

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Senka Toplak**

**ODREĐIVANJE PROMJENE U  
KATALITIČKOJ AKTIVNOSTI  
UGLJIČNE ANHIDRAZE U  
LEUKEMIJSKIM STANICAMA  
IZLOŽENIM DERIVATIMA KUMARINA  
U LEUKEMIJSKIM STANICAMA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2018.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Senka Toplak**

**ODREĐIVANJE PROMJENE U  
KATALITIČKOJ AKTIVNOSTI  
UGLJIČNE ANHIDRAZE U  
LEUKEMIJSKIM STANICAMA  
IZLOŽENIM DERIVATIMA KUMARINA  
U LEUKEMIJSKIM STANICAMA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2018.**

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

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

Rad ima: 31 list, 2 tablice i 6 slika.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac na stručnom vodstvu i iskazanoj potpori pruženoj tijekom istraživanja i izrade rada.

Posebno se zahvaljujem dr. sc. Marijani Jukić na velikoj pomoći, strpljivosti i svim savjetima koji su značajno pridonijeli izradi ovog rada.

Zahvaljujem se cijelom timu Laboratorija za kulturu tkiva na pristupačnosti i suradnji tijekom istraživanja.

Posebno se zahvaljujem obitelji i prijateljima za bezgraničnu podršku tijekom studija.

1. UVOD .....	1
1.1. Ugljična anhidraza IX (CA IX).....	2
1.2. Biokemijska struktura CA IX .....	2
1.3. Katalitička aktivnost CA IX .....	3
1.4. CA IX i pH regulacija tumora.....	3
1.5. Regulacija ekspresije gena <i>CA IX</i> .....	4
1.5.1. Uloga ekspresije gena <i>CA IX</i> u normalnom tkivu.....	6
1.5.2. Uloga ekspresije gena <i>CA IX</i> u leukemijama.....	6
1.6. CA IX kao meta ciljane antitumorske terapije .....	7
1.7. Kumarini .....	7
1.7.1. Antitumorska aktivnost kumarina .....	8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	11
3.1. Materijali .....	11
3.1.1. Derivati kumarina .....	11
3.1.2. Stanične linije .....	12
3.1.3. Kemikalije .....	12
3.2. Metode .....	13
3.2.1. Uzgoj stanica <i>in vitro</i> .....	13
3.2.2. Izolacija RNA .....	14
3.2.3. Sinteza cDNA .....	14
3.2.4. Real-time PCR (qRT-PCR).....	15
3.2.5. „Sendvič“ ELISA .....	16
3.3. Statistička analiza rezultata .....	18
4. REZULTATI.....	19
4.1. Promjene u ekspresiji gena <i>CA IX</i> u leukemijskim stanicama.....	19
4.2. Promjene u katalitičkoj aktivnosti ugljične anhidraze u leukemijskim stanicama .....	21
5. RASPRAVA.....	22
6. ZAKLJUČAK.....	25
7. SAŽETAK.....	26
8. SUMMARY .....	27
9. LITERATURA.....	28
10. ŽIVOTOPIS.....	30

## POPIS KRATICA

CA IX (eng. *carbonic anhydrase IX*) ugljična anhidraza IX

HIF (eng. *hypoxia-inducible factors*) faktori transkripcije koji induciraju hipoksiju

MN (eng. *membrane antigen*) membranski antigen

cDNA (eng. *complementary DNA*) komplementarna DNA

PG (eng. *proteoglycan-like domain*) proteoglikanska domena

CA (eng. *catalytic domain*) katalitička domena

TM (eng. *transmembrane domain*) transmembranska domena

IC (eng. *intracellular tail*) intracelularni rep

ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) imunoenzimski test

NBC (eng. *the sodium bicarbonate cotransporter*) Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kotransporter

AE2 (eng. *anion exchanger 2*) anionski izmjenjivač 2

NHE-1 (eng. *the sodium-hydrogen antiporter 1*) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> izmjenjivač

MCT (eng. *monocarboxylate transporter*) monokarboksilat transporter

PHD (eng. *prolyl-4-hydroxylase domain*) prolil hidroksilaza

pVHL (eng. *von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*) von Hippel-Lindau tumor supresor protein

FIH-1 (eng. *factor inhibiting HIF-1*) faktor inhibicije HIF-1

HRE (eng. *hypoxia responsive element*) element odgovora na hipoksiju

P13K (eng. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*) obitelj intracelularnih prijenosnika signala

Akt (eng. *protein kinase B*) proteinska kinaza B

mRNA (eng. *messenger RNA*) glasnička RNA

MAPK (eng. *mitogen-activated protein kinase*) mitogenom aktivirane proteinske kinaze

AP1 (eng. *activator protein 1*) aktivator protein 1

SP1/SP3 (eng. *specificity protein 1 / specificity protein 3*) transkripcijski faktori

PR1/PR5 (eng. *PR1/PR5 promoter*) promotori

MORC2 (eng. *microorchidia 2*) proteinski kompleks

HDAC4 (eng. *histone deacetylase*) histon deacetilaza 4

HSP90 (eng. *heat shock protein 90*) protein toplinskog šoka 90

DMSO (eng. *dimethyl-sulfoxide*) dimetil-sulfoksid

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

PCR (eng. *polymerase chain reaction*) lančana reakcija polimerazom

DNA (eng. *deoxyribonucleic acid*) deoksiribonukleinska kiselina

dNTP (eng. *deoxyribonucleotid triphosphate*) deoksiribonukleotid trifosfat

FBS (eng. *fetal bovine serum*) fetalni goveđi serum

HEPES (eng. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*) 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina

RNA (eng. *ribonucleic acid*) ribonukleinska kiselina

RT-PCR (eng. *reverse transcription polymerase chain reaction*) lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja

qRT-PCR (eng. *quantitative polymerase chain reaction*) kvantitativna lančana reakcija polimerazom

RPLP0 (eng. *ribosomal protein lateral stalk subunit P0*) protein kodirajući gen

## 1. UVOD

Tumorske stanice odlikuju se sposobnošću nekontroliranog rasta i proliferacije. Vrlo lako može doći do neravnoteže između potreba brzorastućih stanica i sposobnosti njihove opskrbe kisikom i hranjivim tvarima te posljedičnog razvoja tumorske hipoksije. Kako bi se prilagodile na novonastale uvjete i održale svoje energetske potrebe, tumorske stanice mijenjaju svoj energetski metabolizam i usmjeravaju ga prema anaerobnoj glikolizi, a produkti te reakcije stvaraju relativno kiseli tumorski mikrookoliš. Budući da su sve vitalne stanične funkcije osjetljive na promjene unutarstaničnog pH, preživljenje stanica raka ovisi upravo o njihovoj sposobnosti prilagodbe uvjetima koji ih okružuju. Enzim ugljična anhidraza IX (eng. *carbonic anhydrase IX*, CA IX) ima jednu od vodećih uloga u toj prilagodbi kao posljedica hipoksijom izazvanih uvjeta. CA IX katalizira reakciju hidratacije ugljikova dioksida u bikarbonatne ione i protone, a produkti te reakcije sudjeluju u procesu održavanja neutralizacije unutarstaničnog pH. Aktivacija CA IX uzvodno je potaknuta od strane hipoksijom induciranih faktora (HIF) (1). Iako većina studija upućuje na povišenu ekspresiju gena *HIF* u solidnim tumorima, uočena je povišena ekspresija *HIF* i u hematološkim zloćudnim tumorima (2,3). Spoznaje o promjeni ekspresije CA IX u leukemijskim stanicama slabo su istražene jer se ekspresija gena CA IX prvenstveno povezuje s tumorigenezom u solidnim tumorima. Uloga enzima CA IX odražava se u staničnoj adheziji, regulaciji migracije tumorskih stanica kao i povezanosti s invazivnijim fenotipovima tumora. Budući da su to sve karakteristike tumorigeneze, CA IX predstavlja idealnu metu za antitumorsku terapiju. Identificirani su mnogi CA IX selektivni spojevi različitih mehanizama djelovanja, među kojima su najistaknutiji sulfonamidi i kumarini (1). Kumarini su spojevi s mnoštvom bioloških aktivnosti, uključujući protuupalnu, antioksidativnu, antivirusnu, citostatsku te antitumorsku aktivnost. Zbog raznolike biološke aktivnosti, koja ovisi o položaju supstitucije i samom supstituentu, sinteza različitih derivata kumarina od velikog je interesa i potencijala za ovakav oblik ciljanog liječenja. Sulfonamidni derivati kumarina pokazali su se pritom kao aktivni i efikasni inhibitori CA IX enzima, dovodeći u konačnici do narušavanja pH ravnoteže i uništavanja tumorskih stanica (4).



