

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Ivona Spudić

**ISPITIVANJE PROTUTUMORSKE
AKTIVNOSTI NOVOSINTETIZIRANIH
DERIVATA RODANINA *IN VITRO***

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Ivona Spudić

**ISPITIVANJE PROTUTUMORSKE
AKTIVNOSTI NOVOSINTETIZIRANIH
DERIVATA RODANINA *IN VITRO***

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentorica je rada: doc. dr. sc. Katarina Mišković-Špoljarić

Rad ima: 25 listova, 4 tablice i 10 slika.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Katarini-Mišković Špoljarić na velikoj pomoći, utrošenom vremenu i savjetima. Zahvaljujući njezinu strpljenju, razumijevanju i potpori realiziran je moj završni rad.

Nadalje, zahvaljujem višoj tehničarki Ivani Jelavić na dragocjenoj pomoći koja mi je uvelike uljepšala i olakšala rad u laboratoriju.

Pri nastanku ovog završnog rada na Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju, ostvareno je moje stručno i znanstveno usavršavanje. U to ime zahvaljujem svim svojim kolegama i prijateljima koji su bili uz mene ove tri godine preddiplomskog studija te učinili moje studiranje ljepšim.

I na kraju, posebno želim zahvaliti svojim roditeljima koji su mi omogućili školovanje te podupirali i poticali moju težnju prema sve višim i višim ciljevima.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Rodaninski spojevi.....	1
1.1.1. Rodanin	1
1.1.2. Derivati rodanina.....	2
1.2. Kultura stanice i uzgoj	3
1.2.1. Kultura stanice	3
1.2.2. Rast stanica <i>in vitro</i>	4
1.3. Genska osnova raka	5
1.3.1. Tumorske stanice	5
1.3.2. Uzroci raka	6
1.3.3. Onkogeni	6
1.3.4. Tumor-supresorski geni	7
1.4. Metode određivanja citotoksičnosti	7
1.4.1. Stanični testovi citotoksičnosti.....	7
1.4.2. Test redukcije tetrazolijumom – MTT	8
2. CILJ	9
3. MATERIJALI I METODE.....	10
3.1. Materijali.....	10
3.1.1. Ispitivani spojevi	10
3.1.2. Kemikalije	10
3.1.3. Stanične linije.....	10
3.2. Metode	12
3.2.1. Kultivacija stanica <i>in vitro</i>	12
3.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi	12
3.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom.....	13
4. REZULTATI.....	15
5. RASPRAVA.....	18
6. ZAKLJUČAK.....	20
7. SAŽETAK.....	21

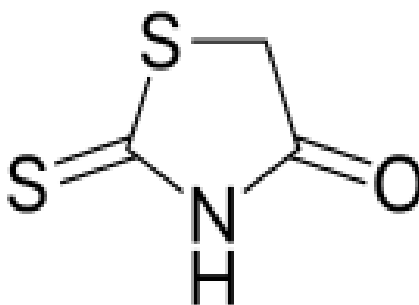
8. SUMMARY	22
9. LITERATURA	23
10. ŽIVOTOPIS	25

1. UVOD

1.1. Rodaninski spojevi

1.1.1. Rodanin

Rodanin ili rodaninska kiselina, kemijskog naziva 2-tiokso-4 peteročlani je heterociklički organski spoj. Njegov se kostur sastoji od tiazolidinskog prstena, a označava se kemijskom formulom $C_3H_3NOS_2$ (4) (Slika 1.).

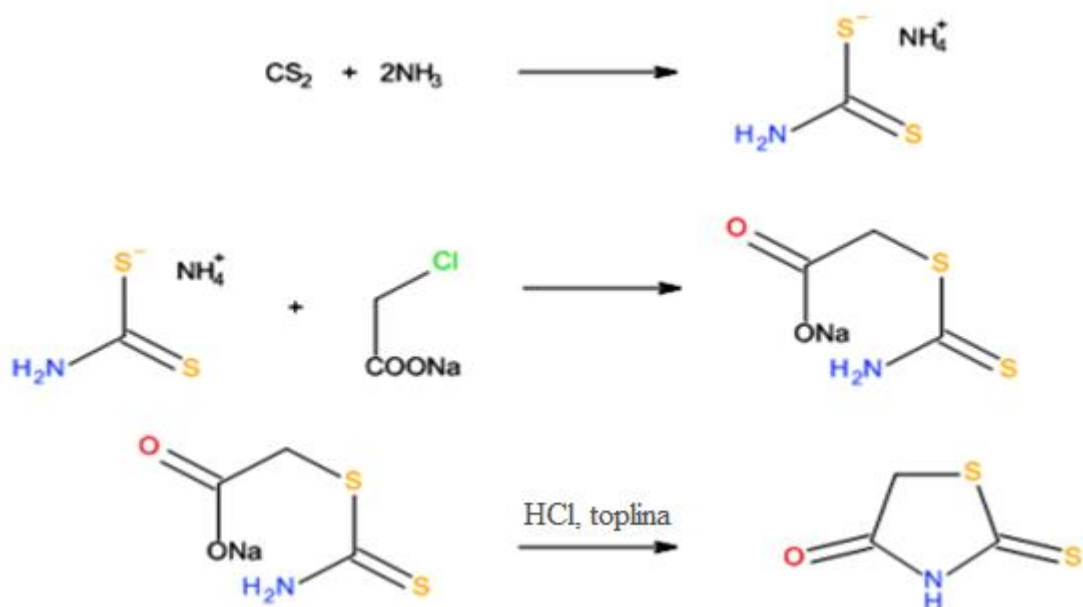


Slika 1. Strukturna formula rodanina (4).

<https://en.wikipedia.org/wiki/Rhodanine>

Krute je konzistencije, u obliku svijetložutih kristalića, težine $0,808 \text{ g/cm}^3$, molarne mase $133,182 \text{ g/mol}$ (4). Njegova točka vrelišta doseže $165\text{-}169 \text{ }^\circ\text{C}$, a prilikom ubrzanog zagrijavanja burno reagira te može eksplodirati (5). Otkriven je 1877. godine i nazvan „Rhodaninsäure“ s obzirom na to da je nastao sintezom amonijeva tiocijanata i kloroctene kiseline. Rodanin također može biti pripremljen reakcijom amonijaka, ugljikova disulfida i kloroctene kiseline, što zahtijeva međuprodukt ditiokarbamat (4) (Slika 2.).

UVOD



Slika 2. Shema proizvodnje rodanina (4).

<https://en.wikipedia.org/wiki/Rhodanine>

S obzirom na elektrofilno i nukleofilno svojstvo supstitucije rodanina, njegov se tiazolidinski prsten može modificirati, stoga je moguće pripremiti različito supstituirane rodanine. Prema tomu, postoje različite vrste rodaninskih derivata koji su tijekom znanstvenih istraživanja pokazali korisna protutumorska svojstva (1).

1.1.2. Derivati rodanina

Mogućnosti kemijske derivatizacije rodaninskog prstena omogućuju sintezu novih spojeva na bazi rodanina. Dokazano je da su derivati rodanina atraktivni spojevi zbog svojih bioloških aktivnosti te protuepileptičkog, protubakterijskog i protudijabetičkog djelovanja. Također su pokazali inhibitorno djelovanje na proteazu hepatitisa C te HIV-1 integrazu (2).

Sulaiman Ali Muhamed i suradnici sintetizirali su nekoliko derivata rodanina te ispitali njihova protutumorska svojstva. Dizajn novih rodanina temeljio se na inkorporaciji rodanina s aminokiselinskim ostacima glicina, alanina, fenilalanina, valina i glutaminske kiseline u dodatku etilnih i alilnih ostataka (2).

