ističu se: MB-164 koji djeluje u G_0 fazi, MB-127, MB-128, MB-164 koji djeluju na stanice u G_0/G_1 fazi, u S fazi svoj učinak pokazuju MB-128 i MB-147 te MB-164 i MB-166 u G_2/M fazi.



Slika 9. Raji stanična linija. Histogramski prikaz staničnog ciklusa i derivata MB-164 i MB-166 s antiproliferativnim djelovanjem u pojedinim fazama staničnog ciklusa u odnosu na kontrolu.



Slika 10. MOLT stanična linija. Histogramski prikaz staničnog ciklusa i derivata MB-164 i MB-166 s antiproliferativnim djelovanjem u pojedinim fazama staničnog ciklusa u odnosu na kontrolu.

5. RASPRAVA

Posljednjih desetljeća, dominantan predmet znanstvenih istraživanja čine novi načini liječenja karcinoma, gotovo najčešće bolesti u svijetu, uz kardiovaskularne bolesti (16). Benzimidazoli čine jednu od glavnih strukturnih okosnica istraživanja zbog svog širokog farmakološkog i biološkog djelovanja. Benzimidazolska jezgra koristi se u sintezi mnogobrojnih molekula s različitim biokemijskim i farmakološkim svojstvima (1). Od derivata s najjačim inhibicijskim učinkom izdvojeni su spojevi: MB-127, MB-128, MB-147, MB-164 i MB-166. Temeljem rezultata djelovanja spojeva na stanični ciklus vidljivo je kako derivati pokazuju različito inhibicijsko djelovanje na ispitane stanične linije.

Kako navode Demirayak i suradnici, derivati benzimidazola pokazuju svojstvo interkaliranja u dvostruku uzvojnica DNK na specifičnom području čime inhibiraju replikaciju DNK. Mogu se reverzibilno ili ireverzibilno vezati na DNK i stupati u interakcije s makromolekulama. Tako imaju sposobnost inhibicije aktivnosti određenih gena i njihovih produkata čime dovode do inhibicije enzima topoizomeraze I i II i zastoja staničnog ciklusa, posebice u fazi replikacije u S fazi. Demirayak i suradnici ispitali su aktivnost nekih derivata benzimidazola na tumorskim stanicama kolona, epitelnog karcinoma i leukemijskim stanicama. Na leukemijskim stanicama primijećen je značajan protutumorski učinak (3). U ovom radu značajan utjecaj na S fazu staničnog ciklusa imali su spojevi MB-128, MB-164 na MOLT staničnoj liniji, a MB-166 na Raji staničnoj liniji.

Błaszczak-Świątkiewicz i suradnici ispitali su bioreduktivnu sposobnost i apoptotsku aktivnost novosintetiziranih derivata benzimidazola na A-549 tumorskim stanicama adenokarcinoma pluća i izazivanja apoptoze. Osim toga, dokazali su njihov potencijal inhibicije na stanični ciklus, gdje uzrokuju oštećenja na DNK u fazi replikacije, nakon koje se posljedično primjećuje pad stanica u sljedećoj fazi ciklusa, G₂/M. Zaključili su da povećanje protutumorske aktivnosti korelira s prisutnošću broja veza s kisikom (najsnažniji potencijal protutumorske aktivnosti imaju derivati sa što većim brojem veza s kisikom ili supstituiranim klorom). U ovom istraživanju spoj MB-127 apliciran na MOLT staničnu liniju uzrokuje promjene u S fazi s obzirom na kontrolne stanice, a u G₂/M fazi primjećuje se pad stanica u odnosu na kontrolne stanice. S obzirom na dokazivanja Błaszczak-Świątkiewicz i suradnika, spoj MB-127 pokazuje se kao mogući spoj s izrazitim apoptotskim djelovanjem (18).