### 1.1. Ugljična anhidraza IX (CA IX)

Ugljična anhidraza IX je transmembranski metaloenzim koji u svom sastavu sadrži cink. Enzim katalizira reakciju hidratacije ugljikova dioksida u bikarbonatne ione i protone. Pripada  $\alpha$  klasi obitelji ugljičnih anhidraza. Primarno je otkriven kao površinski protein na HeLa (stanična linija karcinoma vrata maternice) tumorskim stanicama, korištenjem specifičnog monoklonskog protutijela M75 i imenovan „MN protein“. Daljnjom analizom slijeda u njegovoj komplementarnoj DNA (engl. cDNA) ustanovljeno je da sadrži katalitičku domenu specifičnu za obitelj ugljičnih anhidraza te im je pridružen kao novootkriveni deveti član i stoga preimenovan u CA IX (1). Do sada je poznato 15 CA humanih izooblika, od kojih su jedino CA IX i CA II povezane s mogućom ulogom u razvoju tumora (5).

### 1.2. Biokemijska struktura CA IX

Gen *CA IX* nalazi se na kromosomu 9p 12-13 i kodira transmembranski protein dug 459 aminokiselina. N-terminalna ekstracelularna domena (414) sadrži: signalni peptid dug 37 aminokiselina, proteoglikansku domenu (PG) dugu 59 aminokiselina i katalitičku domenu (CA) dugu 257 aminokiselina. Nadalje protein prodire u plazma membranu preko hidrofobne transmembranske domene duge 20 aminokiselina (TM) i završava s C-terminalnom domenom u citosolu kao intracelularni rep (IC) od 25 aminokiselina, koji je uključen u regulaciju same enzimske aktivnosti. Ova forma stanično povezanog transmembranskog proteina na Western blotu reprezentira se kao dvostruki bend od 54/58 kDa (1). Međutim, postoji i druga forma, odnosno topljivi protein CA IX od 50/54 kDa koji se oslobađa u stanične tekućine kao što su serum i urin pacijenata s tumorima kod kojih je eksprimiran CA IX ili u medij CA IX pozitivne tumorske stanične kulture. Ova veličina odgovara ekstracelularnom dijelu molekule sastavljenom od PG i CA domene, koja je odcijepljena od ostatka transmembranske domene i intracelularnog repa. Za kvantifikaciju topljivog proteina pogodna je „Sendvič“ ELISA metoda (6).

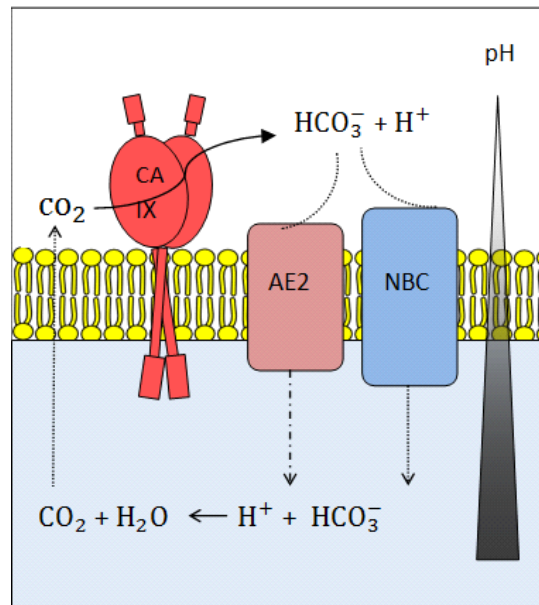
### 1.3. Katalitička aktivnost CA IX

Reakcija hidrolize ugljikova dioksida u bikarbonatne ione i protone postiže se deprotonacijom molekule vode koja je vezana za aktivno mjesto CA domene. Eksperimentalnim određivanjem  $\Delta CA$  i  $\Delta PG$  među enzimskim izoformama CA IX utvrđeno je da je CA domena sama dovoljna za katalitičku aktivnost enzima CA IX, a mogućnost kooperacije s PG domenom nije isključena (1). Štoviše, smatra se da PG domena može funkcionirati kao unutarnji pufer te tako osigurati zadržavanje aktivnost enzima CA IX pri kiselim i alkalnim uvjetima (5). Povećana aktivnost enzima uočena je u brojnim fiziološkim stanjima poput lipogeneze, glukoneogeneze, koštane razgradnje, međutim, najviše se ističe njegova uloga u neutralizaciji unutarstaničnog pH u tumorskim stanicama koje su izložene kiselom mikrookolišu (1).

### 1.4. CA IX i pH regulacija tumora

U većini normalnih stanica održana je ravnoteža između vrijednosti unutarstaničnog pH ( $pH_i = 7,2$ ) i izvanstaničnog pH ( $pH_e \geq 7,3$ ). Takav gradijent osigurava normalnu funkciju u metabolizmu, transportu i regulatornim procesima stanica (5). Promjena omjera  $pH_i/pH_e$  za 0.1-0.2 jedinice može imati ozbiljne posljedice na ključne biološke procese, uključujući ATP sintezu, proliferaciju (7). U stanju tumorske hipoksije dolazi do snižavanja  $pH_e$  i stvaranja kiselog tumorskog mikrookoliša. Razlog tomu je što uslijed nedostatka kisika tumorske stanice mijenjaju svoj metabolizam iz oksidativne fosforilacije prema anaerobnoj glikolizi te dolazi do nakupljanja produkata glikolize, točnije laktata i ugljikova dioksida. Uočeno je, također, da stanice tumora pokazuju povećanu glikolizu usprkos dostatnoj količini kisika nakon reoksigenacije tumorskog tkiva, što je poznato kao Warburgov efekt, odnosno brza aerobna glikoliza, koja dovodi do nakupljanja velike količine laktata (5,7). Budući da su vitalne biološke funkcije u stanici iznimno osjetljive na promjene  $pH_i$ , preživljenje tumorskih stanica ovisi o mogućnosti prilagodbe ograničenim uvjetima koji ih okružuju. Dva su glavna regulatorna mehanizma uključena u proces same prilagodbe, a to su  $pH_i$  puferiranje preko CA IX i mehanizmi kiselinskog izbacivanja. Zbog položaja katalitičke domene na površini izvanstanične membrane CA IX pogodan je za pretvorbu velikih količina ugljikova dioksida iz izvanstaničnog prostora u bikarbonatne ione i protone. Bikarbonatni ioni dalje se transportiraju u unutrašnjost stanice preko  $Na^+/HCO_3^-$  kotransportera (NBC, eng. *sodium*

*bicarbonate cotransporter*) i anionskih izmjenjivača 2 (AE2, eng. *anion exchanger 2*) transportera. Tamo stupaju u reakciju s protonima oslobođenim u procesu glikolize što dovodi do alkalizacije  $pH_i$ , a  $CO_2$ , kao krajnji produkt nastao u toj reakciji, difundira kroz plazma membranu i pridonosi vanjskom zakiseljavanju (Slika 1). Održavanje alkalnog  $pH_i$  dodatno je pojačano mehanizmom izbacivanja kiselina i protona iz unutrašnjosti stanice preko pH regulatornih  $Na^+/H^+$  izmjenjivača (NHE-1, eng. *sodium-hydrogen antiporter 1*), monokarboksilat transportera (MCT, eng. *monocarboxylate transporter*) i vakuolarnog tipa  $H^+$  ATPaza (1). Osim što pridonosi preživljenju tumorskih stanica, aktivnost CA IX stimulira i migraciju tumorskih stanica, povezana je s povećanjem invazivnijih fenotipova tumora, a uočena je povezanost i s prognozom kliničkog ishoda u mnogim tipovima tumora (1).