Od svih derivata utvrđeno je da 5-benziliden-3-etil-rodanin ima utjecaj na DNA replikaciju i inducirajući blokadu tijekom G_0/G_1 staničnog ciklusa potiče staničnu smrt apoptozom. Time je pokazana važnost prisutnosti benzilidena na C-5 poziciji rodanina. Također je dokazana i protutumorska aktivnost N-supstituiranih rodanina na leukemijskoj

staničnoj liniji, K562. Analizom staničnog ciklusa zaključeno je da N-supstituirani rodanini utječu na DNA replikaciju te dovode do akumulacije stanica u G₀ fazi ciklusa. Time dolazi do odbijanja faze G₂/M, G₁ i S, što dovodi do programirane stanične smrti apoptozom. Takva selektivna i citotoksična aktivnost N-supstituiranog rodanina, protiv humane kronične mijeloične stanične linije (K562), čini ga obećavajućim kosturom u razvoju protutumorskih lijekova (2).

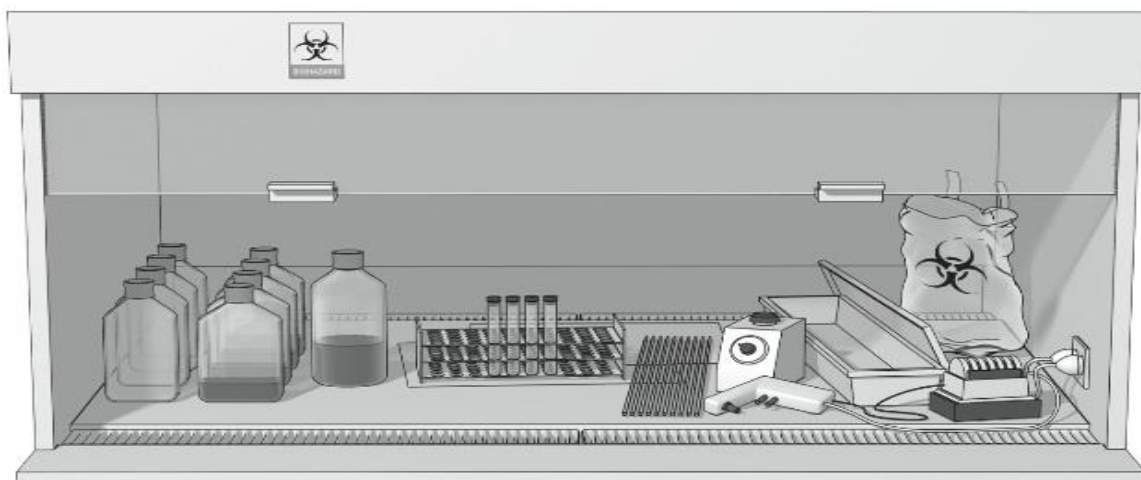
1.2. Kultura stanice i uzgoj

1.2.1. Kultura stanice

Kultura stanica podrazumijeva umjetno uzgajanje stanica izvan njihova prirodnog okruženja, pod kontroliranim uvjetima *in vitro*. Početak kulture stanica seže u 1907. godinu kada je Ross Granviele Harrison izolirao i kultivirao živčano vlakno iz žabljeg embrija (3).

Kulture se dobivaju od dispergiranih stanica, izuzetih od originalnog tkiva primarne stanične linije ili staničnog soja primjenom enzimatskih, mehaničkih ili kemijskih postupaka razdvajanja, odnosno izolacije. Zatim se suspenzija stanica stavlja u posudicu za kulturu s hranjivim medijem. Većinom se stanice prihvaćaju za dno plastične posudice u kojoj rastu (12). Mediji (hranjiva podloga) za uzgajanje stanica sastoje se od soli i glukoze, a sadrže i različite aminokiseline te vitamine koje stanice ne mogu same sintetizirati. Medij također mora sadržavati i serum koji predstavlja izvor polipeptidnih čimbenika rasta nužnih za diobu stanice (3). Optimalna je temperatura za humane stanične linije 37 °C, pri 5 % ugljikova (IV) oksida i 95 % atmosferskog zraka (12).

Osoba koja radi sa staničnim kulturama mora održavati sterilnost te slijediti definirane upute i pravila koja su za to propisana. Laboratorijski se uvjeti rada sa staničnim kulturama održavaju svakodnevnom sterilizacijom i čišćenjem laboratorija i laboratorijskog posuđa. Time se sprječava kontaminacija osjetljivih staničnih kultura. Zaštita se postiže i nošenjem odgovarajuće laboratorijske odjeće (zaštitne naočale, jednokratne zaštitne rukavice, zaštitna maska, obuća koja se nosi samo u laboratoriju ili nazuvci, uniforma ili kuta). Rad sa staničnim kulturama većinom se obavlja u vertikalnom/horizontalnom kabinetu („hood-u“) sa sterilnom opremom (Slika 3.) (12).



Slika 3. Prikaz kabineta za rad sa staničnim kulturama (6)

<http://www.uvm.edu/safety/lab/biological-safety-cabinets-0>

1.2.2. Rast stanica *in vitro*

Inicijalno se uspostavljane stanične kulture nazivaju primarnim staničnim kulturama gdje stanice rastu dok ne prekriju površinu dna posudice u kojoj se nalaze (3). Primarna se kultura dobiva iz stanica tkiva ili organa koji su uzeti izravno iz organizma. Stanice koje poteknu od primarne kulture nazivaju se stanični soj. Stanični se soj od primarne kulture ili stanične linije može odvojiti selekcijom ili kloniranjem s obzirom na stanične markere (12). Dakle, nakon primarne diobe stanice se dalje mogu nasaditi u novu posudu za uzgoj, gdje će se ponovno dijeliti. Taj se proces naziva subkultivacija. Osim tumorskih i embrionalnih matičnih stanica, sve ostale stanice u kulturi dijele se ograničen broj puta s obzirom na skraćivanje njihovih telomera (3). Telomere su kratki, ponavljajući sljedovi nukleotida. Sastoje se od TTAGGG slijedova baza koji se mogu ponoviti i do tisuću puta. Nalaze se na krajevima DNA molekula koju štite od oštećenja te održavaju njezinu stabilnost pri diobi stanica. Nakon svake diobe stanica telomere se skraćuju tako da, nakon određenog broja dioba, DNA svake normalne stanice prestaje biti zaštićena. Stoga svaka normalna stanica nakon određenog broja dioba stari i umire.

Subkultivacija daje staničnu liniju koja se dijeli na konačnu i kontinuiranu. Konačna se stanična linija sastoji od jedne vrste stanica, raste određeno vrijeme i dijeli se ograničen broj puta dok ne ostari. Razlog je tomu ograničeni životni vijek normalne diploidne stanice koji broji 30 do 50 presađivanja. Transformacija u kontinuiranu staničnu liniju može se dogoditi spontano ili se može potaknuti viralnim ili kemijskim putem. Kontinuirana stanična kultura uzgaja se godinama te su joj očuvane kromosomske i morfološke odrednice, biokemijska svojstva i brzina rasta (12).

UVOD

Tumorske ili transoformirane stanice koje imaju neograničen broj dioba pripadaju imortaliziranoj staničnoj kulturi. Okruglaste su, slabije adheriraju i imaju veći omjer jezgra/citoplazma. Brzo rastu, imaju aneuploidni broj kromosoma, velika je gustoća stanica i različit je fenotip u odnosu na primaran izvor (12).

1.3. Genska osnova raka

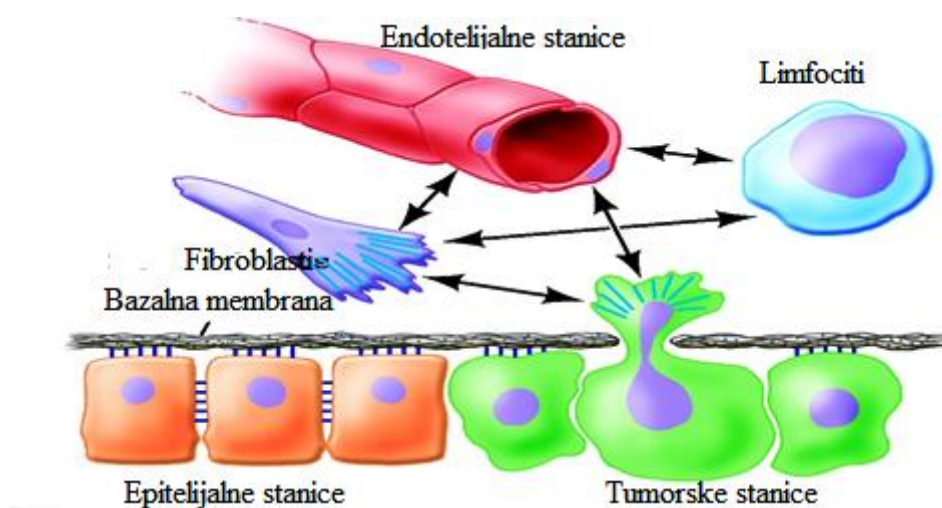
1.3.1. Tumorske stanice

Osnovni je poremećaj koji dovodi do nastanka bolesti trajno je poremećena diferencijacija, proliferacija i preživljavanje stanica raka (Slika 4.). Nastanak je raka proces koji se sastoji od više koraka tijekom kojih stanica, zbog niza promjena, postupno postaje zloćudna. To uključuje mutacije i selekciju stanica s velikim mogućnostima proliferacije, širenja i metastaziranja. Umjesto da na odgovarajući način reagiraju na signale, koji kontroliraju ponašanje normalnih stanica, stanice raka nekontrolirano rastu i dijele se šireći se u normalna tkiva i organe (3). Tumori svojim rastom mogu pritiskati okolne dijelove tijela te zdravom tijelu oduzimati potrebne hranjive tvari. Rak može nastati zbog poremećaja proliferacije bilo koje vrste stanica u tijelu, prema tome razlikujemo više od stotinu vrsta raka. Međutim, glavna je razlika između benignih (dobročudnih) tumora i malignih (zloćudnih) tumora u tome što dobroćudni tumor ostaje ograničen na mjestu na kojem je nastao i moguće ga je kirurški ukloniti. Usuprot tomu, zloćudni se tumor lako širi na okolna zdrava tkiva, u konačnici i na cijelo tijelo preko krvožilnog i limfnog sustava (metastaze). Maligni se tumori obično ne mogu ukloniti lokalnim metodama liječenja (3).

Nekontroliranu proliferaciju stanica raka *in vivo* prati slično ponašanje u staničnoj kulturi. Razlika između stanica raka i normalnih stanica u kulturi jest u tome što u normalnih stanica dolazi do inhibicije proliferacije ovisno o gustoći. Normalne stanice proliferiraju dok ne dostignu odgovarajuću gustoću. Proliferacija prestaje kada stanice ulaze u G_0 fazu staničnog ciklusa. Za razliku od toga, proliferacija većine stanica raka nije osjetljiva na inhibiciju ovisnu o gustoći. Tumorske stanice uglavnom nastavljaju rasti u kulturi postizući visoku gustoću te nekontrolirano proliferiraju *in vitro*. Također, mnoge tumorske stanice imaju manju potrebu za čimbenicima rasta od odgovarajućih normalnih stanica, što pridonosi njihovoj neograničenoj proliferaciji. U nekim slučajevima stanice raka same stvaraju čimbenike rasta, dok je u drugima smanjena ovisnost stanica raka o čimbenicima rasta (3).

1.3.2. Uzroci raka

Tvari koje uzrokuju rak nazivaju se karcinogeni. Otkriveni su istraživanjima na pokusnim životinjama i epidemiološkom analizom učestalosti pojedinih vrsta raka u određenim populacijama ljudi. Zračenje i mnogi kemijski karcinogeni djeluju tako što oštećuju DNA i induciraju mutacije. Karcinogeni su koji pridonose pojavi raka u ljudi: ultraljubičasto zračenje, kemikalije iz duhanskog dima, aflatoksin itd. Druga vrsta karcinogena ne uzrokuju mutacije, već pridonose nastanku raka stimulirajući proliferaciju stanica. Takve spojeve nazivamo promotori tumora. Hormoni su također važni promotori nastanka raka. Primjerice, pretjerana upotreba estrogena znatno povećava vjerojatnost nastanka raka maternice ili raka dojke (3).



Slika 4. Proliferacija tumorskih stanica (7)

<http://www.uvm.edu/safety/lab/biological-safety-cabinets-0>

1.3.3. Onkogeni

Istraživanja tumorskih virusa pokazala su da određeni geni (onkogeni) mogu dovesti do transformacije stanica čime se omogućio prvi uvid u molekularne osnove raka. Ključna poveznica virusnih i staničnih onkogenata otkrivena je istraživanjem jako onkogenih retrovirusa. Naime, svi virusi sadržavaju najmanje jedan gen koji nije potreban za replikaciju istog virusa, već dovodi do stanične transformacije. Takvi geni poput src, ras i raf, kodiraju proteine koji su ključni dijelovi signalnih putova za stimulaciju proliferacije stanica. Retrovirusni su onkogeni potekli od normalnih staničnih gena koji se zovu proto-onkogeni (3).

UVOD

Ako se proto-onkogeni promijene i time postaju aktivniji, nastaju onkogeni, što se naziva aktivacijom onkogenata. Takva promjena dovodi do nekontroliranog rasta i diobe stanice što za posljedicu uzrokuje nastanak raka. Onkogen se može aktivirati zbog mutacije u samom genu, zbog povećanog broja kopije gena (genska amplifikacija), zbog premještanja jednog dijela kromosoma na drugi kromosom (translokacija kromosoma), zbog gubitka genetičkog materijala s amino i karboksi krajeva proto-onkogenata ili zbog promjene u pojedinačnim aminokiselinama proto-onkogenata (točkaste mutacije) (13).

RasH, rasK, rasN tri su člana porodice ras gena i ujedno najčešći onkogeni koji se pojavljuju u ljudskim tumorima. Oni imaju ulogu u nastanku 20 % svih ljudskih malignoma (3).

1.3.4. Tumor-supresorski geni

Aktivacija staničnih onkogenata samo je jedna od dviju različitih vrsta genskih promjena važnih za nastanak tumora. Druga je inaktivacija tumor-supresorskih gena. Ti geni normalno inhibiraju staničnu proliferaciju i nastanak tumora. U mnogih su tumora nestali ili su inaktivirani (3). Inaktivaciju tumor-supresorskih gena uzrokuju epigenetski čimbenici ili mutacije. Nasljeđuju se uglavnom recesivno, što znači da je potrebna inaktivacija obaju alela za njihovu aktivaciju (13).

Prvi je otkriveni tumor-supresorski gen Rb gen. Molekularnim kloniranjem i izolacijom 1986. godine dokazano je da u retinoblastomima Rb gen nedostaje ili je mutiran. Drugi je otkriveni tumor-supresorski gen p53. On se aktivira uslijed oštećenja stanične deoksiribonukleinske kiseline (DNA). Uloga mu je zaustaviti takvu oštećenu stanicu, u određenoj fazi staničnog ciklusa, i popraviti ju. Ako se oštećenja ne mogu popraviti, stanica se uklanja programiranom staničnom smrću, apoptozom (13).

1.4. Metode određivanja citotoksičnosti

1.4.1. Stanični testovi citotoksičnosti

Test citotoksičnosti važna je metoda kojom se otkrivaju moguće karcinogeni spojevi te ostali spojevi rizični za ljudsko zdravlje. Zasniva se na tretiranju živih stanica (tumorskih ili normalnih) testnom kemikalijom. Pri tome uzima se u obzir odsutnost, odnosno narušenost stanične membrane. U testu se primjenjuje boja koja lako prodire u stanicu i vizualizira njezinu unutrašnjost (8).

UVOD

Neki su od testova citotoksičnosti redukcija resazurinom, redukcija tetrazolijumom, markeri proteaza i detekcija ATP-a (9). Svim navedenim testovima potrebna je inkubacija reagensa sa živim stanicama pri čemu se supstrat pretvara u obojeni ili fluorescirajući produkt. Takav je nastali signal proporcionalan s brojem živih stanica, a otkriva se optičkim čitačem (10). Drugim riječima, stanični testovi omogućuju mjerenje vezanja receptora i razine prijenosa signala (9). Nakon što stanica umre, gubi se sposobnost pretvorbe supstrata u produkt (10).