Konjugati 2-arilbenzimidazola procijenjeni su kao toksični agensi koji u stanicama izazivaju apoptozu. Znanstvenici Nayak i ostali napravili su eksperiment u kojem su ispitali utjecaj novosintetizirane molekule konjugata 2-arilbenzimidazola na MCF-7 tumorskim stanicama karcinoma dojke. Rezultati te studije pokazali su da je spoj zaustavio stanični ciklus u G₂/M fazi. Ispitivanje inhibicije topoizomeraze II Western blot analizom upućuju da taj spoj učinkovito inhibira aktivnost topoizomeraze II koja dovodi do smrti stanice. Indukcija apoptoze u MCF-7 stanicama dodatno je potvrđena gubitkom mitohondrijskog membranskog potencijala, otpuštanjem citokroma c iz mitohondrija i stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Ispitivanje apoptoze primjenom analoga Annexin V-FITC također je uputila na to da je taj spoj izazvao smrt stanice apoptozom. Spojevi MB-164 i MB-166 djeluju na G₂/M fazu na MOLT stanicama s povećanjem stanica u odnosu na kontrolne stanice u eksperimentu (19).

Aktivirana checkpoint kinaza 2 (Chk2) tumorski je supresor kao jedan od glavnih enzima koji utječu na stanični ciklus. Današnje se studije temelje na inhibiciji enzima koji izravno utječu na stanični ciklus. Osim što djeluju na topoizomerazu, 2-biarilbenzimidazoli djeluju kao Chk2 inhibitori. Konjugati pirazol-benzimidazola visoko su aktivni Chk2 inhibitori koji imaju antikancerogenu aktivnost i aktivnost genotoksičnog protutumorskog djelovanja (20).

Benzimidazoli i njihovi derivati pokazali su znatan antiproliferativan učinak na stanicama različitih tumora, s ciljanim djelovanjem na različite signalne i enzimatske putove. Spojevi koji sadrže benzimidazolski heterociklički prsten mogu imati primjenu u liječenju karcinoma. Ciljanje specifičnih signalnih i enzimatskih putova ključan je dio u otkrivanju usmjerene protutumorske terapije (4).

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

- Uočen je antiproliferativan učinak svih ispitivanih derivata na stanične linije, osim MB-167 koji ne djeluje ni u jednoj fazi staničnog ciklusa ispitivanih staničnih linija.
- Najveću antiproliferativnu aktivnost pokazuje spoj MB-164 na objema staničnim linijama s djelovanjem u G_0/G_1 fazi na Raji staničnoj liniji, a u G_0 , G_0/G_1 , G_2/M fazi na MOLT staničnoj liniji.
- Osjetljivija je stanična linija MOLT koja pokazuje promjene u fazama staničnog ciklusa pod utjecajem spojeva MB-127, MB-128, MB-147, MB-164 i MB-166.
- Spoj MB-127 i MB-128 uzrokuju promjene staničnog ciklusa u G_0/G_1 fazi i na Raji i MOLT staničnim linijama, MB-128 uzrokuje povećanje stanica u S fazi na MOLT staničnoj liniji.
- Spoj MB-147 svoj antiproliferativan učinak pokazuje u S fazi na MOLT staničnoj liniji.
- Spoj MB-166 zaustavlja stanični ciklus u S fazi na Raji staničnoj liniji, dok na MOLT staničnoj liniji uzrokuje porast stanica u G_2/M fazi.

7. SAŽETAK

Uvod: Benzimidazoli su heterociklički aromatski organski spojevi koji u svojoj strukturi sadrže benzimidazolsku jezgru, koja se koristi za pripremu sintetskih spojeva strukturno različitih derivata. Derivati benzimidazola pokazuju širok spektar biološkog, farmakološkog i biokemijskog djelovanja. Neki od derivata pokazuju potencijal inhibicije aktivnosti individualnih gena vezanjem za dvostruku uzvojniju molekule DNA što može biti korisno u liječenju tumorskih, bakterijskih i virusnih bolesti.

Cilj: Cilj istraživanja je ispitati utjecaj derivata benzimidazola na stanični ciklus tumorskih stanica, odrediti promjene u staničnom ciklusu i definirati tvar koja ima najveću učinkovitost na rast tumorskih stanica.