**Slika 1.** Regulacija pH preko aktivnosti enzima CA IX. (Slika izrađena prema shematskom prikazu iz reference 1.)

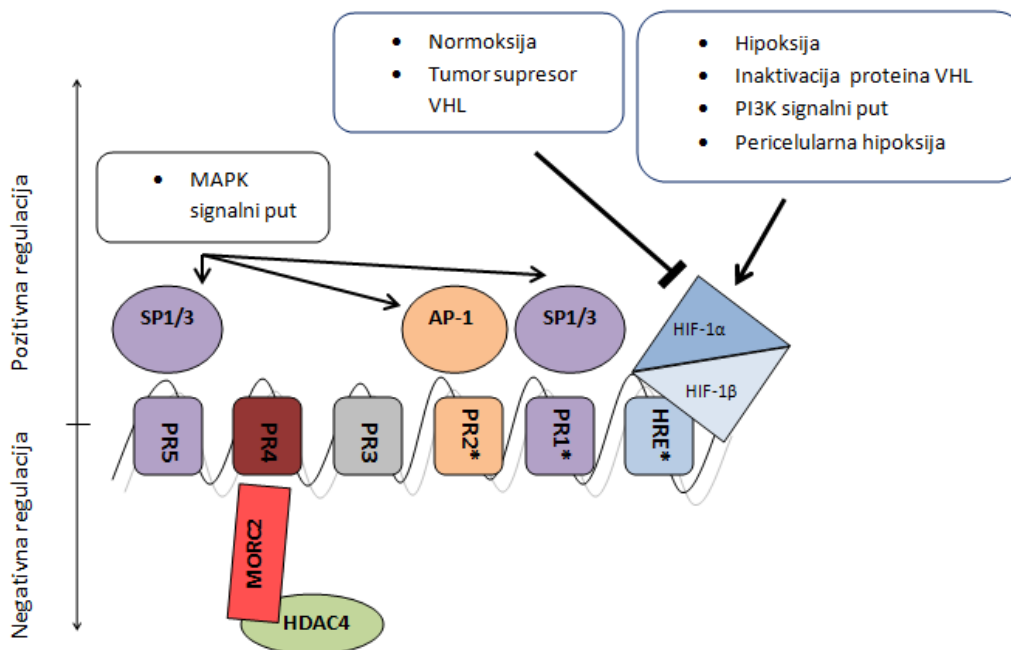
### 1.5. Regulacija ekspresije gena *CA IX*

Aktivacija transkripcije gena *CA IX* potaknuta je prvenstveno od strane hipoksijom induciranoog faktora 1 (HIF-1). HIF-1 je heterodimer sastavljen od dvije podjedinice: HIF-1 $\alpha$  osjetljive na razinu kisika i kontinuirano aktivne HIF-1 $\beta$  podjedinice. Pri normalnim razinama kisika (normoksija) HIF-1 $\alpha$  hidroksilira se preko prolil-hidroksilaza (PHD) i brzo razgrađuje. Razlog tomu je što hidroksilirane domene prepoznaje von Hippel-Lindau tumor supresorski protein (pVHL) koji posreduje poliubikvitinaciju i proteosomsku degradaciju. Zaštitni učinak

dodatno pruža i tzv. faktor inhibicije (FIH-1). Nasuprot tomu u uvjetima hipoksije HIF hidroksilaze i FIH-1 postaju inaktivni te se HIF-1 $\alpha$  stabilizira i akumulira. Nadalje se transportira u jezgru gdje tvori heterodimer s HIF-1 $\beta$ , veže se s ostalim koaktivatorima i aktivira transkripciju gena *CA IX*. Od ukupno šest identificiranih cis regulatornih elemenata unutar promotorske sekvence gena *CA IX*, najvažnijim za transkripcijsku aktivnost smatra se HRE (eng. *hypoxia responsive element*). Pritom je vezanje kompleksa HIF-1 na HRE neophodno za početak same transkripcije (1).

Međutim, aktivacija ekspresije gena *CA IX* može se ostvariti i kada je HIF-1 $\alpha$  aktiviran u stanjima normalne opskrbe kisikom pod utjecajem nekih drugih faktora, puteva i eksperimentalnih uvjeta (Slika 2). Primjerice mutacija u tumor supresorskom genu *VHL* dovodi do stabilizacije HIF1- $\alpha$  te ekspresije *CA IX*. Povećana razina ekspresije zabilježena je i u nekim studijama uslijed promjene mikrookolišnih uvjeta poput acidifikacije ili restrikcije glukoze, iako je u nekim studijama ekspresija bila smanjena pod istim uvjetima. Ti rezultati su sporni, a moguće je da njihova različitost proizlazi zbog specifičnosti tipa stanica na kojima su provedena istraživanja (7). Dok neki geni pokazuju jednake odgovore na djelovanje HIF-1 $\alpha$  među raznovrsnim tipovima stanica, HIF-1 $\alpha$  može posredovati i transkripcijske odgovore gena specifične za pojedini tip stanice (8). Onkogeni signalni putevi, također, imaju utjecaj na razinu ekspresije pa tako PI3K-Akt stimulira glasničku RNA (eng. mRNA) translaciju HIF-1 $\alpha$ , a MAPK aktivira transkripcijske faktore AP1, SP1/SP3. Još jedan u nizu faktora regulacije je pericelularna hipoksija, stanje kada u kultiviranim stanicama *in vitro* zbog velike gustoće uzgojenih stanica dođe do pada razine dostupnog kisika na manje od 5 % i više od 1 % kisika (blaga hipoksija). U takvim uvjetima aktivira se PI3K put, ali u ovom slučaju njegova aktivacija ne rezultira povećanim nakupljanjem HIF-1 $\alpha$  kako je očekivano prema saznanjima da PI3K aktivatori stimuliraju provođenje translacije njegove mRNA. Nasuprot tomu dolazi do same aktivacije HIF-1 $\alpha$  bez očite stabilizacije, što su potvrdili slučajevi u kojima je zabilježena ekspresija *CA IX* bez zabilježenog HIF-1 $\alpha$  signala (1,9).

Do ekspresije gena *CA IX* ne dolazi jedino pod utjecajem hipoksije. Naime, *CA IX* ekspresija, hipoksija i aktivacija HIF-1 različiti su entiteti koji se djelomično preklapaju, te se može reći da *CA IX* nije univerzalni marker tumorske hipoksije, već je univerzalni detektor HIF-1 aktivacije (9).



**Slika 2.** Regulacija CA IX promotora. PR1 i PR5 regije prepoznate su od proteina SP1 i SP3; PR2 vezan je za koaktivator protein AP-1. Regije označene \* esencijalne su za aktivnost CA IX u hipoksičnim uvjetima. PR4 regija djeluje kao represor CA IX aktivnosti vezanjem MORC2 i HDAC4 kompleksa. (Slika djelomično izmijenjena i izrađena prema shematskom prikazu iz reference 1.)

### 1.5.1. Uloga ekspresije gena *CA IX* u normalnom tkivu

U ljudskom tkivu ekspresija CA IX rijetka je i ograničena na pojedina tkiva, posebno na epitel gastrointestinalnog trakta i njemu pridruženi epitel žljezdane želučane sluznice, epitel žučnog mjehura i epitel enterocita u kriptama dudoenuma, jejunuma i ileuma. Nešto slabija ekspresija zabilježena je u epitelu jajnika, stanicama folikula dlake, pankreatičnim duktalnim stanicama i epitelu muških eferentnih kanalića. Regulatorni mehanizmi odgovorni za ekspresiju CA IX u normalnim tkivima još nisu razjašnjeni, te nije poznato jesu li aktivirani preko HIF-a ili nekim potpuno drugim mehanizmima (1).

### 1.5.2. Uloga ekspresije gena *CA IX* u leukemijama

Za razliku od ograničene ekspresije u normalnim tkivima, CA IX uvelike je ekspimiran u različitim tumorskim tkivima (1). Većina studija pritom upućuje na povišenu ekspresiju HIF-a u solidnim tumorima, no uočena je povišena ekspresija HIF-a i u hematološkim zloćudnim

tumorima kao što su limfom/leukemija zrelih T stanica, akutna mijeloična leukemija, akutna limfoblastična leukemija (2,3). Leukemijske matične stanice dijele zajednički okoliš s hematopoetskim matičnim stanicama, mezenhimalnim matičnim stanicama, imunskim stanicama i ostalim tipovima stanica koje se nalaze u koštanoj srži. Mikrookoliš u koštanoj srži karakteriziran je niskim parcijalnim tlakom kisika, te koncentracija kisika varira od 6 % u područjima blizu krvnih žila do stanja potpunog odsustva kisika u nevaskuliziranim područjima. Poznato je da su hipoksični uvjeti povoljni za adaptivne promjene stanica poput modifikacije metabolizma, diferencijacije, optimizacije rasta te stimulacije angiogeneze u solidnim tumorima, no uloga hipoksije i njezinog medijatora HIF-a u leukemijama još uvijek nije dobro razjašnjena. Dosadašnja istraživanja uspjela su povezati ekspresiju HIF-a s lošijim odgovorom leukemijskih stanica na terapiju. Naime, aktivirana ekspresija HIF-a osigurava besmrtnost leukemijskih matičnih stanica povećavanjem njihove sposobnosti ulaska u fazu mirovanja i samoobnavljanja. Učinak protutumorskih lijekova na takve stanice je minimalan zato što lijekovi najčešće djeluju na stanice koje se često dijele (7).

### **1.6. CA IX kao meta ciljane antitumorske terapije**

S obzirom na sve navedene karakteristike i važnu ulogu CA IX u procesu tumorigeneze, postoji velik potencijal za CA IX ciljanu antitumorsku terapiju i istraživanje selektivnih CA IX inhibitora. Potencijal ciljane antitumorske terapije dodatno je veći zbog rijetke CA IX ekspresije u normalnim tkivima i njegove lokalizacije na izvanstaničnoj površini membrane. Od brojnih identificiranih komponenti s različitim mehanizmom djelovanja, najistaknutiji su se pritom pokazali derivati sulfonamida i kumarina. Osim tih malih inhibičkih molekula za terapijske svrhe koriste se još i monoklonska anti-CA IX protutijela, među kojima se ističu M75, G250 i njegov kimerični derivat cG20 vezan s radionuklidima (1).

### **1.7. Kumarini**

Kumarin, odnosno 2H-1-benzopiran-2-on i njegovi derivati široko su rasprostranjeni spojevi u prirodi i pripadaju sekundarnim biljnim metabolitima iz skupine fenolnih spojeva. Nalaze se u mnogim biljkama, a najviše su zastupljeni u voću, sjemenkama i u nekim eteričnim uljima. Prvi put je kumarin izoliran 1820. godine iz biljke *Coumarouna odorata Aube (Dipterix*

*odorata*), po kojoj je i dobio ime, a prepoznatljiv je po ugodnom mirisu na vaniliju ili svježe pokošeno sijeno (10,4,11). Građen je od kondenziranog benzenskog i pironskog prstena te strukturno spada u skupinu benzopirona (12). S obzirom na to da je supstitucija na ugljikovim atomima moguća na svih 6 položaja, odnosno u oba prstena, moguće je stvaranje velikog broja derivata kumarina. Upravo ta strukturna raznolikost prirodnih ili sintetskih spojeva pogoduje njihovu ostvarenju mnoštva različitih bioloških i farmakoloških aktivnosti. Širok spektar tih aktivnosti uključuje protuupalnu, antibakterijsku, antivirusnu, citostatsku aktivnost, djeluju i kao antikoagulansi, antihistaminici i antidepresivi. Među ostale biološke aktivnosti spadaju inhibicija agregacije krvnih pločica, citokroma P450, antitumorska i antioksidativna aktivnost. Također imaju široku primjenu kao aditivi u hrani, kozmetičkim proizvodima, duhanskim proizvodima, alkoholnim pićima, a sama upotreba i maksimalna dopuštena koncentracija strogo su regulirane i propisane pravilnicima zbog umjerene toksičnosti za jetru i bubrege (10). Neki od derivata kumarina koji su odobreni za kliničku upotrebu i kao takvi upotrebljavaju se u medicini su varfarin (antikoagulans), novobiocin, klorobiocin i armilarizin A (antibiotici), himekromon (antispazmodik) i karbokromen (vazodilatator) (11).

### **1.7.1. Antitumorska aktivnost kumarina**

Kumarini posjeduju ogroman potencijal u liječenju tumora kao i smanjenju štetnih nuspojava povezanih klasičnim oblicima antitumorske terapije poput radijacije, zbog mogućnosti supstitucije na različitim položajima kumarinske jezgre. Biološka istraživanja otkrila su velik broj puteva na koje oni djeluju kao antitumorski posrednici. Neki od tih puteva su inhibicija kinaza, poticanje faze mirovanja staničnog ciklusa, inhibicija angiogeneze, proteina toplinskog šoka 90 (HSP90), telomeraza, inhibicija ugljične anhidraze i monokarboksilatnih transporterata, aromataza i sulfataza (4).

Zbog mnoštva navedenih bioloških aktivnosti i terapijskih svojstava koje posjeduju, kumarin i njegovi derivati pokazali su se kao atraktivne mete koje sve više privlače pažnju u organskoj i medicinskoj kemiji. Veliki naponi uloženi su u razvijanje novih strategija sinteze s ciljem stvaranja strukturno kompleksnih, modificiranih i učinkovitih spojeva. Jedan od novijih pristupa je molekulska hibridizacija, strategija dizajna liganda koji sadrži dvije farmakoforne jedinice u jednoj molekuli. Novonastali hibridi zadržavaju unaprijed odabrane

karakteristike originalnih spojeva uz poboljšana svojstva i učinkovitost, uključujući povećanje bioloških aktivnosti, različit ili dupli način djelovanja i/ili smanjene neželjenih nuspojava. Na taj način hibridizirani su različiti derivati kumarina s brojnim drugim bioaktivnim molekulama poput resveratrola, sulfonamida maleimida, pirazolina, kalkolina, triazola i liponske kiseline, a nove hibridne molekule imaju poboljšana vazorelaksacijska, antitumorska, antibakterijska, antioksidativna te protuupalna svojstva (4).

Kako bi se otkrile kemijske grupe odgovorne za ostvarenje antitumorskog potencijala različitih kumarinskih derivata, provode se istraživanja koja utvrđuju odnos strukture i aktivnosti (SAR), s namjerom da se pomogne organskim kemičarima u dizajniranju i sintetiziranju novijih i potentnijih hibridnih molekula za liječenje različitih bolesti. Među različitim sintetiziranim hibridima istaknuli su se pritom sulfonamidni derivati kumarina koji inhibiraju enzimsku aktivnost CA IX i CA II (11). Kumarini su dobri regulatori pH i inhibitori aktivnosti ugljične anhidraze kod hipoksije tumora, a mehanizam njihova djelovanja zasniva se na prostornom blokiranju CA IX aktivnog mjesta, nakon vezanja hidroliziranog oblika kumarina do njegova ulaza. Sulfonamidi, također, imaju dobar inhibitorni učinak koji se s druge strane zasniva na vezanju sulfonamidnog aniona za cinkov ion unutar enzimskog aktivnog mjesta. Budući da su metastatski fenotip i kemorezistencija na tumore posljedica povećane kiselosti tumorskog mikrookoliša kojem pridonosi aktivnost ugljične anhidraze, inhibicija njezina djelovanja od velikog je značaja za liječenje (1,4). SAR studija ocijenila je da sulfonamidi povezani s jezgrom kumarina vode do povećanja aktivnosti uz veću učinkovitost tih spojeva. Najveću aktivnost i učinkovitost pokazali su spojevi fenilsulfonamida povezanih preko hidrofilne iminske poveznice s kumarinskom jezgrom i supstituirani metilpirimidinom, dok je suprotno tome supstitucija s izoksazolom rezultirala smanjenom aktivnošću (11).



## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

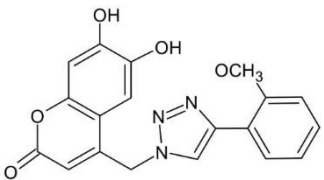
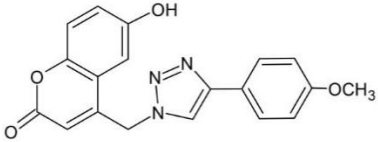
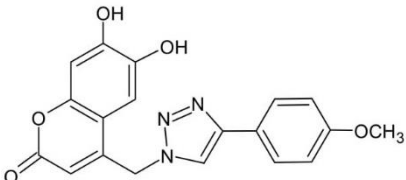
Ispitati promjene u katalitičkoj aktivnosti ugljične anhidraze te promjene u ekspresiji CA IX u leukemijskim stanicama *in vitro*, izloženim djelovanju derivata kumarina.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Derivati kumarina

Testni derivati kumarina (Slika 3.) sintetizirani su u Zavodu za organsku kemiju, Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Za potrebe ovog istraživanja korišteni su spojevi NS-48, NS-51 i A-153. Spojevi su dobiveni u prahu određene mase i otopljeni u dimetil sulfoksidu (DMSO) kao stock otopine u koncentraciji od  $1 \times 10^{-2}$  mol/L (M) te pohranjeni na  $-20$  °C do daljnje upotrebe. Radne otopine pripremljene su otapanjem stock otopine ( $1 \times 10^{-2}$  M) u mediju u određenom volumenu.

		
<b>NS-48</b>	<b>NS-51</b>	<b>A-153</b>

**Slika 3.** Testni derivati kumarina

### 3.1.2. Stanične linije

Učinci kumarinskih derivata ispitani su na humanim leukemijskim stanicama.

Stanične linije u suspenziji koje su korištene u radu:

- K562 (ATCC® CCL-243™) - kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi

- CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™) - akutna limfoblastična leukemija

### 3.1.3. Kemikalije

U pokusnom dijelu rada korištene su kemikalije različitih proizvođača: Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640) Lonza (Basel, Switzerland), tripansko plavilo 0.4 % GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), dimetil sulfoksid (DMSO) Acros Organics (New Jersey, SAD), komplet za izolaciju RNA (RNeasy Mini Kit, QIAGEN), komplet za sintezu cDNA (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific), komplet za PCR reakciju (Go Taq G2 Flexi DNA Polymerase, PROMEGA), SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen), dNTP Set (Metabion), komplet za određivanje aktivnosti enzima CA IX (Human Carbonic Anhydrase IX ELISA Kit, SIGMA-ALDRICH).

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Uzgoj stanica *in vitro*

Uzgoj stanica izvodi se u laboratoriju koji zahtijeva osigurane uvjete za sterilan rad s ciljem sprečavanja kontaminacije kulture stanica. Korišteni su kabineti za sterilan rad s laminarnim protokom zraka te sterilan pribor, posuđe, otopine, mediji i puferi.

Stanice su uzgojene u bocama za kulturu stanica površine 25 cm<sup>2</sup> i 75 cm<sup>2</sup> (BD, Falcon, Njemačka) i kultivirane u CO<sub>2</sub> inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, Jouan, Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u uvjetima 5 % CO<sub>2</sub> na 37 °C.

Stanične linije kultivirane su u RPMI 1640 mediju obogaćenom s 10 % FBS, 2 mM L-glutamina, 1 mM natrijeva piruvata, 10 mM HEPES-a i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomycin antibiotika. Održavanje staničnih linija provedeno je oduzimanjem određenog volumena stanica koji je nadoknađen svježim medijem RPMI 1640.

Prije svakog eksperimentalnog postupka sa stanicama određen je točan broj stanica u staničnoj suspenziji. Broj i vijabilnost stanica određeni su testom s tripan plavilom. Uzima se 50 µl resuspendirane stanične suspenzije i pomiješa s 100 µl tripan plavila. Otopina se nanosi ispod pokrovnog stakalca Bürker-Türk komorice za brojanje stanica. Otopina tripanskog plavila nakuplja se u stanicama s oštećenom membranom te se one boje u plavo, dok žive stanice s očuvanom membranom ostaju nebojene. Pod invertnim mikroskopom broje se žive stanice unutar 4 kvadratića uključujući gornji i lijevi brid kvadratića. Broj određene stanične linije određen je prema formuli:

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

N je ukupan broj stanica izbrojan u 4 kvadratića, a R je faktor razrijeđenja.

### 3.2.2. Izolacija RNA

Stanice su nasadene u Petry posudice u koncentraciji od  $5 \times 10^6$  st/ml. Tretirane su s NS-48, NS-51, A-153 derivatima kumarina u finalnoj koncentraciji od  $5 \times 10^{-6}$  M. Kontrolne stanice ostavljene su netretirane. Inkubacija je trajala 24 sata.

Nakon 24-satne inkubacije sve stanice su prikupljene i prebačene u posebne epruvete. Za izolaciju ribonukleinske kiseline (RNA) korišten je RNeasy Mini Kit, proizvođača Qiagen. RNeasy Mini Kit dizajniran je za pročišćavanje RNA iz malih količina uzoraka, te se pokazao kao brza i jednostavna metoda pripreme do 100 µg ukupne RNA visoke čistoće, koja se može koristiti dalje za sintezu cDNA i lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *real-time PCR*).

Prije samog početka radna površina i sav pribor prebrisan je s Invitrogen RnaseZap Wipes, proizvođača Thermo Fisher Scientific, kako bi se spriječila kontaminacija RNazama, enzimima koji razgrađuju RNA.

Stanice su prvo lizirane i homogenizirane dodatkom pufera za lizu dostupnog u kitu, a zatim je lizatu dodan etanol koji stvara uvjete za selektivno vezanje RNA. Nakon toga uzorak je prebačen na RNeasy mini kolonu. Ukupna RNA vezana je za RNasey silika-gel membranu, a svi onečišćivači su nekoliko puta isprani. Na kraju je RNA eluiran s membrane dodatkom vode koja ne sadrži RNaze (eng. *RNeasy free water*). Nakon provedene izolacije izmjerena je ukupna koncentracija RNA na nanofotometru (IMPLEN NanoPhotometer P 3300). Uzorci RNA pohranjeni su na  $-20$  °C do daljnje upotrebe.

Ovim postupkom RNA izolacije pročišćavaju se sve molekule RNA duže od 200 nukleotida, a budući da je većina RNA poput 5.8S rRNA, 5S rRNA i ostalih tRNA manja od 200 nukleotida, njihovim selektivnim isključenjem dobivaju se obogaćene količine mRNA.

### 3.2.3. Sinteza cDNA

Postupkom reverzne transkripcije dobivenu RNA potrebno je dalje prepisati u komplementarnu DNA (cDNA) kako bi ispitali gensku ekspresiju. U tu svrhu korišten je High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, proizvođača Thermo Fisher Scientific. Za početak cDNA sinteze korištene su nasumične početnice.

Svi uzorci ukupne RNA podešeni su na jednaku koncentraciju od 50 ng/μl. Zatim je pripravljena smjesa za sintezu cDNA. Reakcijska smjesa za jednu reakciju sadržava 2.0 μl RT pufera, 0.8 μl dNTP mješavine, 2.0 μl nasumičnih početnica, 1.0 μl reverzne transkriptaze, 1.0 μl RNaze inhibitora i 3.2 μl vode bez nukleaza, što je ukupno 10 μl po reakciji.

U sljedećem koraku u mikrotubice pomiješani su 10 μl pripravljene smjese iz prvog koraka i 10 μl uzorka RNA.

Ovako pripravljene otopine korištene su za lančanu reakciju polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR) na uređaju GeneAmp PCR System 9700 proizvođača Thermo Fisher Scientific. Cijeli proces odvijao se u četiri faze, od kojih je svaka faza programirana na određeno vrijeme i temperaturu prema uputi proizvođača.

#### 3.2.4. Real-time PCR (qRT-PCR)

Nakon prepisivanja RNA u cDNA za kvantifikaciju genske ekspresije CA IX korištena je metoda real-time PCR. U reakciji real-time PCR produkti reakcije obilježeni su fluorescentnom bojom, koja emitira signal proporcionalan broju novosintetiziranim PCR produkata, te možemo pratiti njihovo nastajanje. Ukupna RNA prepisana je korištenjem kita Go Taq G2 Flexi DNA Polymerase (Promega), dNTP Set-a (Metabion) i Syber Green fluorescentne boje (Invitrogen), koristeći nasumične početnice čiji su sljedovi prikazani u Tablici 1. Osim početnica za ispitivani gen CA IX, korištene su i početnice za *RPLP0* (eng. *ribosomal protein lateral stalk subunit P0*) koje su nam poslužile kao referentni gen.

Specifični odsječci umnoženi su u volumenu od 20 μl PCR reakcijske smjese (0,2 mM dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U Taq polimeraza i 1X Sybre Green boja), s 0,5 μM specifičnih početnica i 1 μl cDNA kalupa. Svi uzorci rađeni su u triplikatu.

Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu napravljena je na QuantStudio5 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Početna denaturacija odvijala se 2,5 minuta na 95 °C, a denaturacija u svakom ciklusu na 95 °C trajala je 30 sekundi. Vezanje početnica u svakom ciklusu trajalo je 1,5 minuta time da je korištena odgovarajuća temperatura vezanja za svaki par početnica (CA IX i RPLP0 – 57 °C). Elongacija na 72 °C trajala je 1 minutu u svakom ciklusu. Sve rađene PCR reakcije imale su 40 ciklusa.