1.4.2. Test redukcije tetrazolijumom – MTT

MTT je spoj koji sadrži tetrazolijum te se koristi za dokazivanje broja živućih stanica, pod definiranim uvjetima (11).

MTT je homogeni test koji radi na načelu dokazivanja aktivnosti dehidrogenaze u stanicama. Naime, živuće stanice imaju aktivan metabolizam staničnih dehidrogenaza. Nakon što se na stanice nanese MTT spoj, stanice koje su žive brane se svojim dehidrogenazama. Tom reakcijom nastaje spoj koji se naziva formazan. Taj se proces vidi kao promjena iz žute u ljubičastu boju. Što je više živućih stanica, to je jače obojenje u ljubičasto. Intenzitet se obojenja mjeri na optičkom čitaču pri 570 nm (9).

MTT test razvijen je u formatu za 96 jažica i prikladniji je za veći broj uzoraka. Testiranje traje tri dana (9).

2. CILJ

Cilj je ovog istraživanja:

- ispitati utjecaj rodanina i rodaninskih derivata na rast tumorskih stanica u uvjetima *in vitro*,
- ispitati povezanost strukture spojeva s inhibicijom rasta tumorskih stanica te
- utvrditi koji spoj ima najučinkovitije protutumorsko djelovanje.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Ispitivani spojevi

Spojevi su kojima se koristilo u istraživanju: čisti rodanin ili 2-tioksotiazolidin-4-on (Slika 5.), 3-ciklopropil-2-tioksotiazolidin (Slika 6.), 3-(4-klorfenil)-2-tioksotiazolidin (Slika 7.) i 3-fenil-2-tioksotiazolidin-4-on (Slika 8.). Derivati su rodanina sintetizirani na Katedri za Kemiju i Ekologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku (Slika 5.), a čisti je rodanin kupljen gotov. Derivati rodanina i čisti rodanin za potrebe su istraživanja otopljeni u kombinaciji DMSO i H₂O u omjeru 1:1 te pripremljeni kao koncentrirane otopine (10⁻² mol/dm³). Izuzetak je 3-(4-klorfenil)-2-tioksotiazolidin-4-on koji se pripremio otapanjem u čistom DMSO-u. Radne su otopine testnih spojeva pripremljene tri dana prije pokusa u koncentracijskom nizu od 10⁻³ do 10⁻⁶ M. Konačan je niz koncentracija koje su ispitivane bio od 10⁻⁴ do 10⁻⁷ M.

3.1.2. Kemikalije

Za pokus je upotrijebljeno : Dulbecco modificirani Eagleov medij (DMEM), Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640), Lonza (Basel Switzerland), fetalni goveđi serum (FBS), 0,25 % tripsin EDTA, Na-piruvat i antibiotik-antimikotik 100 x; GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), tripansko plavilo, 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (HEPES), 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT), L-glutamin, Natrij dodecil suflat (SDS), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD) te dimetil sulfoksid (DMSO); Acros organics (New Jersey, SAD).

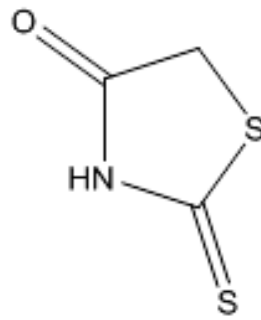
3.1.3. Stanične linije

U svrhu pokusa učinak rodanina i njegovih derivata ispitan je na humanim staničnim linijama.

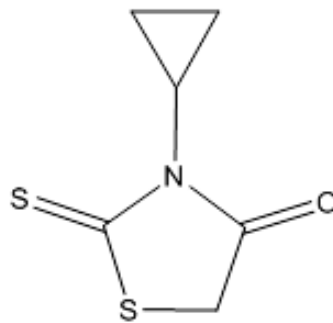
Humane stanične linije:

- CaCo-2 (adenokarcinom debelog crijeva)
- HeLa (adenokarcinom vrata maternice)
- NCI-H358 (bronhoalveolarni karcinom)
- MCF-7 (karcinom debelog crijeva)

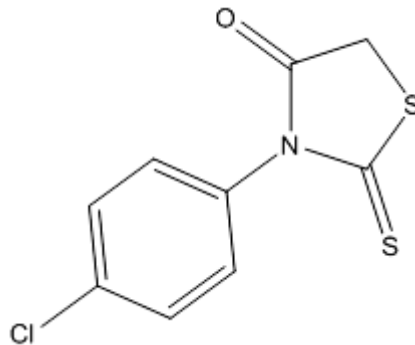
MATERIJALI I METODE



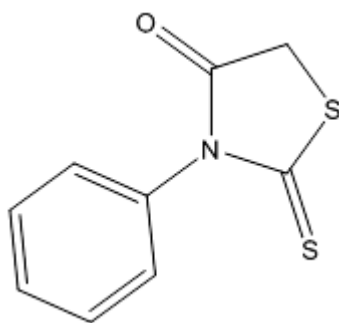
Slika 5. Rodanin ili 2-tioksotiazolidin-4-on



Slika 6. 3-ciklopropil-2-tioksotiazolidin-4-on (oznaka cyclo; C-Ro)



Slika 7. 3-(4-klorfenil)-2-tioksotiazolidin-4-ON (oznaka PCI rhoda; PCI-Ro)



Slika 8. 3-fenil-2-tioksotiazolidin-4-ON (oznaka phenyl; P-Ro)

3.2. Metode

3.2.1. Kultivacija stanica *in vitro*

Adherentne se stanice uzgajaju u plastičnim bocama površine 25 cm². Bočice se čuvaju u inkubatorima uz atmosferu od 5 % CO₂ i temperaturu od 37 °C. Stanične se linije uzgajaju u mediju koji sadrži 10 % fetalnog goveđeg seruma – FBS koji služi kao izvor hormona i čimbenika rasta.

Za održavanje adherentnih staničnih linija, kojima se koristilo u pokusu, koristi se DMEM medij koji sadrži 10 % temperaturno inaktiviranog FBS-a, 2Mm L-glutamina i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomycin antibiotika. Stanične se linije ispiru s 2 – 5 ml PBS-a. Time se uklanja zaostali medij. Dodavanjem 1,5 – 2 ml tripsina i inkubacijom u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELL life TM, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) stanice odvajamo od površine.

3.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi

Za određivanje broja stanica koristi se Bürker-Türk-ova komorica (Slika 9.). Stanice moraju biti resuspendirane i od njih oduzimamo 50 µL suspenzije te prenosimo u jažice. U jažice se dodaje 100 µL tripan plavila. Broj stanica određen je brojanjem u hemocitometru (Slika 9.), mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka). Mrtve stanice vide se kao plavo obojene, a s obzirom na to da im je membrana uništena, boja lako ulazi u njih.

Broj vijabilnih stanica određuje se formulom:

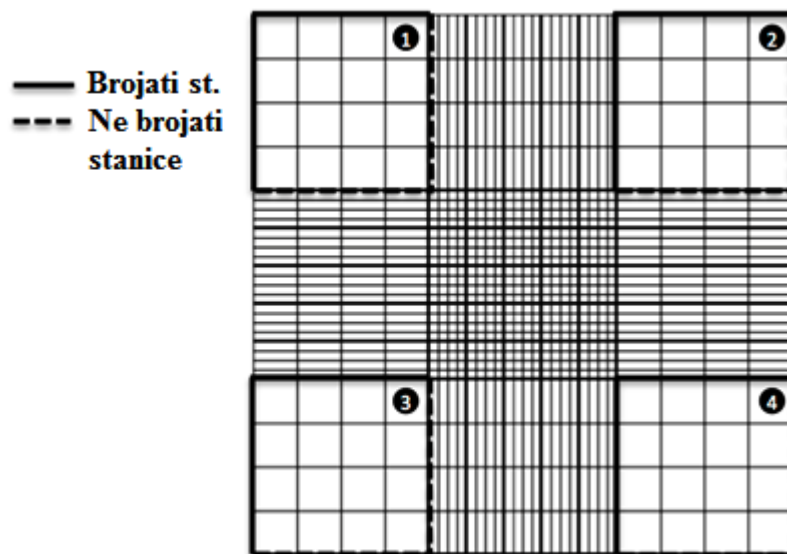
$$N/4 * 3 = X * 10^4 \text{ stanica/cm}^3$$

Gdje je:

N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – faktor razrjeđenja



Slika 9. Bürker-Türk komorica (15)

<https://www.hemocytometer.org/hemocytometer-protocol/>

3.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom

MTT test kolorimetrijska je metoda kojom se provjerava stanična aktivnost, odnosno vijabilnost čime se omogućava ispitivanje citotoksičnosti određene tvari i proliferacija stanica u *in vitro* uvjetima.