Materijali i metode: Za potrebe istraživanja, derivati su pripremljeni u Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Uzgoj kulture stanica *in vitro* podrazumijeva uzgajanje u bocama za kulturu stanica u CO₂ inkubatoru, u uvjetima na temperaturi 37 °C uz 5% CO₂. Stanične linije u suspenziji (Raji i MOLT) održavaju se oduzimanjem dijela volumena i dodavanjem svježeg RPMI medija. Nakon ispitivanja stanica derivatima benzimidazola promjene staničnog ciklusa stanica analizirane su protočnim citometrom.

Rezultati: Uočen je antiproliferativan učinak svih ispitivanih derivata na stanične linije, osim MB-167 koji ne djeluje ni u jednoj fazi staničnog ciklusa ispitivanih staničnih linija. Najjači učinak na stanični ciklus ima derivat MB-164. Stanični rast linije MOLT pokazao se osjetljivijim na učinke derivata benzimidazola u odnosu na stanični rast Raji linije.

Zaključak: Derivati benzimidazola uzrokuju promjene u staničnom ciklusu tumorskih stanica i inhibiraju njihov rast ovisno o strukturi spoja i tipu stanica.

Ključne riječi: benzimidazoli, stanični ciklus, antiproliferativan učinak, kultura stanica, tumorske stanice

8. SUMMARY

Introduction: Benzimidazoles are heterocyclic aromatic organic compounds which, in their composition, contain benzimidazole nuclei, which are used to prepare synthetic compounds of structurally different derivatives. Benzimidazole derivatives show a wide spectrum of biological, pharmacological, and biochemical effects. Some derivatives show potential inhibitory activity of the single-stranded DNA binding molecule activity that can be useful in the treatment of tumour, bacterial, and viral diseases.

Objective: The aim of the study is to investigate the effect of benzimidazole derivatives on the cell cycle, to determine the changes in the cell cycle, and to define the substance that has the greatest effect on tumour cell growth.

Materials and Methods: For the purposes of the research, the derivatives were prepared at the Faculty of Veterinary Medicine in Zagreb, Department of Chemistry and Biochemistry. The growth of a cell culture in vitro involves culturing cell culture bottles in a CO₂ incubator under the conditions of 37 °C with 5 % CO₂. The suspension cell lines (Raji and MOLT) are maintained by taking a part of the volume and adding a new RPMI medium. After the treatment of the benzimidazole derivative cells, the cell cycle cell changes were analyzed using flow cytometry.

Results: The antiproliferative effect of all the tested derivatives on the cell lines was observed, except for MB-167, which does not affect the cell cycle at any stage. The MB-164 derivative has the strongest effect on the cell cycle. MOLT proved to be more sensitive to the effects of benzimidazole derivatives, compared to the Raji line.

Conclusion: Benzimidazole derivatives cause changes in the cell cycle of tumour cells and inhibit their growth depending on the structure of the compound and the type of the cells.

Key words: benzimidazoles, cell cycle, antiproliferative effect, cell culture, tumour cells

9. LITERATURA

1. Srdović Z. Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih amino i diamino supstituiranih benzimidazo[1,2-a]kinolina kao potencijalnih kemosenzora za detekciju kationa u otopinama. (doktorska disertacija) Zagreb. 2013;1-9.
2. Ingle RG, Magar DD. Heterocyclic chemistry of benzimidazoles and potential Activities of derivatives. *Int. J. Drug Res. Tech.* 2011;1(1):26-32.
3. Shrivastava N, Naim JM, Alam J, Nawaz F, Ahmed S, Alam O. Benzimidazole Scaffold as Anticancer Agent: Synthetic Approaches and Structure–Activity Relationship. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2017; 350:1-80.
4. Krstulović L, Stolić I, Jukić M, Opačak-Bernardi T, Starčević K, Bajić M, Glavaš-Obrovac L. New quinoline-arylamidine hybrids: Synthesis, DNA/RNA binding and antitumor activity. *Eur J Med Chem.* 2017;137:196-210.
5. TaeHun K, Yang HY, Park BG, Jung SY, Park JH, Park KD, i sur. Discovery of benzimidazole derivatives as modulators of mitochondrial function: A potential treatment for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2017;125:1172-92.
6. Ghorab MM, Alsaid MS, Al-Dosari MS, Nissan YM, Al-Mishari AA. Novel chloroquinoline derivatives incorporating biologically active benzenesulfonamide moiety: synthesis, cytotoxic activity and molecular docking. *Chem Central Journal.* 2016;10:18:1-13.
7. Tiwari A, Singh A. Synthesis and antinociceptive activity of novel mannich base derivatives of some new fused 3,5-pyrazolidinedione. *J Adv Pharm Technol Res.* 2014;5(1):41–47.
8. Institute of Cell and Molecular Science, The Blizzard Building, Barts and The London School of Medicine and Dentistry. Flow cytometry core facility as of April 2016. Dostupno na stranici: <http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/celcycleanalysis/celcycle/index.html>
Datum pristupa: 4.7.2017.
9. Cooper GM, Hausman RE. Stanica, molekularni pristup. 4. izd. Medicinska naklada Zagreb 2004. str. 653-79.