**Tablica 1.** Korišteni sljedovi početnica za real-time PCR reakciju

Naziv početnice	Nukleotidni slijed
<b>Human CA9 (F)</b>	TGAGGAAGGCTCAGAGACTCA
<b>Human CA9 (R)</b>	TCAGCTGTAGCCGAGAGTCA
<b>RPLP0 (F)</b>	ACGGATTACACCTTCCCCTTGCTGAAAAGGTC
<b>RPLP0 (R)</b>	AGCCACAAAGGCAGATGGATCAGCCAAG

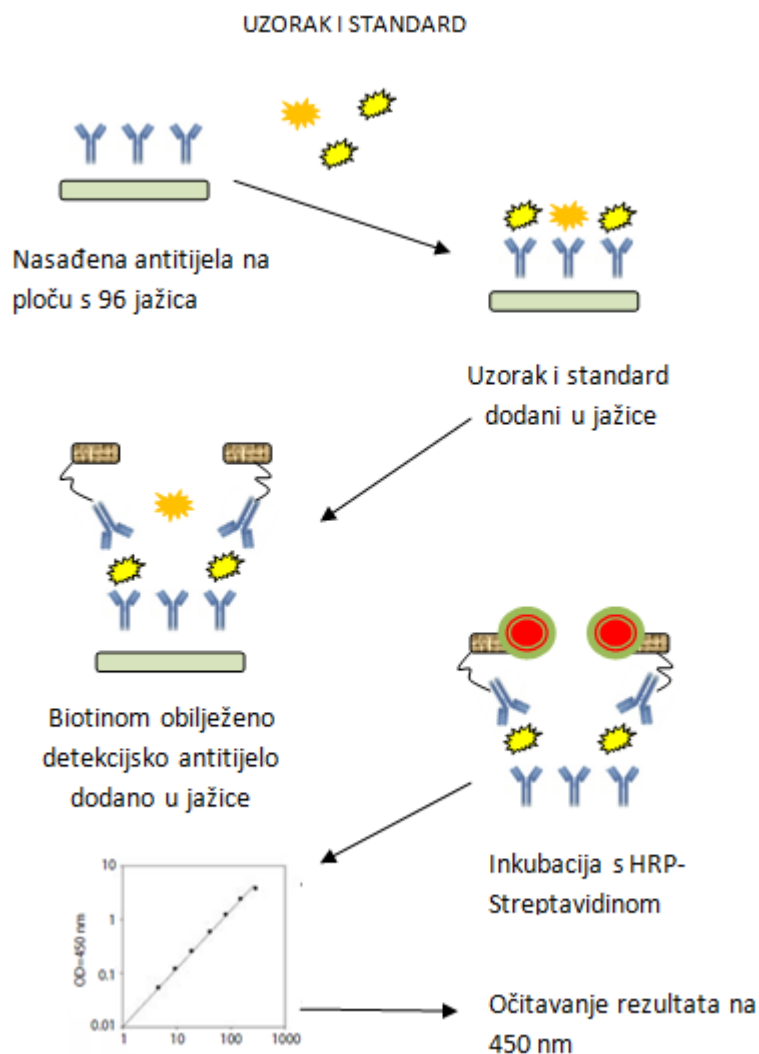
### 3.2.5. „Sendvič“ ELISA

Za analizu je korišten set za određivanje aktivnosti enzima CA IX (CA IX Human Carbonic Anhydrase IX ELISA Kit, SIGMA-ALDRICH) koji je pogodan za kvantitativno mjerenje topljivih proteina. Metoda se temelji na mjerenju količine ispitivanog antigena iz supernatanata uzoraka kultiviranih stanica između dva sloja antitijela specifičnih za ugljičnu anhidrazu IX.

Stanice su nasađene na mikrotitarsku ploču u koncentraciji od  $5 \times 10^5$  st/ml. Odmah nakon nasađivanja dodano je 20  $\mu$ l otopine testnih derivata kumarina NS-48, NS-51 i A-153 radne koncentracije koja ostvaruje finalnu koncentraciju od  $5 \times 10^{-6}$  M. Kontrola su bile netretirane stanice. Inkubacija je trajala 24 sata.

Nakon inkubacije na ploču za ELISU, koja sadrži vezano primarno antitijelo, dodani su standardi i uzorci u duplikatu. Pripremljeno je serijsko razrijeđenje standarda koje služi za izradu kalibracijske krivulje prema kojoj se onda računa nepoznata koncentracija enzima iz uzorka. U svaku jažicu dodano je 100  $\mu$ l svakog standarda i uzorka, jažice su pokrivene i inkubirane preko noći na +4 °C uz lagano miješanje. Nakon toga otopina iz svih jažica je odbačena te su uzorci oprani četiri puta otopinom za ispiranje. Nakon posljednjeg ispiranja ploča je preokrenuta i potisnuta na čisti papirnati ručnik kako bi se učinkovito uklonili ostaci otopine. Zatim je dodano 100  $\mu$ l pripremljenog detekcijskog antitijela koje je obilježeno biotinom. Jažice su pokrivene i inkubirane 1 sat na sobnoj temperaturi uz lagano miješanje. Nakon inkubacije otopina je odbačena te je ponovljen postupak ispiranja. Dodano je 100  $\mu$ l pripremljene otopine streptavidina i inkubirano na 45 minuta uz iste uvjete. Otopina je

ponovno odbačena, a ispiranje ponovljeno. Zatim je dodano 100  $\mu$ l supstrat reagensa i inkubirano na 30 minuta. Na kraju je dodano 50  $\mu$ l stop otopine u svaku jažicu. Rezultati su odmah očitani na optičkom čitaču mikroploča Victor<sup>3</sup> Multilabel Counter (PerkinElmer) na 450 nm. Izmjerena apsorbancija izravno je proporcionalna koncentraciji mjenog CA IX u uzorku (Slika 4.).



**Slika 4.** Shematski prikaz „Sendvič“ ELISA metode (Preuzeto i prilagođeno prema shematskom prikazu iz protokola Human Carbonic Anhydrase IX ELISA Kit, SIGMA-ALDRICH)



### 3.3. Statistička analiza rezultata

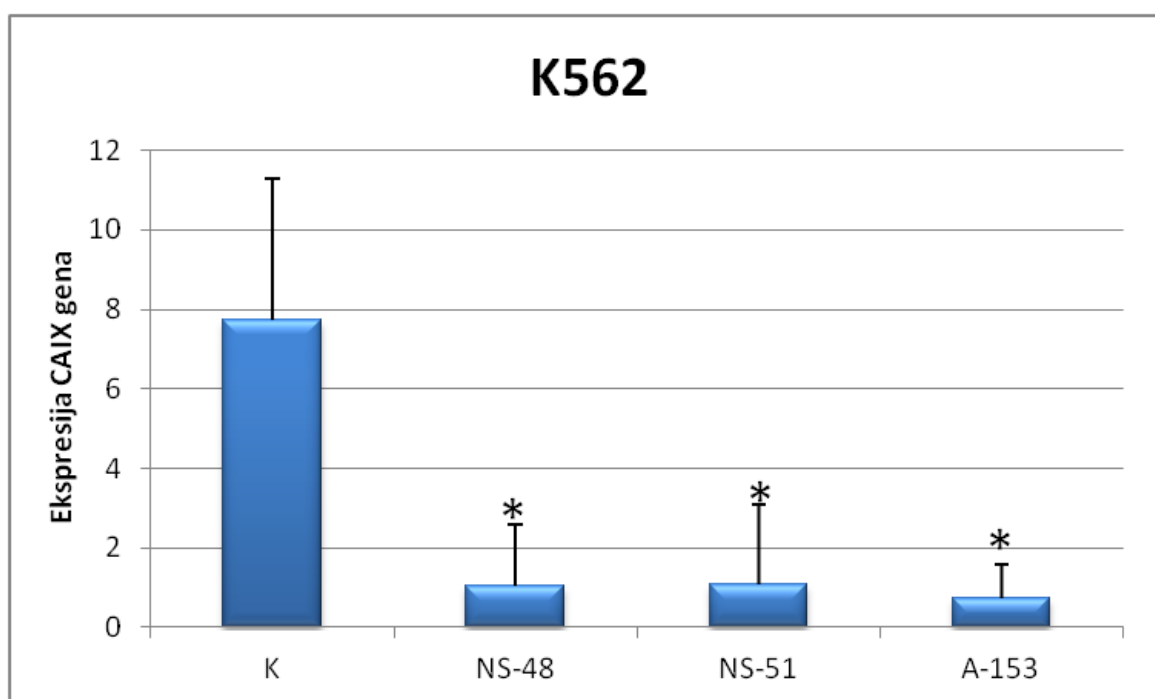
Dobiveni rezultati genske ekspresije ugljične anhidraze prikazani su grafički, na kojima je prikazana izračunata srednja vrijednost ( $\bar{X}$ ) sa standardnom devijacijom (SD). Livak matematički model korišten je za relativnu kvantifikaciju genske ekspresije. Za testiranje razlika neovisnih skupina primjenjen je Mann-Whitney statistički test pri čemu je razina statističke značajnosti postavljena na  $p < 0,05$ . Statistička analiza podataka obavljena je pomoću statističkog programa STATISTICA 13.0 za Windows operativne sustave.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Promjene u ekspresiji gena *CA IX* u leukemijskim stanicama

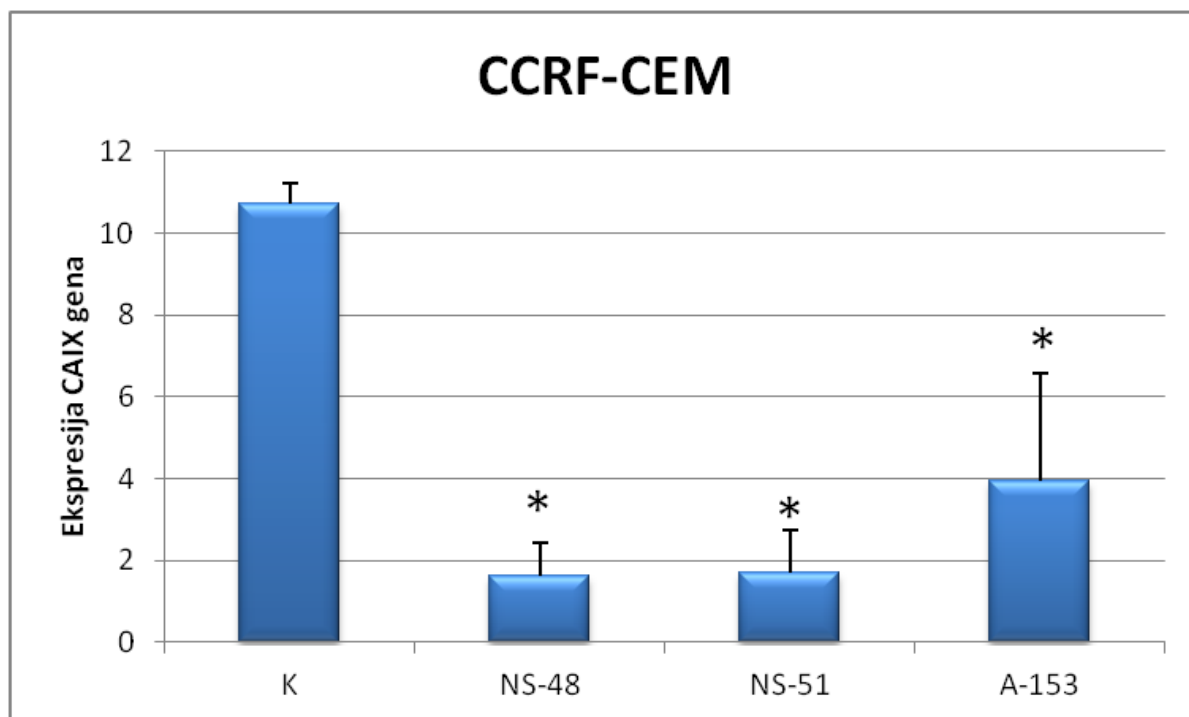
Rezultati prikazuju relativnu gensku ekspresiju zabilježenu nakon provedene kvantitativne PCR reakcije u stvarnom vremenu. Ispitane su promjene u genskoj ekspresiji ciljanog *CA IX* gena, a rezultati su normalizirani prema referentnom *RPLP0* genu.

Na staničnoj liniji K562 djelovanjem derivata kumarina NS-48, NS-51 i A-153 došlo je do smanjenja ekspresije gena *CA IX* u odnosu na netretirane kontrolne stanice. Pritom je najveći pad u razini genske ekspresije ostvaren djelovanjem spoja A-153 za 91 %. Spojevi NS-48 i NS-51 ostvarili su jednak učinak u sniženju razine genske ekspresije od 86 %.



**Slika 5.** Grafički prikaz ekspresije gena *CA IX* na staničnoj liniji K562. Stanice su tretirane derivatima kumarina NS-48, NS-51 i A-153 pri koncentraciji od  $5 \times 10^{-6}$  M u periodu od 24 sata. Statistički značajna p vrijednost definirana je kao  $p < 0.05$  (\*) u odnosu na kontrolne stanice.

Na staničnoj liniji CCRF-CEM također je zabilježen pad u genskoj ekspresiji gena *CA IX* djelovanjem svih ispitnih derivata kumarina. Učinak derivata kumarina NS-48 smanjio je gensku ekspresiju za 85 %, derivat NS-51 za 84 %, dok je derivat A-153 ostvario nešto manje sniženje razine genske ekspresije za 64 %.



**Slika 6.** Grafički prikaz ekspresije *CA IX* na staničnoj liniji CCRF-CEM. Stanice su tretirane derivatima kumarina NS-48, NS-51 i A-153 pri koncentraciji od  $5 \times 10^{-6}$  M u periodu od 24 sata. Statistički značajna p vrijednost definirana je kao  $p < 0.05$  (\*) u odnosu na kontrolne stanice.

Provedena je statistička analiza dobivenih vrijednosti ekspresije gena između kontrolnih stanica i stanica izloženih derivatima kumarina korištenjem Mann-Whitney testa za utvrđivanje statistički značajne razlike između tih skupina.

Rezultati usporedbe ekspresije gena *CA IX* u kontrolnim stanicama (K) i stanicama tretiranih testnim spojevima derivata kumarina pokazali su da postoji statistički značajna razlika između te dvije testirane skupine stanica na staničnim linijama K562 i CCRF-CEM. Obje leukemijske stanične linije pokazuju osjetljivost na djelovanje svih ispitivanih spojeva kumarina. Najveći statistički značajan učinak na pad razine ekspresije gena *CA IX* ostvaruje spoj A-153 na staničnoj liniji K562.

#### 4.2. Promjene u katalitičkoj aktivnosti ugljične anhidraze u leukemijskim stanicama

„Sendvič“ ELISA testom izmjerena je katalitička aktivnost CA IX enzima nakon tretmana stanica s testnim derivatima kumarina. Zabilježene su veoma niske koncentracije ispitivanog enzima u svim uzorcima.

Rezultati na staničnoj liniji K562 pokazuju da se katalitička aktivnost enzima CA IX djelovanjem spojeva NS-48, NS-51 i A-153 smanjila ispod razine detekcije metode dok kod kontrolnih stanica aktivnost enzima iznosi 0,196 pg/ml.

Na staničnoj liniji CCRF-CEM rezultati pokazuju suprotno. Koncentracija enzima u kontrolnim stanicama je ispod razine detekcije te se uočava blago povećana aktivnost enzima nakon tretmana, a najviši porast se javlja nakon tretmana spojem A-153.

**Tablica 2.** Izmjerene koncentracije enzima CA IX „Sendvič“ ELISA metodom

Stanična linija		Koncentracija enzima CA IX pg/ml
<b>K562</b>	K	0,196
	NS-48	0,000
	NS-51	0,000
	A-153	0,000
<b>CCRF-CEM</b>	K	0,000
	NS-48	0,197
	NS-51	0,198
	A-153	0,556

## 5. RASPRAVA

Istraživanja kumarina i njegovih dostupnih derivata, dobivenih prvenstveno izolacijom iz prirodnih izvora te metodama klasične ili kombinirane sinteze, kontinuirano se razvijaju. Na brojnim staničnim linijama pokazalo se da su 7-hidroksikumarin i 4-hidroksikumarin dobri inhibitori stanične proliferacije, a izgleda da citotoksični potencijal ovisi o prirodi i poziciji funkcionalnih grupa (20).

Enzim ugljična anhidraza IX jedna je od najistraživanijih ljudskih CA izoformi zbog značajne povezanosti s procesom tumorigeneze. U mnogim hipoksičnim tkivima, od kojih je većina tumorskog podrijetla, izražena je ekspresija ovoga gena kao odraz transkripcijske aktivnosti HIF-a (9). Ranija istraživanja uspjela su povezati povišenu ekspresiju CA IX s njegovom ulogom u procesu tumorigeneze u solidnim tumorima, međutim, aktivacija CA IX ekspresije u leukemijskim stanicama slabije je ispitana te brojni mehanizmi djelovanja zasad ostaju nepoznati (1,8).