Metabolički aktivna stanica sadrži mitohondrijsku sukcinat dehidrogenazu koja reducira tetrazolijeve soli (3,(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5 difeniltetrazolium bromid). To rezultira promjenom boje iz žute u ljubičastu, s obzirom na to da se stvaraju tamnoljubičasti kristali formazana. Količina nastalog formazana proporcionalna je broju živućih stanica. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski automatskim čitačem mikropločica (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA). Intenzitet se obojenja očitava na valnoj duljini od 540 do 570 nm.

Postupak:

Na 96 jažica mikrotitarske ploče nasadene su adherentne stanične linije. U svakoj jažici, u ukupnom volumenu od 20 μL (180 μL stanične suspenzije + 20 μL derivata rodanina), nasadene su stanice u koncentraciji od 2×10^4 st/mL. Kako bi se prihvatile za

podlogu, stanice su inkubirane u CO₂ inkubatoru na 24 h i potom izložene djelovanju derivata 72 h.

Nakon inkubacije sa stanica se uklanja medij, zatim se tretiraju 1x MTT/PBS-om koncentracije 5 mg/L. Nakon toga stanice se ponovno inkubiraju, ali ovoga puta na 4 h.

Da bi se otopili nastali formazanski kristali, dodaje se DMSO (dimetil sulfoksid) te se ploču lagano tresu na tresilici 20 minuta. Dobiveni se rezultati očitavaju na mikročitaču pri valnoj duljini od 570 nm.

Nakon dobivenih rezultata apsorbancije, kontrola i pozadine (background), određen je udio preživljenja stanica koji se izražava prema sljedećoj formuli (Slika 9.):

$$\% = \frac{(A_{\text{tretman}} - A_{\text{blank}})}{(A_{\text{kontrola}} - A_{\text{blank}})} \times 100$$

Slika 10. Formula za dobivanje postotka živih stanica u kulturi

Statistika:

Za sve stanične linije (NCI-H358, MCF-7, HeLa te CaCo-2) izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija te je napravljen grafikon. Rezultati su obrađeni u programu Statistica 13.1. Podatci su analizirani primjenom deskriptivne statistike za određivanje normalnosti razdiobe podataka i neparametrijskim Kolmogorov-Smirnovljevim testom za usporedbu dviju nezavisnih grupa podataka uz granicu statističke značajnosti $P < 0,05$.

4. REZULTATI

Citotoksični učinak čistog rodanina i njegova tri derivata (PCI-Ro, C-Ro, P-Ro) istražen je na četirima staničnim linijama (HeLa, CaCo-2, MCF-7, NCI-H358). Rezultati ispitivanja citotoksičnog učinka derivata prikazani su na slikama od 11 a) do 11 d). Svi testni spojevi ispitani su na spomenutim staničnim linijama u koncentracijskom nizu od 10^{-7} do 10^{-4} M. Citotoksični učinak procijenjen je primjenom MTT testa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija ($\Delta \pm SD$) triju nezavisnih ponavljanja u triplikatu. Granica statističke značajnosti ($P > 0,05$) označena je (*).

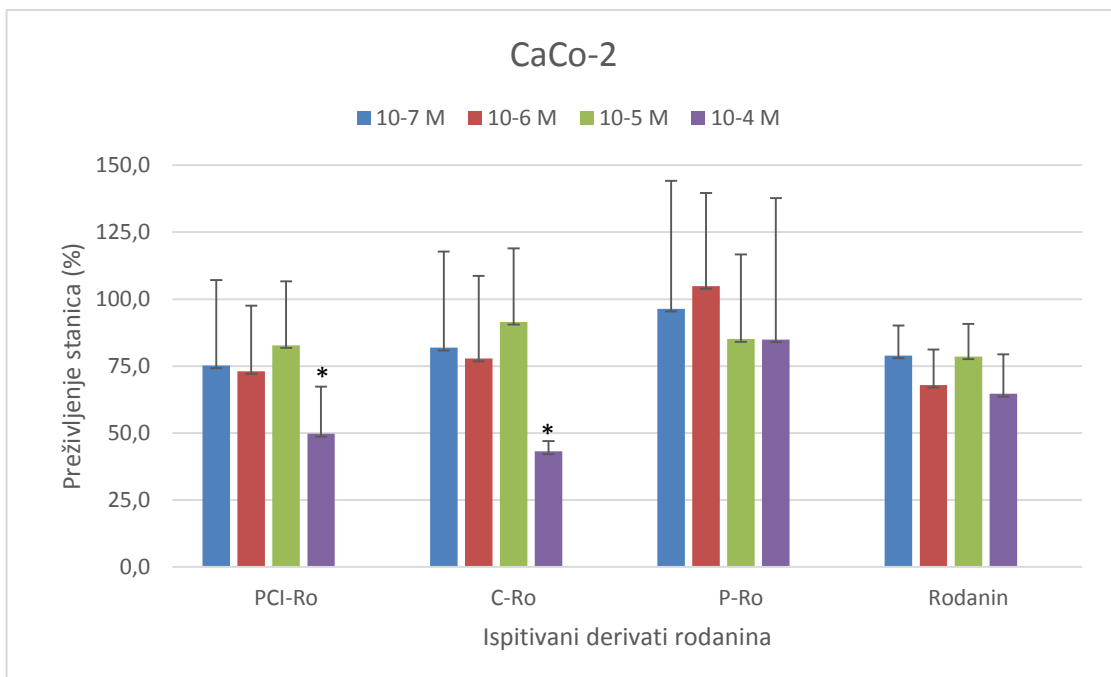
Pri koncentraciji od 10^{-4} M derivati PCI-Ro te C-Ro imaju slično djelovanje na staničnu liniju CaCo-2. PCI-Ro inhibira rast stanica za oko 50 - 65 %, dok C-Ro inhibira za 55 – 65 %. Isti derivati pri ostalim koncentracijama od 10^{-5} do 10^{-7} nemaju značajan učinak. Derivat P-Ro i čisti rodanin ne pokazuju inhibitorni učinak ni pri jednoj koncentraciji (Slika 11 a)).

Na HeLa je staničnoj liniji djelovanje ispitivanih spojeva jednako kao i kod CaCo-2 stanične linije. Najsnažniju aktivnost pokazuje C-Ro pri koncentraciji od 10^{-4} M, inhibirajući stanični rast za 55 – 65 %. Pri istoj koncentraciji od 10^{-4} M, PCI-Ro ima 50 – 65 %-tni učinak. Veća otpornost uočena je tretiranjem HeLa stanične linije s P-Ro i čistim rodaninom (Slika 11.b)).