10. Schnerch D, Yalcintepe J, Schmidts A i sur. Cell cycle control in acute myeloid leukemia. *Am J Cancer Res.* 2012;2:508-28.
11. Smojver-Ježek S. Morfometrija i statička DNA citometrija makrofaga u bronhoalveolarnom ispirku bolesnika sa sarkoidozoom. Doktorska disertacija. Zagreb, 2009. str. 23-29.
12. Vrdoljak ED, Šamija MR i sur. *Klinička onkologija*. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str. 1-8.
13. Diaz-Moralli S, Tarrado-Castellarnau M, Miranda A, Cascante M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 2013;138:255–71.
14. Labar B, Hauptman E, i sur. *Hematologija*. Zagreb: Školska knjiga; 1998. str. 278-87.
15. Web 1: Abcam. Introduction to flow cytometry. Dostupno na adresi: www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-citometry Datum pristupa: 3.7.2017.
16. Mehta P, Davadra P, Shah N, Joshi H. Synthesis and antimicrobial activity of some new imidazolinone derivatives containing benzimidazole. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy.* 2014;10:74-80.
17. Soni B, Ranawat MS, Bhandari A, Sharma R. Synthesis and in vitro antitumor activity of benzimidazole derivatives. *Int. J. Drug Res. Tech.* 2012;2(7):479-85.
18. Błaszczak-Świątkiewicz K, Sikora J, Szymański J, Danilewicz M, Mikiciuk-Olasik E. Biological evaluation of the toxicity and the cell cycle interruption by some benzimidazole derivatives. *Tumor Biol.* 2016;37:11135–45.
19. Nayak VN, Nagesh N, Ravikumar A, Bagul C, Vishnuvardhan MVPS, Srinivasulu V, i sur. 2-aryl benzimidazole conjugate induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through caspase independent pathway. *Apoptosis.* 2016; 22; 118-34.
20. Gala SA, Abdelsamie AS, Shouman SA, Attia YM, Ali HI, Tabll A, i sur. Part I: Design, synthesis and biological evaluation of novel pyrazole-benzimidazole conjugates as Checkpoint kinase 2 (Chk2) inhibitors with studying their activities alone and in combination with genotoxic drugs. *Eur J Med Chem.* 2016;134:392-405.

21. Web 2: <http://scienceservices.de/en/fuchs-rosenthal-counting-chamber.html>

Datum pristupa 15.5.2017.godine.

22. Web 3: <http://medical.tpub.com10669-ccssFigure-6-6-Hemacytometer-Counting-Chamber-231.htm>

Datum pristupa: 15.5.2017.godine

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Marija Knežević

Datum i mjesto rođenja: 28. studenoga 1995., Našice

Adresa stanovanja: Matije Gupca 63, 31513 Donja Motičina

Broj telefona: 099/655-0083

E-pošta: marijaknezevic5@gmail.com

OBRAZOVANJE

2001. – 2010. – Osnovna škola Vladimira Nazora Feričanci

2010. – 2014. – Opća gimnazija, Srednja škola Isidora Kršnjavog, Našice

2014. – 2017. – Medicinski fakultet Osijek, preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike