

CITOTOKSIČNI UČINCI NOVIH DERIVATA 7 - KLORKINOLINA

Živković, Zorislava

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:152:152228>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

Zorislava Živković

**CITOTOKSIČNI UČINCI NOVIH
DERIVATA 7 – KLORKINOLINA**

Završni rad

Osijek, 2016.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

Zorislava Živković

**CITOTOKSIČNI UČINCI NOVIH
DERIVATA 7 – KLORKINOLINA**

Završni rad

Osijek, 2016.

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.

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

Rad ima 28 listova i 7 slika.

Veliku zahvalnost, u prvom redu dugujem mentorici prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac na predloženoj temi, pruženoj prilici i stručnom vodstvu. Veliko hvala na trudu, vremenu, stručnoj i nesebičnoj pomoći pri realizaciji rada.

Srdačno se zahvaljujem asistentici Marijani Jukić, mag. biol. na podijeljenom znanju, utrošenom vremenu i dragocjenoj pomoći. Vaši savjeti uvelike su mi olakšali izradu ovog rada.

Zahvaljujem se svim profesorima i suradnicima pri Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku na prenesenom znanju, kolegijalnosti i ugodno provedenim predavanjima.

Hvala mojim kolegama i prijateljima koji su moje studiranje učinili ljepšim i ugodnijim.

Posebno se zahvaljujem mojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi, svim odricanjima i razumijevanju. Hvala vam od srca što ste mi omogućili studiranje i što ste sve ove godine bili uz mene.

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Kinolinski spojevi	1
1.1.1. Kinolini	1
1.1.2. Derivati kinolina	2
1.2. Kultura stanica i uzgoj	2
1.2.1. Kultura stanica	2
1.2.2. Rast stanica <i>in vitro</i>	3
1.3. Genska osnova raka	4
1.3.1. Tumorske stanice	4
1.3.2. Onkogeni	5
1.3.3. Tumor supresorski geni	6
1.4. Metode određivanja citotoksičnosti	7
1.4.1. Stanični testovi citotoksičnosti	7
1.4.2. Test redukcije tetrazolijumom - MTT	7
1.4.3. Test redukcije resazurinom	8
1.4.4. Test proteaza	8
1.4.5. ATP test	9
2. CILJ	10
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Ispitivani spojevi	11
3.2. Kemikalije	11
3.3. Stanične linije	12
3.4. Kultivacija stanica <i>in vitro</i>	12
3.5. Određivanje broja živih stanica u kulturi	13

3.6. Određivanje citotoksičnosti MTT testom	14
3.7. Statistička obrada podataka	15
4. REZULTATI	16
5. RASPRAVA	19
6. ZAKLJUČAK.....	22
7. SAŽETAK.....	23
8. SUMMARY.....	24
9. LITERATURA	25
10. ŽIVOTOPIS.....	28

1. UVOD

1.1. Kinolinski spojevi

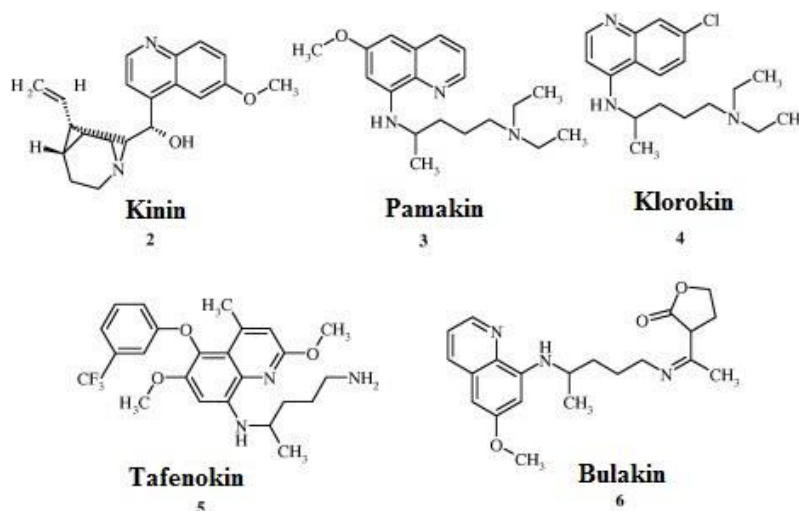
1.1.1. Kinolini

Kinolin ili 1-aza-naphthalen ili benzo[*b*]piridin su heterociklički aromatski organski spojevi s kemijskom formulom C_9H_7N (Slika 1.).



Slika 1. Strukturna formula kinolina (1).

S kiselinama tvori soli i stvara reakcije slične onima piridina i benzena. Kinolin pokazuje elektrofilne i nukleofilne reakcije supstitucije. Nije toksičan za uzimanje i udisanje. Jezgra kinolina prisutna je u nekoliko prirodnih spojeva, a farmakološki aktivne tvari pokazuju veliku biološku aktivnost (1) (Slika 2.).



Slika 2. Spojevi koji sadrže kinolinski prsten (1).

Raznolika farmakološka svojstva kinolina i njihovih derivata privukla su svjetsku pažnju u posljednjih nekoliko desetljeća zbog njihove široke pojave u prirodnim proizvodima i lijekovima (2). Tako Loaiza-Rodriguez i suradnici navode da je analizom podataka utvrđeno

kako peteročlani do šesteročlani heterociklički spojevi koji u sebi sadrže kinolinski prsten pokazuju antitumorsku aktivnost (3).

Izvedeno je nekoliko protokola za sintezu kinolinskog prstena koji se mogu modificirati i pripremiti različito supstituirani kinolin (1).

1.1.2. Derivati kinolina

Struktura kinolina ima važnu ulogu u razvoju lijekova za liječenje karcinoma budući da su derivati kinolina pokazali odlične rezultate u različitim mehanizmima djelovanja u borbi protiv nastanka tumora. Poznato je da derivati kinolina mogu djelovati antitumorski kroz razne mehanizme, kao što su zaustavljanje staničnog ciklusa u G2 fazi, inhibicija topoizomerase i inhibicija tirozin kinaze, posebno krvožilnog epitelnog faktora rasta tirozin kinaze (VEGFR TK). Literatura navodi da im se antitumorska aktivnost temelji na umetanju između parova baza i interferiranju s normalnom funkcijom enzima topoizomerase II koja sudjeluje u lomljenju i otpuštanju lanaca DNK (4).

Tako su Chan i suradnici osmislili i pripremili niz derivata kinolina i ispitali njihove toksične učinke na staničnoj kulturi ljudskih stanica raka (K562, T47D i Hep3B). Prema njihovom istraživanju spojevi 8-hidroksi-2-kinolinkarbaldehid i kiral 1,2,3,4-tetrahidrokinolin pokazali su snažan antitumorski učinak na ispitivane stanične linije (5).

Stvaranje selektivnijih i manje toksičnih antitumorskih lijekova jedan je od izazova istraživača iz područja medicinske kemije. Za nekoliko derivata kinolina dokazano je da mijenjaju višestruku rezistenciju tumorskih stanica. Jedan od lijekova je i klorokin čije su djelovanje na kasne stadije tumora proučavali Maes i suradnici u svom istraživanju te pokazali kako klorokin smanjuje tumorski rast, povećava perfuziju unutar tumora, a smanjuje hipoksiju i invaziju tumorskih stanica. Vjeruje se kako se antitumorska aktivnost klorokina temelji na blokiranju autofagije tumorskih stanica (6).

1.2. Kultura stanica i uzgoj

1.2.1. Kultura stanica

Kultura stanica podrazumijeva održavanje stanica u *in vitro* (umjetno kontroliranoj sredini) koja pogoduje njihovom rastu. Prvo uspješno kultiviranje 1907. godine izveo je Ross Harrison. Promatrajući razvoj živčanih vlakana uspio je kultivirati embrionalno tkivo žabe.

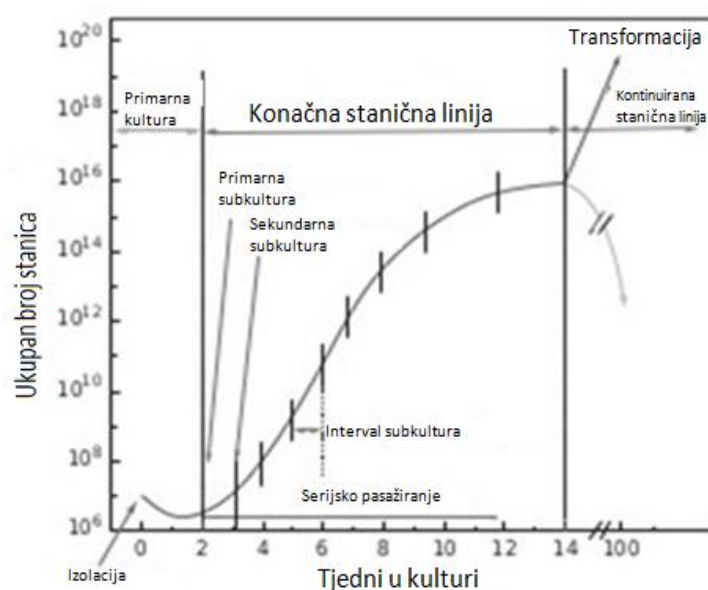
Šira uporaba te tehnike započela je tek kasnih 40-ih godina dvadesetog stoljeća. Glavni problem u ranom razdoblju tehnike kulture stanica, sve do otkrića antibiotika, bila je kontaminacija staničnih kultura. Zbog toga je za uspješan rast humanih staničnih kultura neophodno osigurati sljedeće uvjete: sterilnost, optimalnu temperaturu, koncentraciju CO₂ i pH, adekvatan sadržaj i količinu hranjivog medija i prikladne posude za kultivaciju.

Održavanje sterilnosti važna je karakteristika za uspješan rast stanica. Sterilnost se postiže izbjegavanjem kontakta sterilnog pribora ili posuđa koji dolaze u izravan dodir s uzorkom s nesterilnim priborom ili golim rukama. Osoba koja radi sa staničnim linijama mora nositi adekvatnu opremu (kutu, kapu, rukavice i masku za lice). Rad sa staničnim kulturama isključivo se treba obavljati u vertikalnim ili horizontalnim kabinetima, a pribor koji se koristi prilikom nasađivanja i održavanja stanica potrebno je sterilizirati autoklaviranjem ili koristiti sterilni jednokratni plastični pribor. Za humane stanične kulture optimalna temperatura iznosi 37 °C. Blagim povećanjem temperature povećava se i njihovo umnožavanje sve do određene granice nakon koje se stanice više ne dijele i njihov rast prestaje. Snižavanjem temperature ispod 37 °C usporava se stanični metabolizam i inhibira njihov rast. Uobičajeno se najveći broj staničnih linija održava u inkubatoru pri 5 % CO₂ i 95 % atmosferskog zraka. Padom pH-vrijednosti većina stanica počinje gubiti vijabilnost. Promjena pH uočava se promjenom boje medija, zbog toga je za optimalan rast stanica potrebno kontinuirano mijenjati medij (7).

1.2.2. Rast stanica *in vitro*

Primarne kulture stanica izolirane su iz tkiva i stavljene u kulturu. Dobivene su izolacijom iz višestaničnih organizama i obrađuju se mehanički i/ili enzimskom razgradnjom do pojedinačnih stanica. Stanice u primarnoj kulturi koje rastu u monosloju uobičajeno rastu dok ne prekriju površinu dna posudice u kojoj se nalaze. Nakon toga, stanice se mogu prenijeti iz posudice i u razrijeđenoj koncentraciji ponovno nasaditi u nove posudice. Na taj se način iz primarnih kultura subkultivacijom dobiju sekundarne kulture. Normalne stanice u kulturi ograničeno se dijele. Stanične linije koje u sebi sadrže mutaciju dijele se neograničen broj puta i nazivaju se kontinuirane stanične linije. Stanice u kulturi metabolički su aktivne i prolaze različite faze ciklusa. Rast stanica u kulturi s obzirom u kojoj je stanica fazi rasta, može biti podijeljen na sinkroni i asinkroni. U asinkronoj populaciji stanice se nalaze u različitoj fazi diobenog ciklusa. Nakon presađivanja stanice prolaze kroz 3 faze asinkronog

rasta. U prvoj fazi (faza zastoja ili odgode) odvija se proces pričvršćivanja stanica za podlogu i njihova adaptacija na nove uvjete. Stanice su u toj fazi metabolički aktivne, ali se ne razmnožavaju. Sljedeća faza je faza eksponencijalnog rasta. Tu fazu obilježava mjerenje vremena umnažanja. Stanice se aktivno umnažaju, ali pri kraju faze njihovo umnažanje opada. U trećoj fazi (stacionarnoj fazi) stanice se više ne umnažaju već ulaze u fazu mirovanja (G_0 - faza). Prebacivanjem u svježi medij iz stacionarne faze, stanice mogu ponovno ući u drugu fazu (fazu eksponencijalnog rasta) (7) (Slika 3.).



Slika 3. Razvitak stanične linije (djelomično izmijenjeno, (7)).

1.3. Genska osnova raka

1.3.1. Tumorske stanice

U normalnim stanicama proliferacija, diferencijacija i preživljavanje pojedinačne stanice u višestaničnim organizmima pažljivo su regulirani za razliku od tumorskih stanica gdje takve regulacije nema. Umjesto da na odgovarajuće načine reagiraju na signale koji kontroliraju ponašanje normalnih stanica, stanice raka nekontrolirano rastu i dijele se. Proširuju se u normalna tkiva i organe po čitavom tijelu. Na staničnoj razini nastanak raka

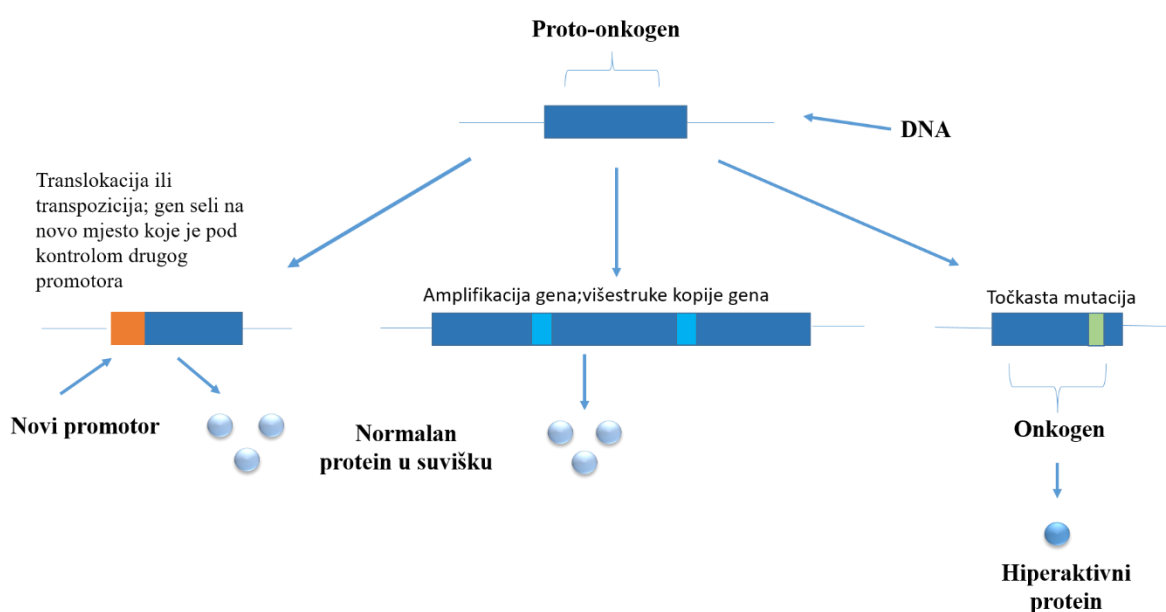
možemo promatrati kao proces koji se sastoji od više koraka i uključuje mutacije i selekciju stanica sa sve izraženijim mogućnostima proliferacije, preživljenja, širenja i metastaziranja (8). Različiti dokazi upućuju na to da je rak monoklonskog podrijetla, što znači da nastaje zloćudnom transformacijom samo jedne zdrave stanice. Sam je proces nastanka raka od zdravih stanica složen, dugotrajan i odvija se u više koraka (9). Vjeruje se da je prvi korak u tom procesu, inicijacija tumora, rezultat genetičke promjene koja dovodi do abnormalne proliferacije jedne stanice. Proliferacija stanica zatim dovodi do prekomjernog rasta monoklonske populacije tumorskih stanica. Progresija tumora nastavlja se nakupljanjem dodatnih mutacija u populaciji tumorskih stanica. Neke od njih dovode do selektivne prednosti stanice u kojoj su se pojavile i njezini potomci s vremenom postaju dominantna populacija u tumoru. Taj se proces naziva klonskom selekcijom jer novi klon tumorskih stanica nastaje zbog bržeg rasta ili nekog drugog svojstva (poput sposobnosti preživljenja, širenja ili metastaziranja) koje mu omogućuje selektivnu prednost pred drugim stanicama. U tumorima je klonska selekcija stalno prisutna, tako da oni postupno rastu sve brže i postaju sve zloćudniji (8).