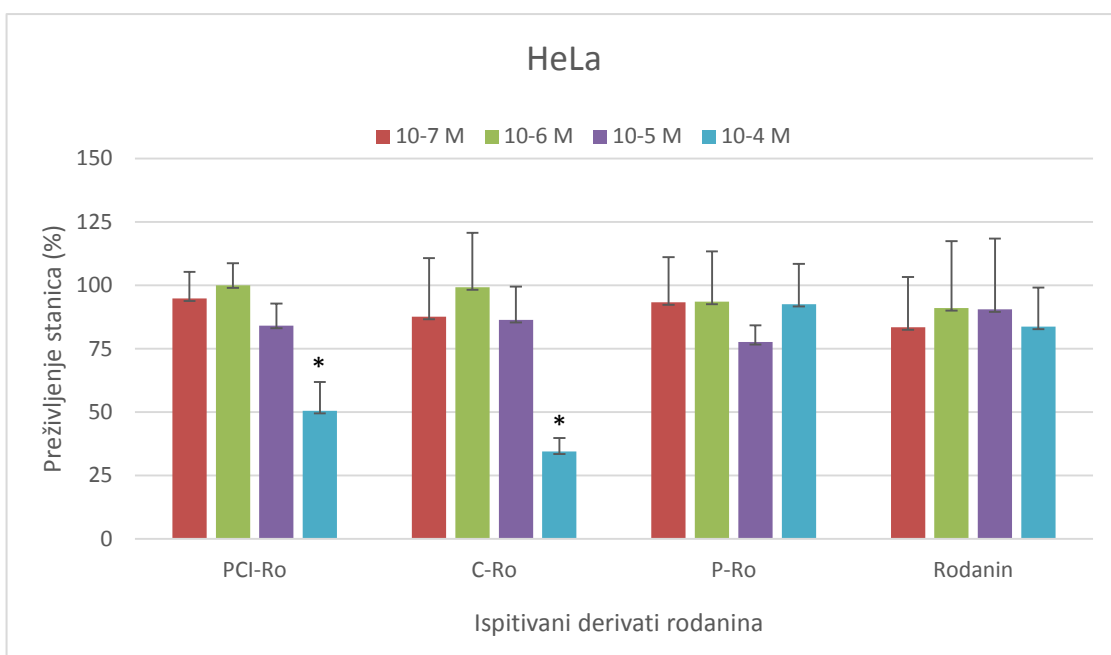
Tretiranjem MCF-7 stanične linije s C-Ro, pri koncentraciji od 10^{-4} M, uočen je 80 %-tni inhibicijski učinak. Prema tomu, u odnosu na ostale stanične linije tretirane istim spojem, pri istoj koncentraciji, MCF-7 pokazuje najveću osjetljivost na C-Ro spoj. Kada na MCF-7 staničnu liniju djeluje C-Ro, pri koncentraciji od 10^{-4} M, stanična se inhibicija povećava za 50 – 65 %. Čisti rodanin i P-Ro nemaju značajno djelovanje (Slika 11.c)).

Djelovanje ispitivanih spojeva na NCI-H358 staničnu liniju jednako je kao i na CaCo-2 te HeLa staničnu liniju. Pri koncentraciji od 10^{-4} M 50 – 65 % inhibicijskog učinka daje PCI-Ro, a C-Ro iste stanice inhibira za 55 – 65 %. Čisti rodanin i P-Ro nemaju značajno djelovanje.

REZULTATI

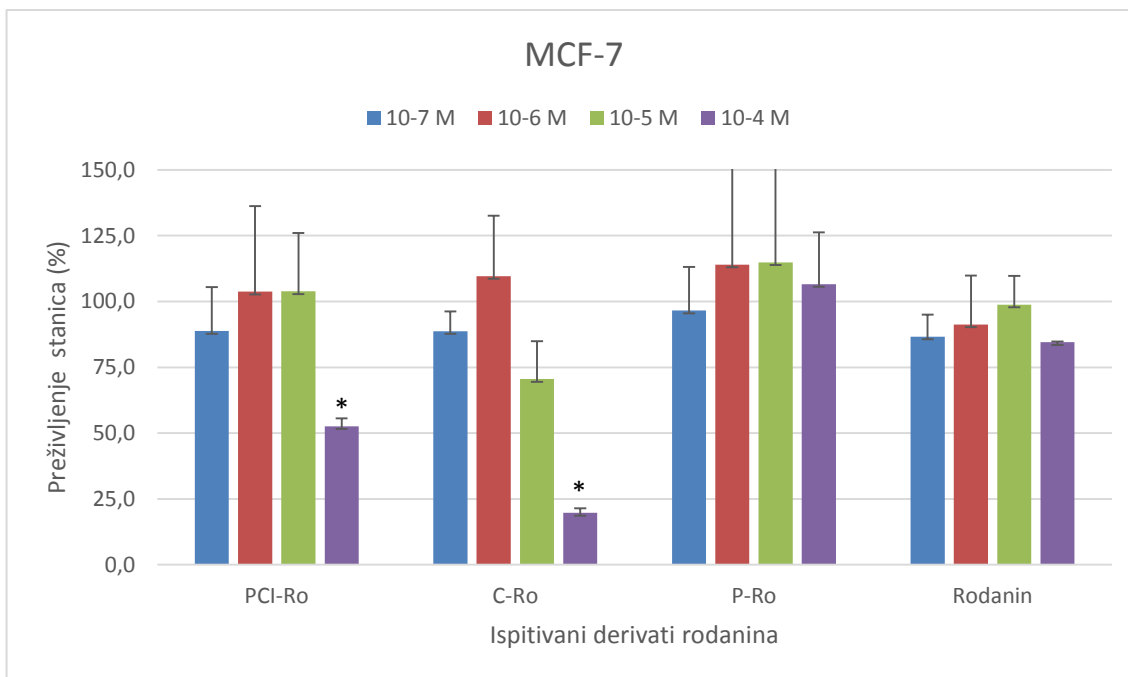


11. a)

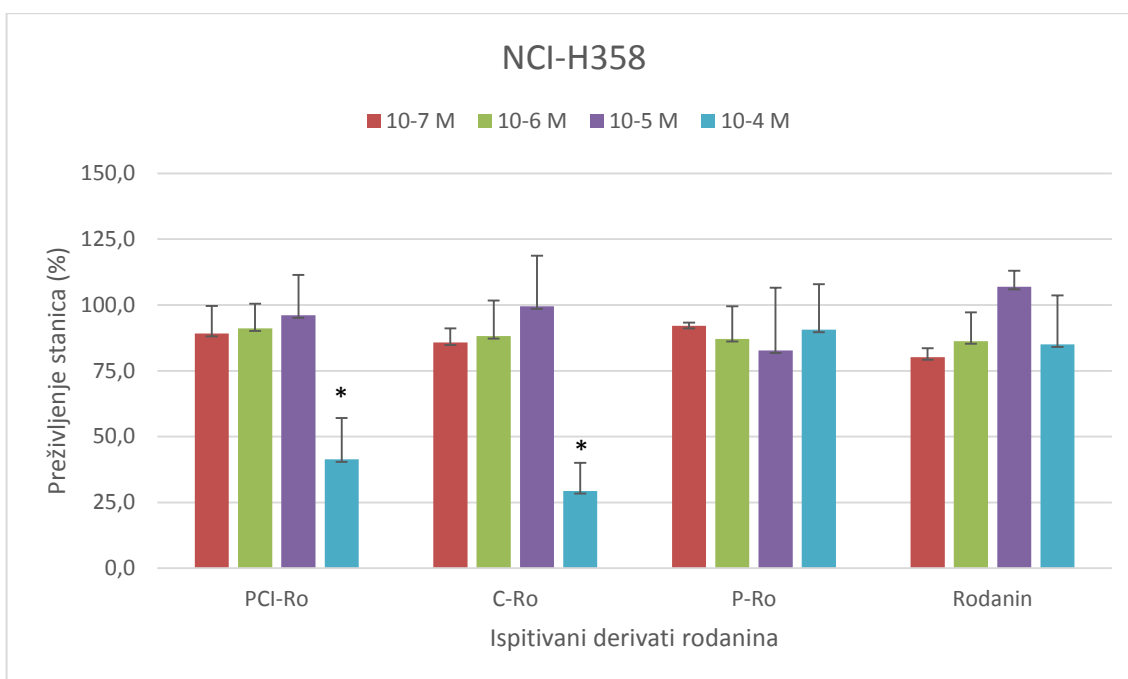


11. b)

REZULTATI



11. c)



11. d)

Slika 11. Citotoksični utjecaj čistog rodanina i rodaninskih derivata na stanične linije: a) CaCo-2; b) HeLa; c) MCF-7; d) NCI-H358

Stanice su izložene djelovanju rodanina i triju rodaninskih derivata u koncentracijama od 10^{-4} do 10^{-7} M. Citotoksični učinak određen je MTT testom tijekom 72 sata. Rezultati su ispitivanja prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($\Delta \pm SD$) triju nezavisnih mjerenja provedenih u triplicatu.