1.3.2. Onkogeni

Istraživanjem tumorskih virusa pokazalo se da određeni geni (onkogeni) mogu dovesti do transformacije stanica. Na taj način omogućio se prvi uvid u molekularne osnove raka. Onkogeni su promijenjena inačica normalnih staničnih gena koje nazivamo proto-onkogenima i koji sudjeluju u regulaciji normalne stanične proliferacije i diferencijacije (9). Virusni onkogeni najprije su nađeni u Rousovom sarkomskom virusu koji transformira pileće embrije u kulturi i dovodi do nastanka sarkoma (8).

Proto-onkogeni su uključeni u prijenos signala u stanici. Putovi prijenosa signala u stanici način su na koje se dioba, diferencijacija, stanični rast i preživljenje usklađuje u okolišu stanice. Stanica prima signale (u obliku malih molekula, čimbenika rasta) koji se najčešće vežu za receptore na membrani stanice i aktivira se. Navedeni proces uzrokuje prijenos signala putem drugih molekula u stanici sve do transkripcijskih čimbenika koji potiču ekspresiju određenih gena. Fosforilacija proteina čest je način prijenosa signala u stanici. Za mnoge se proto-onkogene pokazalo da su geni za tirozin-kinaze, proteine koji fosforiliziraju tirozinske ogranke drugih proteina. Ako se protoonkogeni promijene tako da oni sami ili

njihovi proteinski produkti postanu aktivniji, nastaju onkogeni. Navedeni proces naziva se aktivacijom onkogenena. Aktivacijom onkogenena potiče se nekontrolirani rast i dioba stanice što za posljedicu uzrokuje nastanak raka. Nekoliko je mogućih putova aktivacije. Onkogen se može aktivirati zbog mutacija u samom genu, zbog povećanja broja kopija gena (genske amplifikacije) ili kao posljedica premještanja jednog segmenta kromosoma na drugi kromosom (translokacije kromosoma) (Slika 4.). Zbog promjene u transkripciji onkogenena ili u strukturi samog proteina, svi navedeni načini aktivacije dovode do pojačane aktivnosti odgovarajućeg onkoproteina (9).



Slika 4. Proto-onkogeni postaju onkogeni – translokacijom, amplifikacijom ili točkastom mutacijom

1.3.3. Tumor supresorski geni

Geni čiji gubitak ili njihova aktivacija dovodi do nastanka raka nazvani su tumor supresorskim genima. Svaki od njih obavlja različite funkcije u stanici. Kako bi se očitovao njihov učinak, potrebna je inaktivacija oba alela i zbog toga je njihov učinak uglavnom recesivan. Inaktivaciju tumor supresorskih gena uzrokuju mutacije ali i epigenetski čimbenici.

Prvi otkriven tumor supresorski gen bio je Rb, gen povezan s retinoblastomom. Tumor supresorski gen p53 često je mutiran u različitim tipovima raka u ljudi. Uslijed oštećenja

stanične deoksiribonukleinske kiseline (DNK) aktivira se proteinski produkt gena p53, transkripcijski čimbenik p53. Aktivirani p53 zaustavlja stanicu u određenoj fazi staničnog ciklusa, aktivira popravak oštećenja DNK i potiče apoptozu. Ako se oštećenja ne mogu popraviti, stanica biva uklonjena apoptozom. Gen p53 može nedostajati u stanici ili biti inaktivan što povećava vjerojatnost nastanka raka jer tada u diobu ulaze i stanice s oštećenom DNK. (9)

1.4. Metode određivanja citotoksičnosti

1.4.1. Stanični testovi citotoksičnosti

Stanični testovi često se koriste za probir spojeva koji imaju učinak na proliferaciju stanica ili pokazuju izravan citotoksičan učinak koji na kraju može dovesti do smrti stanice. Koriste se i za mjerenje vezanja receptora i razine prijenosa signala. Određivanje citotoksičnosti uključuje metode redukcije tetrazolijumom, redukciju resazurinom, markere proteaza i detekciju ATP-a (adenozin trifosfat). Bez obzira na vrstu testa koji se primjenjuje, važno je odrediti koliko živućih stanica ostane do kraja procesa (10). Ti testovi trebali bi biti objektivni, kvantitativni, reproducibilni i imati mogućnost razvitka automatizacije (11).

Redukcija tetrazolijumom, redukcija resazurinom i test aktivnosti proteaza upotrebljava komponente glavnog metabolizma i enzimatske aktivnosti kao marker vijabilnosti stanica. Svi navedeni testovi zahtijevaju inkubaciju reagensa sa živućim stanicama pretvarajući stvoreni supstrat u obojeni ili fluorescentni produkt koji se detektira pomoću optičkog čitača. Inkubacija supstrata vijabilnim stanicama rezultira stvaranjem signala koji je proporcionalan broju živućih stanica. Smrću stanice gube sposobnost stvaranja produkta.

1.4.2. Test redukcije tetrazolijumom - MTT

Mnogi spojevi koji sadrže tetrazolijum koriste se za detekciju vijabilnih stanica. Najčešće korišteni spojevi uključuju – MTT, MTS, XTT i WST. MTT test bio je prvi homogeni test vijabilnosti stanica razvijen u formatu za 96 jažica prikladan za veći broj uzoraka. Žive stanice s aktivnim metabolizmom staničnih dehidrogenaza pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj, formazan s maksimumom apsorbancije na 570 nm. Proces nastanka formazana nije dovoljno razjašnjen, ali pretpostavlja se da uključuje formaciju s NADH-om

(nikotinamid adenin dinukleotid). MTT test mjeri mitohondrijsku aktivnost. Kada stanica umre, izgubi sposobnost pretvaranja MTT-a u formazan. Količina nastalog formazana očitava se na optičkom čitaču na 570 nm, a količina signala ovisi o nekoliko parametara. Ti parametri uključuju koncentraciju MTT-a, dužinu razdoblja inkubacije, broj živućih stanica i njihovu metaboličku aktivnost (10).

1.4.3. Test redukcije resazurinom

Resazurin je redoks-osjetljiva boja koja se koristi za određivanje broja živućih stanica (10). Otapanjem u fiziološkom puferu dodaje se izravno na stanice u kulturi. Žive, metabolički aktivne, stanice reduciraju resazurin u fluorescentni ružičasto obojen resorufin. Dodavanje intermedijera kao primatelja elektrona može ubrzati stvaranje signala. Količina stvorenog resorufina očitava se pomoću fluorometra za očitavanje mikrotitarskih pločica. Drugi način je određivanje promjene apsorbancije, no glavni nedostatak je smanjena osjetljivost u odnosu na određivanje fluorescence. Glavne prednosti te metode su pristupačna cijena, homogeni format i osjetljivost veća od testova s tetrazolijumom. Testovi s rezazurinom mogu se kombinirati i s ostalim metodama, kao što je mjerenje aktivnosti kaspaza gdje se dobiva više podataka o citotoksičnom učinku spojeva na stanice.