5. RASPRAVA

Rak je jedan od najvećih i najozbiljnijih zdravstvenih problema današnjice te je drugi po redu uzročnik smrti. Svojom brзом proliferacijom, diferencijacijom i otpornošću uzima maha obično u samo nekoliko mjeseci od svoje pojave, šireći se s primarnog mjesta nastanka na cijelo tijelo. Ta je bolest u mogućnosti zahvatiti bilo koji dio tijela, odnosno bilo koju vrstu stanica. Stanice su raka često nalik normalnim tjelesnim stanicama, imaju visoku mogućnost preživljavanja, mutacije i selekcije, što dovodi do postojanja najrazličitijih vrsta karcinoma. Bez obzira na postojanje različitih tretmana raka (kirurško odstranjivanje, radioterapija, kemoterapija), ni jedna nije dovoljno učinkovita. Kemoterapeutici, kao najčešće primjenjivani lijekovi za karcinome, ne znaju prepoznati razliku stanica raka od ostalih, normalnih tjelesnih stanica. Ti lijekovi nemaju ciljano djelovanje na isključivo bolesne stanice raka, nego uništavaju i zdrave stanice i u konačnici cijeli organizam pati. Dakle, iako postoje kemoterapeutici kao trenutačna terapija, koja donekle pomaže (5-fluorouracil, cisplatin, paclitaxel, docetaxel), ta bolest i dalje ostaje opasna i smrtonosna. Zbog svega navedenog, izrazito je teško pronaći prigodan lijek koji bi se uspješno izborio s tom bolešću. Posljednjih nekoliko desetljeća intenzivno se provode različita istraživanja protutumorskih spojeva s niskom toksičnošću i minimalnim nuspojavama (1).

Rodanin i njegovi derivati jedni su od mogućih protutumorskih lijekova budućnosti. S obzirom na elektrofilno i nukleofilno svojstvo supstitucije rodanina, njegov se tiazolidinski prsten može modificirati. Zbog takve mogućnosti kemijske derivatizacije rodaninskog prstena, moguće je pripremiti različito supstituirane rodanine. Tijekom znanstvenih istraživanja rodanini su pokazali protubakterijsko, protuvirusno i protudijabetičko djelovanje, ali i korisna protutumorska svojstva (1). Sulaiman Ali Muhamed i suradnici tako su dizajnirali nekoliko vrsta rodaninskih derivata. Molekule su dizajnirali tako da svaka ima različitu skupinu na N-3 mjestu rodaninske jezgre. Protutumorsko djelovanje takvih nosintetiziranih rodanina testirali su na staničnoj liniji ljudske kronične mijeloične leukemije (K562). Kada se na N-3 mjestu rodaninske jezgre nalazila hidrofilna (-COOH) skupina, zabilježena je citotoksična aktivnost. Zabilježena je i citotoksična aktivnost na istu staničnu liniju kada se na N-3 mjestu nalazila hidrofobna skupina (-CH₃). Međutim, kada su se na istom mjestu rodaninske jezgre nalazile dvije hidrofilne skupine, citotoksična je aktivnost bila manja nego kada su se na istom mjestu nalazile dvije hidrofobne skupine. Zaključeno je da citotoksična aktivnost tih spojeva opada s veličinom skupine koja se nalazi na N-3 mjestu. Osim toga, očito je da je djelovanje spojeva rodanina usko povezano s njihovom strukturom, brojem, Ispitivanje protutumorske aktivnosti nosintetiziranih derivata rodanina *in vitro*

vrstom, veličinom i mjestom nastavaka koji se nalaze na kosturu rodanina, odnosno samom rodaninskom prstenu (2).

Takva je mogućnost sintetiziranja različitih rodaninskih spojeva, koji bi mogli imati korisne protutumorske učinke, također iskorištena u istraživanju Mohammada Azizmohammadija i suradnika. Dakle, njihovo se istraživanje također temeljilo na praćenju rodaninskih derivata na trima zloćudnim staničnim linijama te na jednoj koja nije zloćudna. Također, zaključeno je da citotoksično djelovanje novosintetiziranih derivata rodanina ovisi o izgledu njihova tiazolidinskog prstena, odnosno o strukturi. N-supstitucijom s metilnim, etilnim i karboksimetilnim ostacima dobili su se inaktivni spojevi koji nisu imali inhibicijsko djelovanje na njihove ispitivane stanice. Najveću citotoksičnu aktivnost imao je rodanin s metoksi grupom na C-8 mjestu prstena. Također je tiazolidin-2,4-dione derivatu bio zamijenjen atom kisika s atomom sumpora, čime je dobiven novi derivat koji je imao značajan utjecaj na MCF-7 staničnu liniju koja je bila jedna od triju koje su ispitivali (1).

U ovom radu primjećuje se da je kod svih spojeva, na svim staničnim linijama preživljenje iznad 75 % pri koncentracijama reda 10^{-5} M do 10^{-7} M. Jači se citotoksični učinak uočava na najvišoj koncentraciji (10^{-4} M), ali samo za derivate PCI-Ro i C-Ro. PCI –Ro dovodi do inhibicije staničnog rasta za 50 – 65 %, dok C-Ro inhibira MCF-7 za oko 80 %, a ostale stanične linije (CaCo-2, HeLa, NCI-H358) za oko 55 – 65 %. Uspoređujući pri tome izgled strukture svih rodanina koje su upotrijebljene prilikom ovog istraživanja, primjećuje se da svaki od njih ima različitu skupinu na N-3 mjestu, osim čistog rodanina koji na tom mjestu ima samo vodik (H). Najjače citotoksično djelovanje imali su PCI-Ro, koji ima klorfenil na N-3 mjestu tiazolidinskog prstena rodanina, te C-Ro koji ima ciklopropil na istom mjestu. Takvo inhibicijsko djelovanje svih staničnih linija dogodilo se samo na najvišoj koncentraciji, pri 10^{-4} M, što znači da viša koncentracija pogoduje inhibitornom učinku PCI.Ro i C-Ro. Međutim, čisti rodanin i P-Ro nisu pokazali značajne učinke ni na jednoj staničnoj liniji ni pri jednoj koncentraciji. Time se može zaključiti da su ta dva spoja slabo djelotvorna na ispitivane stanične linije.

Spojevi s tiazolidinskim prstenom, koje je lako derivatizirati laboratorijskim postupcima, mogu biti učinkoviti lijekovi protiv karcinoma. Takvo važno svojstvo i sami mehanizam djelovanja rodanina i njegovih derivata potrebno je daljnjim ispitivanjem dodatno istražiti te utvrditi njegove moguće ljekovite učinke. Ciljanjem na specifične metaboličke, signalne i enzimatske putove može dovesti do pronalaska nove, revolucionarne protutumorske terapije koja bi bila nisko toksična i ne bi izazivala štetne nuspojave.

6. ZAKLJUČAK

- Najjači citotoksičan učinak na ispitivane stanične linije imaju derivati PCI-Ro i C-Ro u koncentraciji od 10^{-4} M.
- Najmanju citotoksičnost pokazali su čisti rodanin te P-Ro i to na svim staničnim linijama, pri svim upotrijebljenim koncentracijama.
- Najveću je osjetljivost pokazala stanična linija MCF-7 pri djelovanju derivata C-Ro, pri koncentraciji od 10^{-4} M.
- Sve stanične linije pokazale su otpornost na sve korištene spojeve pri koncentracijama od 10^{-5} M do 10^{-7} M.
- rodaninski derivat C-Ro (-ciklopropil-2-tioksotiazolidin-4-on), koji u svojoj strukturi sadrži ciklopropil, pokazao je najveću citotoksičnu aktivnost u skupini ispitivanih spojeva.

7. SAŽETAK

Uvod: Rodanin je heterociklički, organski spoj otkriven 1877 godine. Njegov se kostur sastoji od tiazolidinskog prstena koji ima veliku mogućnost modifikacije. Zbog toga je lako laboratorijski pripremiti različite vrste rodaninskih derivata koji su tijekom znanstvenih istraživanja pokazali korisna protutumorska svojstva. Dokazano je da su derivati rodanina atraktivni spojevi zbog svojih bioloških aktivnosti te zbog protuepileptičkog, protubakterijskog i protudijabetičkog djelovanja.

Cilj: Ispitati citotoksičan učinak čistog rodanina i njegovih triju derivata (PCI-Ro, C-Ro, P-Ro) na četirima humanim tumorskim staničnim linijama (HeLa, CaCo-2, MCF-7, NCI-H358).

Materijali i metode: Derivati rodanina sintetizirani su na Katedri za Kemiju i Ekologiju Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku (Slika 5.), a čisti je rodanin kupljen gotov. Derivati rodanina i čisti rodanin za potrebe su pokusa otopljeni u kombinaciji DMSO i H₂O u omjeru 1:1 te pripremljeni kao koncentrirane otopine (10⁻² mol/dm³). Izuzetak je 3-(4-klorfenil)-2-tioksotiazolidin-4-on koji se pripremio otapanjem u čistom DMSO-u. Kultivacija se stanica odvijala u inkubatoru uz 5 %-tnu atmosferu ugljikova (IV) oksida i temperaturu od 37 °C. Bočice u kojima se uzgajaju stanice površine su 25 cm², a za održavanje stanica koristio se DMEM medij.

Rezultati: Primijećeno je da se kod svih spojeva na svim staničnim linijama preživljenje više od 75 % pri koncentracijama reda 10⁻⁵ M do 10⁻⁷ M. Jači citotoksični učinak uočava se na najvišoj koncentraciji (10⁻⁴ M), ali samo za derivate PCI-Ro i C-Ro. PCI-Ro dovodi do inhibicije staničnog rasta za 50 – 65 %, dok C-Ro inhibira MCF-7 za oko 80 %, a ostale stanične linije (CaCo-2, HeLa, NCI-H358) za oko 55 – 65 %.

Zaključak: Derivati rodanina smanjuju rast tumorskih stanica. Postotak inhibicije ovisi o koncentraciji spoja te vrsti stanične linije.

Ključne riječi: rodanin; derivati rodanina; citotoksični učinak; kultura stanica; tumorske stanice

8. SUMMARY

Introduction: Rhodanine is a heterocyclic, organic compound, discovered in 1877. The core of the compound consists of a thiazolidine ring which has a great power of modification. Therefore, it is easy to prepare a laboratory different types of rhodanine derivatives that have shown useful anti-tumor properties during scientific research. It has been proven that rhodanine derivatives are attractive compounds due to their biological activity, antiepileptic, antibacterial and antidiabetic activity.

Objective: To investigate the cytotoxic effect of pure rhodanine and its three derivatives (PCI-Ro, C-Ro, P-Ro) on four human tumor cell lines (HeLa, CaCo-2, MCF-7, NCI-H358).

Materials and methods: Rhodanine derivatives were synthesized in the Department of Chemistry and Ecology at the Faculty of Food Technology in Osijek (Figure 5), whereas the pure rhodanine was purchased as such. For the purpose of the experiment, rhodanine derivatives and pure rhodanine were dissolved in the solution of DMSO and H₂O in a 1:1 ratio and prepared as concentrated solutions (10⁻² mol/dm³). An exception is 3-(4-klorfenil)-2-tioksotiazolidin-4-on, which was prepared by dissolving in pure DMSO. Cultivation of the cells was carried out in an incubator with a 5% carbonic (IV) oxide atmosphere and a temperature of 37 ° C. The vials in which the cells were grown were 25 cm², and the DMEM medium was used for cell maintenance.

Results: It was noticed that survival is above 75% in all compounds, on all cell lines, at concentrations of 10⁻⁵ M to 10⁻⁷ M. A stronger cytotoxic effect is observed at the highest concentration (10⁻⁴ M), but only for PCI-Ro and C-Ro derivatives. PCI-Ro brings to the inhibition of cell growth by 50-65%, while C-Ro inhibits MCF-7 for about 80%, and other cell lines (CaCo-2, HeLa, NCI-H358) for about 55-65%.

Conclusion: Rhodanine derivatives reduce the growth of tumor cells. The percentage of inhibition depends on the concentration of the compound and the cell line type.

Key words: rhodanine; rhodanine derivatives; cytotoxic effect; cell culture; tumor cells

9. LITERATURA

1. Mohammad Azizmohammadi, Mehdi Khoobi, Ali Ramazani, Saeed Emami, Abdolhossein Zarrin, Omidreza Firuzi, Ramin Miri, Abbas Shafiee. 2H-chromene derivatives bearing thiazolidine-2,4-dione, rhodanine or hydration moieties as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 59. (2013.) ; 15-22
2. Sulaiman Ali Muhammad, Suban Ravi, Arumugam Thangamani. Synthesis and evaluation of some novel *N*-substitued rhodanines for their anticancer activity. Department of Chemistry, Karpagam Academy of Higher Education, Coimbatore 641 021, Tamil Nadu, India. *Medicinal Chemistry* (2016.) ; DOI 10.1007/s00044-016-1545-7
3. Cooper GM, Hausman RE. Stanica, molekularni pristup. 4. Izd. Medicinska naklada Zagreb. 2004. 725-45.
4. Rhodanine derivatives, 10.8.2017.
<https://en.wikipedia.org/wiki/Rhodanine>
5. Rhodanine, 10.8.2017.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/rhodanine>
6. Cell culture hood, 15.8.2017.
<http://www.uvm.edu/safety/lab/biological-safety-cabinets-0>
7. Tumor invasion, 15.8.2017.
<http://physiologyonline.physiology.org/content/20/3/194>
8. Dubravka Čvorišćec i Ivana Čepelak. Štrausova Medicinska biokemija. Treće izdanje, Zagreb, 2009. 518.-519.str.
9. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. U: Sittampalam S, Coussens NP, Nelson H, Arkin M, Auld D, Austin C, i sur.

LITERATURA

Assay Guidance Manual Assay Guidance Manual, Bethesda. (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

10. Cree IA, Andreotti PE, Measurement of cytotoxicity by ATP-based luminiscence assay, in primary cell cultures and cell lines. *Toxicol In Vitro*. 1997;11(5):55
11. Chemosensitivity testing of primary human renal cell carcinoma by a tetrazolium based microculture assay (MTT); G. Mickisch, S. Fajta, G. Keilhauer, E. Schlick, R. Tschada and P. Alken. *Urol RES* (1990) 18:131-136
12. Freshny RI 1987. Culture of animal cells. A manual of basic technique. New York, Alan R. Liss Inc 796 pp
13. Vrdoljak ED, Šamija MR sur. *Klinička onkologija*, 1. Izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013, 2-9.
14. Rhodanine-based PRL-3 inhibitors blocked the migration and invasion of metastatic cancer cells. Garam Min, Su-Kyung Lee, Hye-Nan Kim, Young-Min Han, Rhan-Hee Lee, Dae Gwin Jeong, Dong Cho Han, Byoung-Mog Kwon. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 23 (2013) 3769-3774.
15. Bürker-Türk komorica. 20.8.2017.
<https://www.hemocytometer.org/hemocytometer-protocol/>
16. Antibacterial properties of 5-substituted derivatives of rhodanine -3-carboxyalkyl acids. Waldemar Tejchman, Izabela Korona-Głowniak, Anna Malm, Marek Zylewski, Piotr Suder. *Med Chem Res* (2017) 26:1316-1324
17. In vitro antibacterial activity of rhodanine derivatives against pathogenic clinical isolates. Ahmed AbdelKhalek, Charles R. Ashby, Jr, Bhargav A. Patel, Tanaji T. Talele, Mohamed N. Seleem. *PLoS ONE* 11(10): e0164227. doi: 10.1371/journal.pone.0164227; (2016)

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Ivona Spudić

Datum rođenja: 15. svibnja 1995.

Adresa: Ivana Mažuranića 24, Vinkovci

e-pošta: ivonaspudic155@gmail.com

Obrazovanje:

2010. – 2014. Opća gimnazija u Srednjoj školi Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2014. – 2017. Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Dodatna usavršavanja:

2001. – 2011. „Linguapax“, škola stranih jezika (položen FCE ispit)