Glavni nedostaci tih testova redukcije s tetrazolijumom i resazuriom su dužina njihove inkubacije (zahtijevaju 1 - 4 h inkubacije kako bi vijabilne stanice stvorile obojene ili fluorescentne produkte) i sama citotoksičnost tih spojeva na vijabilne stanice (12).

1.4.4. Test proteaza

Mjerenje proteazne aktivnosti u živim stanicama pokazalo se kao dobar marker vijabilnosti stanica. Fluorogena proteaza (GF – AFC) supstrat je koji se uvodi u stanice kako bi se ispitala njihova vijabilnost. Nedavno je razvijena za selektivno detektiranje proteazne aktivnosti živućih stanica. GF – AFC prodire u žive stanice gdje citoplazmatska aminopeptidaza aktivno uklanja aminokiseline glicin i fenilalanin stvarajući AFC (aminofluorocoumarin) i fluorescentni signal proporcionalan broju živućih stanica. Nakon što stanica umre, aktivnost proteaze ubrzano slabi i nestaje, čime protezna aktivnost postaje selektivni marker za vijabilnost stanica. Jedna od prednosti te metode je netoksičnost za

kulturu stanica. Upravo netoksičnost tog spoja stvara idealnog kandidata za primjenu s drugim testovima (10).

1.4.5. ATP test

Detekcija ATP-a postala je zlatni standard u otkrivanju vijabilnosti stanica jer je razina ATP-a u stanici rezultirana vijabilnošću stanice. Proces umiranja stanice rezultira gubitkom integriteta membrane, a samim time i gubitkom sposobnosti sinteze ATP-a zajedno s opadanjem citoplazmatskog ATP-a zbog djelovanja ATP-aze. Mjerenje ATP-a u ovom testu postiže se korištenjem svojstva mutiranog enzima luciferaze koji stvara luminiscentni signal (12). Reagens za detekciju ATP-a sadrži smjesu za razgradnju stanica, inhibitore ATP-aze koji će stabilizirati ATP koji se otpušta iz liziranih stanica, luciferin kao supstrat i stabilnu luciferazu koja katalizira reakciju koja završava stvaranjem fotona svjetla. Prednost tog testa je brzina izvođenja, visoka osjetljivost i smanjena sklonost artefaktima (10).

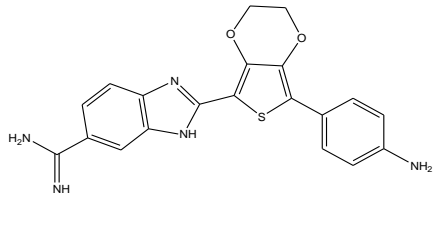
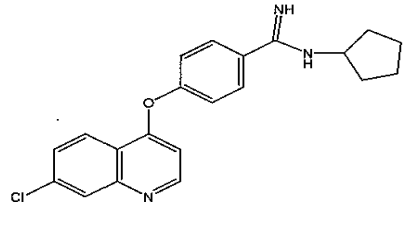
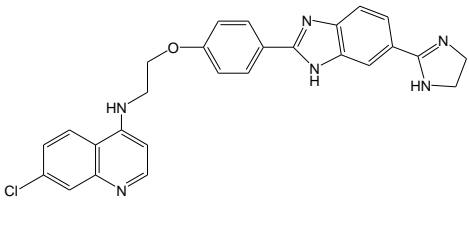
2. CILJ

1. Ispitati utjecaj derivata novih 7- klorkinolina na rast normalnih stanica i tumorskih stanica u uvjetima *in vitro*.
2. Ustanoviti povezanost među strukturom i koncentracijom novih spojeva i inhibicijom rasta.
3. Definirati koji od ispitivanih kemijskih spojeva ima najveću učinkovitost na rast tumorskih stanica, a istovremeno ne djeluje inhibitory na rast kulture epitelnih stanica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitivani spojevi

Derivati 7-klorkinolina pripremljeni su u Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu (Slika 5.). Za potrebe *in vitro* istraživanja, derivati 7-klorkinolina otopljeni su u DMSO-u (dimetil sulfoksidu) kao koncentrirane 10^{-2} mol/dm³ otopine. Nekoliko dana prije primjene pripremljene su radne otopine derivata čija su završna razrjeđenja bila: 10^{-4} i 10^{-5} mol/dm³. Razrjeđenja su rađena u sterilnoj destiliranoj vodi pri sobnoj temperaturi.

		
$C_{20}H_{7}N_{5}O_{2}S \times 2HCl \times 2.5H_{2}O =$ MB-103	$C_{21}H_{20}ClN_{3}O \times 2HCl \times 2H_{2}O =$ MB-127	$C_{27}H_{23}ClN_{6}O \times 3HCl \times 2.5H_{2}O =$ MB-147

Slika 5. Strukturne formule derivata 7-klorkinolina

3.2. Kemikalije

- Dulbecco modificirani Eagleov medij (DMEM), Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640) Lonza (Basel, Švicarska)
- 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 sulfat (SDS), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- Dimetil sulfoksid (DMSO); Acros organics (New Jersey, SAD)

3.3. Stanične linije

U svrhu istraživanja citotoksičan učinak derivata 7-klorkinolina ispitan je na humanim i jednoj normalnoj psećoj staničnoj liniji.

Humane tumorske stanične linije:

- HeLa (adenokarcinom vrata maternice)
- CaCo-2 (adenokarcinom debelog crijeva)
- K562 (kronična mijeloidna leukemija)

Normalne stanice:

- MDCK-1 (normalna epitelna stanica bubrega psa) između pasaže 29 - 30

3.4. Kultivacija stanica *in vitro*

Kultivacija adherentnih i suspenzijskih stanica odvija se u inkubatoru s kontroliranom atmosferom uz 5 % CO₂ i temperaturu od 37 °C u bočicama za uzgoj stanica površine 25 cm². Stanične linije uzgajane su u medijima obogaćenim 10 % fetalnim goveđim serumom (FBS).

Za održavanje adherentnih staničnih linija (HeLa, CaCo-2 i MDCK-1) upotrebljava se DMEM medij koji sadrži dodatak 10 % temperaturno inaktiviranog FBS-a, 2 mM L-glutamina i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomycin antibiotika. Svi navedeni sastojci osim penicilin/streptomycin antibiotika sastavni su dio DMEM medija za pokus.

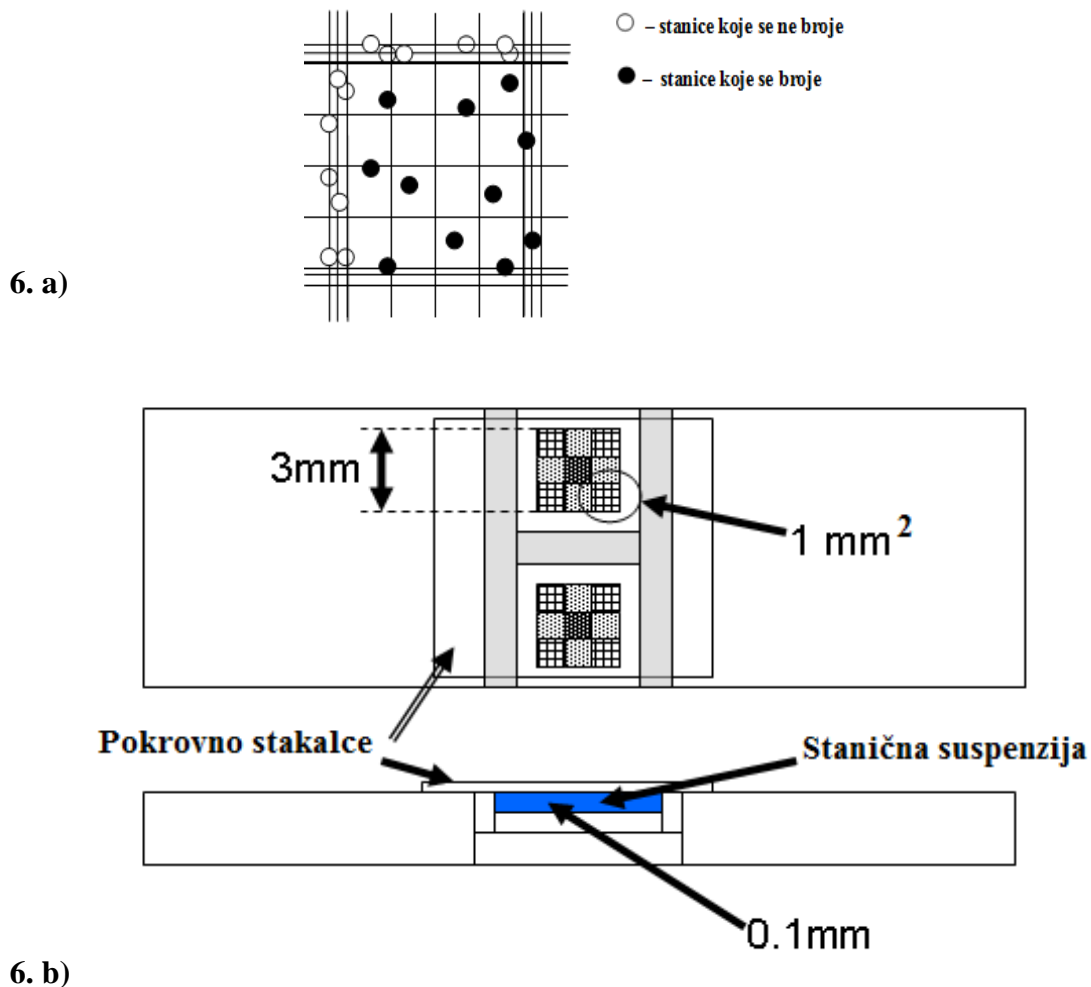
RPMI medij koristi se za održavanje suspenzijske K562 stanične linije i u sebi sadrži dodatak 10 % temperaturno inaktiviranog FBS-a, 2 mM L-glutamina, 1 mM natrij-piruvata, 10 mM HEPES-a i 100 U/0,1 mg penicilin /streptomycin antibiotika. RPMI medij prikladan za pokus uz prikazane sastojke ne sadrži penicilin/streptomycin antibiotik.

Za održavanje i presađivanje adherentnih (HeLa, CaCo-2 i MDCK-1) i suspenzijske K562 stanica postupak se razlikuje. Adherentne stanične linije ispiru se pomoću 2 - 5 mL PBS-a kako bi se uklonio zaostali medij. Odvajanje stanica od površine postiže se

dodavanjem 1,5 mL tripsina i inkubaciji u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Nakon odvajanja stanica od podloge stanice se pakupe svježim medijem za održavanje. Stanice u suspenziji održavane su razrjeđivanjem ili oduzimanjem dijela volumena ovisno o gustoći stanica u bočici.

3.5. Određivanje broja živih stanica u kulturi

Za određivanje broja stanica potrebno je iz prethodno ponovno suspendiranih stanica oduzeti 50 µL suspenzije i prenijeti je u jažicu. U jažicu se zatim dodaje 100 µL tripan plavila. Stanična suspenzija sa bojom nanosi se na Bürker-Türkovu komoricu (Slika 6.). Pomoću invertnog mikroskopa (Zeiss Axiovert 25, Njemačka) odredi se broj stanica. Mrtve stanice se oboje jer boja lako prolazi kroz membranu narušenog integriteta.



Slika 6. a) Mikroskopski prikaz Bürker-Türk komorice, b) Bürker-Türk komorica (preuzeto i prilagođeno)

Broj živućih stanica određen je formulom:

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

Gdje je:

N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – faktor razrjeđenja

3.6. Određivanje citotoksičnosti MTT testom

MTT test rabi se za ispitivanje citotoksičnog učinka određenih tvari i proliferacije u *in vitro* uvjetima. Mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza metabolički aktivnih stanica reducira tetrazolijeve soli (3-(4, 5-dimetiltiazol-2)-2, 5-difeniltetrazolium bromid) što rezultira stvaranjem tamnoljubičastih kristala formazana koji se nakuplja u stanicama. Količina nastalog formazana proporcionalna je broju vijabilnih stanica. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski korištenjem automatskog čitača mikropločica (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA). Intenzitet obojenja očitava se na valnoj duljini od 540 nm do 570 nm.

Postupak: Adherentne stanične linije nasađane su na mikrotitarske pločice (96 jažica) u koncentraciji 2×10^4 st/mL u volumenu od 200 μ L (180 μ L stanične suspenzije i 20 μ L derivata 7-klorkinolina) u svaku jažicu. Stanice su inkubirane u CO₂ inkubatoru preko noći kako bi se prihvatile za podlogu te tretirane s 20 μ L derivata 7-klorkinolina u finalnim koncentracijama od 10^{-4} i 10^{-5} mol/dm³. Poslije inkubacije od 72 h, medij je uklonjen sa stanica, a stanice su tretirane 1X MTT/PBS-om u koncentraciji od 5 mg/mL. Stanice pod tretmanom inkubirane su u CO₂ inkubatoru 4 h. Kako bi se nastali formazanski kristali otopili nakon inkubacije, dodan je DMSO, a zatim se ploča lagano tresla na tresilici (u trajanju od 20 min). Rezultati su očitani na mikročitaču pločica pri valnoj duljini od 570 nm.

Suspenzijske stanice uzgajane su na mikrotitarskim pločicama (96 jažica) s okruglim dnom u volumenu u koncentraciji 1×10^5 st/mL u volumenu 100 μ L suspenzije po jažici (90 μ L suspenzije i 10 μ L derivata 7-klorkinolina). U jažice su isti dan nasađivanja dodani

ispitivani derivati 7-klorkinolina u konačnim koncentracijama od 10^{-4} i 10^{-5} mol/dm³ i pločica je inkubirana kroz 72 h. Istekom vremena od 72 h na ispitivane stanice dodano je 10 μL 10 x MTT, a potom je uslijedilo ponovno inkubiranje u trajanju od 4 h. Dodavanjem 100 μL 10 % SDS-a u 0.01 M HCl-a inkubacija je nastavljena sve do sljedećeg dana. Sljedećeg dana rezultati su očitani na mikročitaču pri valnoj duljini od 570 nm.

Na temelju očitanih rezultata apsorbancije, kontrola i pozadine (eng. background) određen je postotak preživljenja prema formuli:

$$\text{preživljenje [\%]} = \frac{A_{\text{tretman}} - A_{\text{background}}}{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{background}}} \cdot 100$$

*Pozadina*_{adherentne stanice} = MTT + DMSO

*Pozadina*_{stanice u suspenziji} = medij + MTT + 10 % SDS

3.7. Statistička obrada podataka

Biološki eksperimenti citotoksičnosti obavljani su u triplikatu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost (\bar{X}) i standardna devijacija ($\pm SD$) za tri neovisna mjerenja. Normalnost raspodjele podataka dobivenih testovima citotoksičnosti određena je Kolmogorov-Smirnovim testom. Statistička analiza podataka obavila se pomoću statističkog programa STATISTICA 11.0 za Windows operativne sustave.

4. REZULTATI

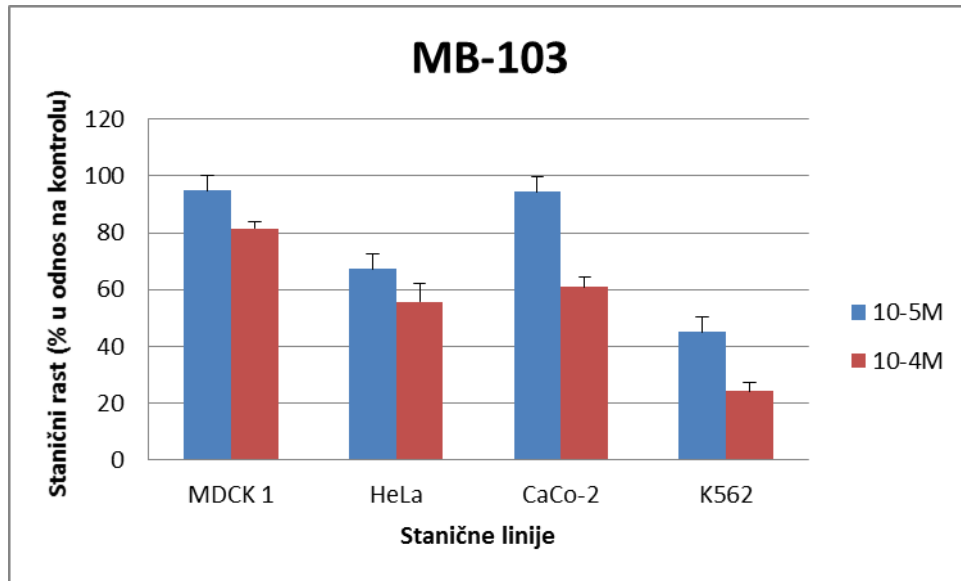
Citotoksičan učinak tri derivata 7-klorkinolina (MB-103, MB-127 i MB-147) istražen je na četiri stanične linije (HeLa, CaCo-2, K562 i MDCK-1). Rezultati ispitivanja citotoksičnog učinka derivata prikazani su na slikama od 7. a) do 7. c). Stanice su bile izložene spojevima MB-103, MB-127 i MB-147 u koncentracijama od 10^{-4} i 10^{-5} M (mol/dm^3). Rezultati prikazuju postotak staničnog rasta navedenih staničnih linija u odnosu na kontrolu.

Profil djelovanja derivata MB-103 na MDCK-1 sličan je kao i na CaCo-2 pri koncentraciji od 10^{-5} M. Veću otpornost MDCK-1 stanice pokazuju pri koncentraciji od 10^{-4} M u odnosu na stanični rast ostalih testiranih staničnih linija. MB-103 pokazuje najveću inhibicijsku djelatnost na K562 staničnoj liniji u koncentraciji od 10^{-5} i 10^{-4} M (Slika 7. a)).

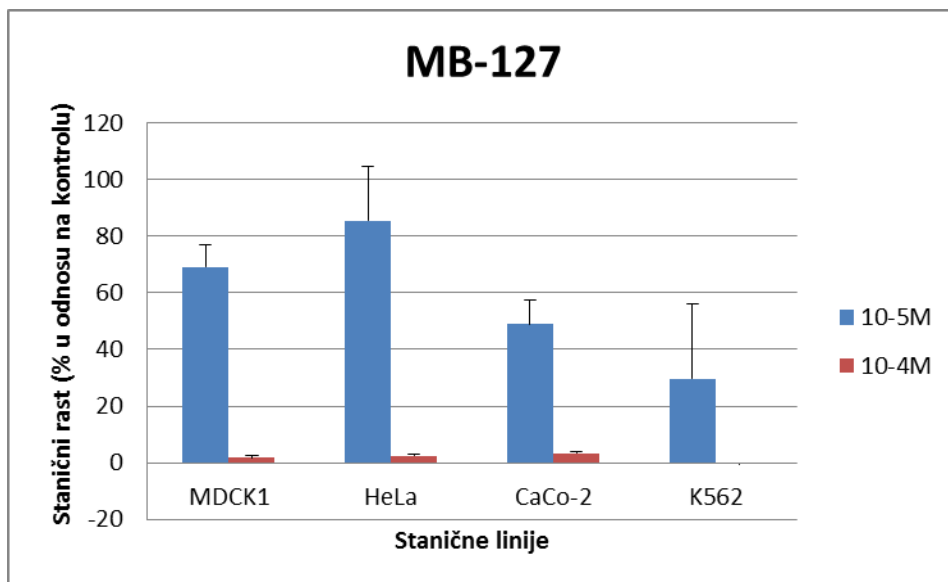
Pri koncentraciji od 10^{-5} M MB-127 pokazuje najmanji inhibični učinak na HeLa stanice, dok je pri istoj koncentraciji stanični rast CaCo-2 i K562 stanica inhibiran za oko 50 %. Naj snažniju aktivnost pokazuje derivat kinolina MB-127 pri koncentraciji od 10^{-4} M gdje je stanični rast na svim testiranim staničnim linijama inhibiran za 95 % (Slika 7. b)).

K562 stanična linija pokazuje veću osjetljivost u odnosu na ostale tretirane stanice s MB-147 pri obje testne koncentracije gdje je inhibicija rasta stanica veća od 50 %. Kod HeLa i CaCo-2 stanica tretiranih s MB-147, stanična inhibicija povećava se za oko 20 % pri koncentraciji od 10^{-4} M. Značajan utjecaj MB-147 derivata vidljiv je na MDCK-1 staničnu liniju gdje je inhibicija rasta viša od 40 % za obje testne koncentracije (Slika 7. c)).

Rezultati

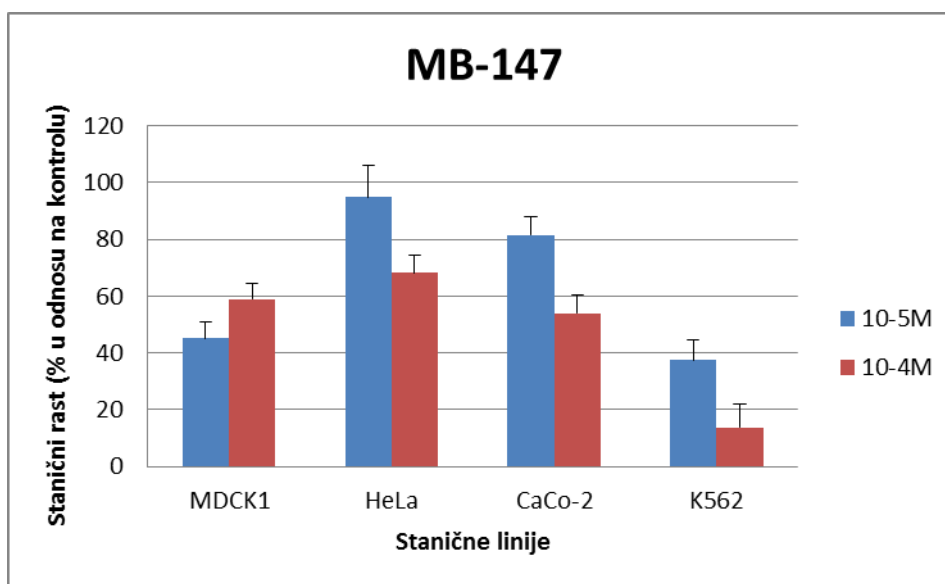


7. a)



7. b)

Rezultati



7. c)

Slika 7: Citotoksični učinak kinolinskih derivata. Sve istraživane stanične linije izložene su djelovanju derivata a) MB-103, b) MB-127 i c) MB-147 kroz 72 sata pri koncentracijama od 10⁻⁴ M i 10⁻⁵ M. Njihov citotoksičan učinak određen je MTT testom u tri nezavisna vremenska ponavljanja u triplikatu

Na temelju dobivenih rezultata testom citotoksičnosti uočljive su razlike u djelovanju triju kinolinskih derivata na testirane stanične linije. Prikazani derivati pokazuju različite razine toksičnosti na staničnim linijama ovisno o njihovoj strukturi i koncentraciji primijenjenog spoja. Na slici 7. b) jasno je vidljivo kako spoj MB-127 pokazuje najjaču učinkovitost na sve četiri testirane stanične linije pri koncentraciji od 10⁻⁴ M. Najveću otpornost na djelovanje MB-127 pokazuju HeLa stanice s postotkom preživljenja većim od 80 % pri koncentraciji od 10⁻⁵ M.

5. RASPRAVA

Rak je jedan od ključnih problema u svijetu i, nakon krvožilnih bolesti, drugi po redu uzročnik smrtnosti (14). U posljednjih nekoliko desetljeća intenzivno se istražuje i ispituje učinak različitih kemijskih spojeva s ciljem pronalaska učinkovitijih i selektivnijih lijekova u borbi protiv karcinoma. U svrhu otkrivanja komponenti s mogućim učincima inhibicije staničnog rasta, četiri su stanične linije tretirane derivatima 7-klorkinolina. Zbog njihove iznimne biološke i farmakološke aktivnosti, kinolini i njihovi derivati postali su jedni od najpopularnijih N-heteroaromatičnih spojeva koji se često koriste kao ključna komponenta u proizvodnji lijekova. Kinolonski prsten učestalo je korišten kao dio mnogih sintetiziranih spojeva s različitim farmakološkim svojstvima. Derivati kinolina pokazali su se uspješnima kao kemoterapeutici i citotoksični agensi. Učinkovitost im se očituje u inhibiciji proliferacije tumorskih stanica, angiogeneze i remećenju metastaziranja (15).

Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je kako derivati 7-klorkinolina pokazuju različito citotoksično djelovanje na testirane stanične linije. Rezultati pokazuju utjecaj derivata na smanjen postotak staničnog rasta svih staničnih linija. Učinak derivata ovisan je o vrsti stanične linije i koncentraciji pri kojoj je bila tretirana. Derivat s najjačim inhibicijskim učinkom pokazao se MB-127 koji pri najvišoj koncentraciji ima izraženu citotoksičnost na sve testirane stanične linije.

Kako navode Martirosyan i suradnici, derivati klorkinolina svojim djelovanjem uzrokuju inhibiciju staničnog rasta zbog nakupljanja kapljica lipida u tumorskim stanicama. Lipidi djeluju kao fenotipski marker diferencijacije. Djelovanje derivata uzrokuje i gubitak ekspresije Ki67 antigena, ključnog markera za izlazak oštećene stanice iz staničnog ciklusa u G0 fazi. Mehanizam aktivacije kinolina koji uzrokuju inhibiciju proliferacije uključuje i jaku supresiju E2F2 proteina što za posljedicu ima inhibiciju rasta sprječavanjem napredovanja staničnog ciklusa i poticanjem diferencijacije stvaranjem okoliša dostupnog za stanični rast (16).

Najučinkovitiji model tumorske terapije u današnje vrijeme uključuje uporabu kemoterapeutskih agensa koji stupaju u interakciju s DNK i ciljano djeluju na nju. Jedne od njih su interkalatorne molekule koje se reverzibilno ili ireverzibilno vežu na DNK upućujući na izravnu povezanost između njihove interakcije s makromolekulama i terapijskog učinka. Interkalacija molekula dovodi do inhibicije topoizomeraze, zaustavljanja staničnog ciklusa i

apoptoze. RohitKumar i suradnici ispitivali su učinak derivata kinolina (BPTQ) na leukemijske stanice praćenjem napredovanja staničnog ciklusa. Derivati kinolina kao interkalatorne molekule uzrokuju zastoj u S i G2 M fazi staničnog ciklusa. Takav zastoj otvaranjem mitohondrijskih polupropusnih tranzicijskih pora simultano inducira apoptozu mitohondrijskim putem. Obitelj Bcr-2 proteina djeluju kao apoptotski signali izazivajući takvu disfunkciju mitohondrija. Studija je pokazala kako BPTQ inducira apoptozu u humanim leukemijskim stanicama povećanjem omjera Bax - Bcl 2 (BCL2 Associated X Protein), a time i supresira mitohondrijski membranski potencijal. Aktivacija kapsaza 9 i 3 znak je započinjanja apoptoze (17).

Karcinomi epitelnih stanica pokazali su se manje osjetljivima u odnosu na derivate kinolina. Jedna studija pokazala je kako neki od derivata kinolina (hydroxyquinoline benzylamin) nisu dovoljno reaktivni da bi stvarali kovalentne produkte s molekulama DNK. Čini se da je njihova antitumorska aktivnost snažno povezana sa sposobnosti stvaranja relativno stabilnih i umjereno reaktivnih kinon metidin intermedijera, no zbog elektrofilnosti i snižene reaktivnosti ne reagiraju s DNK. Usprkos niskoj reaktivnosti, kinon metidi u određenoj mjeri aktiviraju nekoliko puteva apoptoze i inhibiciju proliferacije stanica u tumorskim stanicama glioblastoma. Reagirajući s tiolima N-benzil bis 8-hidroksikinolini skloni su utjecati na svojstva molekula koja sadrže tiol što može dovesti do abnormalne promjene strukture proteina koji nosi cisteinske ostatke. Takvi abnormalni proteini zadržavat će se i nakupljati u endoplazmatskom retikulumu i uzrokovati oksidativni stres što povećava rizik od smrti stanice (18).

Stjecanje rezistencije na lijekove (MDR - multi drug resistance) i dalje predstavlja problem u učinkovitoj borbi protiv karcinoma. Prema dosadašnjim istraživanjima u molekularnoj farmakologiji i staničnoj biologiji, pretpostavlja se kako je rezistencija rezultat količine lijeka ili aktivacije. Rezistencija može nastati i zbog promjene u ciljanim enzimima uključujući i topoizomeraze, aktivaciju enzimatskih sustava djelotvornih u popravku oštećene DNK. Rezistencija na antitumorske lijekove često se povezuje s ekspresijom antitumorskog efluks proteina MDR1 kodiranog MDR1 genom. Njemu srodni proteini (MRP1 i MRP2 - resistance-associated protein 1 i 2, BCRP - breast cancer resistance protein) aktivno izbacuju funkcionalno i strukturno nevezane lijekove iz tumorskih stanica što uzrokuje njihovo nakupljanje izvan stanica i smanjenje djelovanja u stanici (19).

Rasprava

Kinolini, posebice njihovi derivati pokazali su značajan antiproliferativan učinak na širokom spektru različitih tumora, ciljano djelujući na različite signalne i enzimatske puteve. Spojevi koji sadrže kinolinski heterociklički prsten mogu biti potencijalno učinkoviti lijekovi u borbi protiv karcinoma. To važno svojstvo kinolina i njegovih derivata, klorkinolina, potrebno je iskoristiti daljnjim ispitivanjem mehanizama njihova djelovanja. Ciljanje specifičnih signalnih i enzimatskih puteva ključan je dio u otkrivanju manje toksičnih lijekova i usmjerene antitumorske terapije (20).

6. ZAKLJUČAK

- Uočljiv je citotoksičan učinak svih testiranih derivata na stanične linije, gdje je veća citotoksičnost evidentirana pri većim koncentracijama ispitivanih kemijskih spojeva.
- Najveću citotoksičnost pokazuje spoj MB-127 u koncentraciji od $10^{-4}M$ na svim staničnim linijama.
- Najosjetljivija stanična linija je K562 koja pokazuje znatno snižen stanični rast pod utjecajem svih testiranih derivata 7-klorkinolina.
- Stanične linije MDCK-1 i CaCo-2 pokazuju veliku otpornost na djelovanje derivata MB-103.
- Derivat MB-147 pokazao je najmanji citotoksični utjecaj na staničnu liniju HeLa.

7. SAŽETAK

Uvod: Zbog njihove biološke i farmakološke aktivnosti, kinolini i njihovi derivati, klorkinolini, postali su jedni od najpopularnijih N-heteroaromatičnih spojeva koji se često koriste kao ključna komponenta u proizvodnji lijekova. Derivati kinolina pokazali su se uspješnima kao kemoterapeutici i citotoksični agensi. Učinkovitost im se očituje u inhibiciji proliferacije tumorskih stanica, angiogeneze i remećenju metastaziranja.

Ciljevi istraživanja: Cilj rada bio je odrediti citotoksičan učinak derivata 7-klorkinolina na panelu humanih tumorskih stanica i jednoj normalnoj psećoj staničnoj liniji.

Materijali i metode: Derivati su pripremljeni u Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta u Zagreb. Za potrebe *in vitro* istraživanja derivati 7-klorkinolina otopljeni su u DMSO-u (dimetil sulfoksidu) kao koncentrirane 10^{-2} mol/dm³ otopine. Kultivacija stanica odvijala se u inkubatoru s kontroliranom atmosferom uz 5 % CO₂ i temperaturom od 37 °C u bočicama za uzgoj stanica površine 25 cm². Za održavanje adherentnih staničnih linija (HeLa, CaCo-2 i MDCK-1) upotrebljava se DMEM medij. RPMI medij koristio se za održavanje suspenzijske K562 stanične linije. Inhibitorni učinak određen je MTT testom.

Rezultati: Proliferaciju testiranih stanica u najvećoj mjeri inhibirao je derivat MB-127 pri najvišoj koncentraciji. Derivat MB-103 je najmanji citotoksičan učinak imao na MDCK-1 i CaCo-2 stanične linije. Stanični rast linije K562 pokazao se kao najosjetljiviji na učinke derivata 7-klorkinolina.

Zaključak: Derivati klorkinolina smanjuju stanični rast tumorskih stanica u ovisnosti o koncentraciji i tipu stanica. Selektivno djelovanje derivata na normalne stanice nije uočeno.

Ključne riječi: klorkinolini, citotoksični učinak, kultura stanica, tumorske stanice

8. SUMMARY

Introduction: Due to their biological and pharmacological activity, quinolines and chloroquinoline derivatives have become some of the most popular N-heteroaromatic compounds frequently used as a key component in drugs production. Quinoline derivatives have proved to be efficient as chemotherapeutic and cytotoxic agents. They inhibit proliferation of tumor cells, angiogenesis and metastatic progression.

Objectives: The aim was to determine the cytotoxic effect of 7-chloroquinoline derivatives on a panel of human tumor cells and one normal canine cell line.

Materials and methods: Derivatives were prepared at the Faculty of Veterinary Medicine in Zagreb, Department of Chemistry and Biochemistry. For *in vitro* analysis, 7-chloroquinoline derivatives were dissolved in DMSO (dimethyl sulfoxide) as 10^{-2} mol/dm³ solutions. The cells were grown in 25 cm² flasks, in a CO₂ incubator at 37°C with 5% CO₂. For maintaining the adherent cell lines (HeLa, CaCo-2 i MDCK 1) a DMEM medium was used. K562 cell line was maintained in RPMI medium. The inhibitory effect was determined by the MTT assay.

Results: Proliferation of the tested cells was significantly inhibited by the derivative MB-127 at the highest concentration. The derivative MB-103 had the slightest cytotoxic effect against MDCK and CaCo-2 cell lines. The cell growth of K562 line proved to be the most sensitive to the effects of the 7-chloroquinoline.

Conclusion: Chloroquinoline derivatives reduce tumor cells growth depending on the concentration and the type of cells. The selective effect of derivatives on normal cells was not observed.

Keywords: chloroquinolines, cytotoxic effect, cell culture, tumor cells

9. LITERATURA

1. Marella A, Tanwar OP, Saha R, Ali MR, Srivastava S, Akhter M, i sur. Quinoline: A versatile heterocyclic. Saudi Pharmaceutical Journal, 2013; 21, 1–12.
2. Bondock S, Gieman H, El-Shafei A. Selective synthesis, structural studies and antitumor evaluation of some novel unsymmetrical 1-hetaryl-4-(2-chloroquinolin-3-yl)azines. Journal of Saudi Chemical Society 2015.
3. Loaiza-Rodriguez P, Quintero A, Rodriguez-Sotres R, Solano JD, Lira-Rocha A. Synthesis and evaluation of 9-anilinothiazolo[5,4-b]quinoline derivatives as potential antitumorals. Eur. J. Med. Chem. 39. 2004;5–10.
4. Ghorab MM, Alsaid MS, Anti-breast cancer activity of some novel quinoline derivatives. Acta Pharm. 65. 2015;271–283.
5. Chan SH, Chui CH, Chan SW, Kok SH, Chan D, Tsoi MY, i sur. Synthesis of 8-hydroxyquinoline derivatives as novel antitumor agents. ACS Med Chem Lett. 2012 Dec 20;4(2):170-4.
6. Maes H, Kuchino A, Peric A, Moens S, Nys K, DeBock, i sur, Tumor Vessel Normalization by Chloroquine Independent of Autophagy. Cancer Cell. 2014;26(2):190-206.
7. Freshny RI 1987. Culture of animal cells. A manual of basic technique. New York, Alan R. Liss Inc 796 pp

Literatura

8. Cooper GM, Hausman RE. Stanica, molekularni pristup. 4. izd. Medicinska naklada Zagreb. 2004. 725-45.
9. Vrdoljak ED, Šamija MR i sur. Klinička onkologija. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013, 2-9.
10. 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. Assay Guidance Manual Assay Guidance Manual, Bethesda. (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
11. Cree IA, Andreotti PE, Measurement of cytotoxicity by ATP-based luminescence assay in primary cell cultures and cell lines. Toxicol In Vitro. 1997;11(5):553-6.
12. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Cytotoxicity Testing: Measuring Viable Cells, Dead Cells, and Detecting Mechanism of Cell Death, Methods Mol Biol. 2011;740:103-14.
13. Web 1: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/technical/ccp/cellcounting.aspx>
14. Ghorab MM, Alsaid MS, Al-Dosari MS, Ragab FA, Al-Mishari AA, Almoqbil AN. Novel quinolines carrying pyridine, thienopyridine, isoquinoline, thiazolidine, thiazole and thiophene moieties as potential anticancer agents. Acta Pharm. 66. 2016;2:155-171.
15. Chawla A, Chawla P, Kuldeep K, Mansimran S, Kuldeep S. A review: Chemistry of Antimicrobial and Anticancer Quinolines. Canadian open Pharmacy Journal, Vol 1, No.1 2014;1-12.

16. Martirosyan AR, Rahim-Bata R, Freeman AB, Clarke CD, Howard RL, Strobl JS. Differentiation-inducing quinolines as experimental breast cancer agents in the MCF-7 human cancer cell model. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(9):1729-38.
17. RohitKumar HG, Asha KR, Raghavan SC, Advi Rao GM. DNA intercalative 4-butylaminopyrimido[4',5':4,5]thieno(2,3-b)quinoline induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cell., *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;75(6):1121-33.
18. Madonna S, Béclin C, Laras Y, Moret V, Marcowycz A, Lamoral-Theys D, i sur. Structure-activity relationships and mechanism of action of antitumor bis 8-hydroxyquinoline substituted benzylamines. *Eur J Med Chem.* 2010;45(2):623-38.
19. Takara K, Sakaeda T, Yagami T, Kobayashi H, Ohmoto N, Horinouchi M, i sur. Cytotoxic Effects of 27 Anticancer Drugs in HeLa and MDR1-Overexpressing Derivative Cell Lines, *Biol Pharm Bull.* 2002;25(6):771-8.
20. Sarkarzadeh H, Miri R, Firuzi O, Amini M, Razzaghi-Asl N, Edraki N, i sur. Synthesis and antiproliferative activity evaluation of imidazole-based indeno[1,2-b]quinoline-9,11-dione derivatives, *Arch Pharm Res.* 2013;36(4):436-47.

10. ŽIVOTOPIS

Zorislava Živković rođena je 11. siječnja 1995. godine u Našicama. Od 2009. do 2013. pohađala je Opću gimnaziju u Srednjoj školi Isidora Kršnjavog u Našicama. 2013. godine upisuje studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Od 2001. do 2013. pohađala je školu stranih jezika „Alicia“, Našice. Aktivno sudjeluje na Festivalu znanosti 2015. godine. Kao dio studentske sekcije u lipnju 2016. godine sudionik je 3. kongresa Hrvatske komore zdravstvenih radnika strukovnog razreda za Medicinsko-laboratorijsku djelatnost.