U ovom istraživanju korištene su leukemijske stanične kulture za ispitivanje genske ekspresije CA IX te katalitičke aktivnosti tog enzima. Dobiveni rezultati pokazuju izraženu ekspresiju gena CA IX u kontrolnim stanicama što govori u prilog tomu da leukemijske stanice eksprimiraju gen CA IX. Dosadašnja istraživanja razine ekspresije ovoga gena u hematološkim zloćudnim tumorima nisu jednoznačna te postoje brojne varijacije, no upućuju na slabiju ekspresiju CA IX u odnosu na solidne tumore (14). Nakon provedene imunohistokemijske analize rezultati studije autora Raeve i sur. pokazali su da u kliničkim uzorcima hematoloških maligniteta nije uočena prisutnost CA IX. Ovi autori navode da istraživane hematološke bolesti ili nisu hipoksični tumori i/ili da regulatorni procesi uključeni u ekspresiju gena i sintezu proteina CA IX u hematološkim tumorima nisu aktivirani. Također, moguće je da druge ugljične anhidraze, primjerice CA II, koja je normalno eksprimirana u hematopoetskom sustavu, mogu zamijeniti ulogu CA IX (13). Slično je pokazala i studija od strane Stewarta i sur. u kojoj je ekspresija CA IX bila istraživana na ne-Hodgkinovom limfomu. Oni su, također, na kliničkim uzorcima pokazali slabu ekspresiju CA IX unatoč povišenoj razini HIF-1 $\alpha$  ekspresije (14). S druge strane u istraživanju Qi Chena i sur. na B-staničnim limfomima zabilježena je umjerena razina ekspresije. U tom istraživanju provedena je i indukcija CA IX ekspresije potaknuta hipoksijom *in vitro* u staničnim linijama Raji, Ramos i Granta-519. Pokazali su da hipoksija utječe na povećanu ekspresiju CA IX u

svim ispitivanim linijama. CA IX i HIF eksprimirani su u limfomima, međutim, nisu nužno povezani te nije u potpunosti jasan način na koji HIF utječe na ekspresiju CA IX, što ostavlja otvoren prostor za daljnja istraživanja (15). Osim CA IX u velikom broju maligniteta izoforma CA XII povezuje se s razvojem tumora. Istraživanje Ivanova i sur. pružilo je opsežnu komparativnu analizu kombinirane ekspresije ovih dvaju proteina u tumorima. Pozitivna ekspresija CA IX i CA XII bila je izražena u staničnoj liniji K562, dok je u drugim staničnim linijama leukemijskog tipa HL60, CCRF-CEM, U937, HCT-116 te Raji ekspresija CAIX/CAXII bila negativna (16). Kod T-staničnih akutnih limfoblastičnih leuemija/limfoma CA IX slabije je eksprimiran u odnosu na CA XII izoformu te je inhibicija CA XII smanjila staničnu proliferaciju i inducirala apoptozu u tim stanicama, istaknuli su Lounnas i sur. u svojoj studiji (17).

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi imaju li derivati kumarina sposobnost utjecati na ekspresiju gena CA IX te ispitati njihovo djelovanje na katalitičku aktivnost ovog enzima. Dobiveni rezultati pokazali su smanjenje genske ekspresije u tretiranim stanicama u odnosu na kontrolne stanice. Novija istraživanja obuhvaćaju u većem broju ispitivanje antitumorskog efekta kumarina na staničnim linijama reprezentativnim za solidne tumore, posebice dojke, pluća i debelog crijeva, dok su ispitivanja na leukemijskim staničnim linijama slabije zastupljena. Dobiveni rezultati u skladu su sa starijom studijom autora Marshalla i sur. koja je pokazala kako derivati kumarina, odnosno kumarin i njegov glavni metabolit 7-hidroksikumarin djeluju na inhibiciju rasta sljedećih staničnih linija: ACHN, Caki-2, A549, HCT-15, COLO-232, LNCaP, PC-3, Du 145, H727, Dakiki, Hs-Sultan, RP-1788, K562, HL-60 (18). Nadalje Siegers i sur. ispitali su efekt djelovanja kumarina i 7-hidroksikumarina na HepG2, Caco-2 i staničnoj liniji CCRF-CEM i ustanovili da djeluju inhibitorno na Caco-2 i staničnu liniju CCRF-CEM. Podaci su pokazali da inhibicija rasta stanica ovisi jednako i o koncentraciji ovih spojeva kao i o vremenu, te je relativno duža inkubacija potrebna kako bi se ostvario značajan inhibitorni učinak (19).

Inhibicija ugljične anhidraze IX u tumorskim stanicama predstavlja obećavajuću metu u liječenju tumora te zaslužuje daljnja istraživanja na tom području kako bi se omogućila dodatna i učinkovitija terapija onima kod kojih dosadašnja terapija nije dala željeni rezultat. Osim toga dokazano je da je kvantifikacija topljive forme proteina CA IX moguća iz medija stanica uzgojenih u kulturi te bioloških tekućina seruma i urina, no takva vrsta analize još nije pronašla primjenu u kliničkoj praksi. Cirkulirajući CA IX mogao bi biti jednostavno mjerljiv

biomarker tumorske hipoksije, a isto tako i koristan biljeg u monitoriranju pacijenata nakon operacija i pomoći u odabiru optimalne metode za terapiju (6).

## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Derivati kumarina djeluju na sniženje genske ekspresije *CA IX* u leukemijskim staničnim kulturama K562 i CCRF-CEM.
2. Postoji statistički značajna razlika u ekspresiji gena *CA IX* između kontrolnih stanica i stanica tretiranih derivatima kumarina na staničnim linijama K562 i CCRF-CEM.
3. Derivati kumarina pokazuju različito djelovanje na enzimsku aktivnost *CA IX* ovisno o staničnoj liniji.
4. A-153 derivat pokazao se najdjelotvornijim u sniženju genske ekspresije *CA IX* na staničnoj kulturi K562.
5. Derivati kumarina mogu se smatrati dobrim kandidatima za daljnja istraživanja mehanizma antitumorskog djelovanja.



## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Ugljična anhidraza IX zbog aktivne uloge u procesu tumorigeneze predstavlja obećavajuću metu za ciljanu antitumorsku terapiju, a inhibicija enzimske aktivnosti CA IX specifičnim inhibitorima od velikog je interesa istraživača. Kumarini kao spojevi širokog spektra bioloških aktivnosti pokazali su se kao dobri inhibitori CA IX enzima djelujući na narušavanje pH ravnoteže i posljedično uništenje tumorskih stanica.

**Cilj istraživanja:** Ispitati promjene u katalitičkoj aktivnosti ugljične anhidraze te promjene u ekspresiji CA IX u leukemijskim stanicama *in vitro* tretiranim derivatima kumarina.

**Materijali i metode:** Ispitan je učinak testnih derivata kumarina NS-48, NS-51, A-153 na komercijalno dostupnim humanim leukemijskim stanicama K562 i CCRF-CEM. Za određivanje promjene ekspresije CA IX gena u tumorskim stanicama korištena je metoda RT-PCR, a određivanje katalitičke aktivnosti enzima provedeno je ELISA „Sendvič“testom.

**Rezultati:** Istraživanje je pokazalo smanjenu ekspresiju gena CA IX u tumorskim stanicama tretiranim testnim derivatima kumarina na staničnim linijama K562 i CCRF-CEM. Zabilježene su niske koncentracije enzima CA IX u svim ispitivanim uzorcima, a katalitička aktivnost enzima smanjena je na staničnoj liniji K562 prema dobivenim rezultatima.

**Zaključak:** Derivati kumarina mijenjaju razinu ekspresije gena CA IX i dobri su kandidati za daljnja istraživanja antitumorskog učinka.

**Ključne riječi:** ugljična anhidraza IX, derivati kumarina, ekspresija gena, hipoksija, leukemije

## 8. SUMMARY

**Introduction:** Carbonic anhydrase IX (CA IX), due to its direct activity in the process of tumorigenesis might be used for targeted antitumor therapy, and the inhibition of enzyme activity by specific CA IX inhibitors has been of great importance for researchers. Coumarins, widespread compounds with biological activities, have been noted as good inhibitors of the CA IX enzymes, affecting the change of pH balance, and consequently resulting in the destruction of tumor cells.

**Objectives:** To investigate changes in catalytic activity of carbonic anhydrase, and also changes of CA IX expression in leukemia cells, treated *in vitro* by coumarin derivatives.

**Materials and methods:** The effect of tested coumarin derivatives NS-48, NS-51, A-153 has been examined in commercially available human leukemia cells K562 and CCRF-CEM. RT-PCR method was used to determine changes in expression of CA IX gene in tumor cells, and also determination of catalytical activity of enzyme was done by sandwich ELISA test.

**Results:** The research demonstrated reduced expression of CA IX genes treated with the test coumarin derivatives in K562 and CCRF-CEM cell lines. All tested samples show a lower concentration of enzyme CA IX and results indicate a decreased catalytical activity of enzyme on K562 cell line.

**Conclusion:** Coumarin derivatives change a level of the gene CA IX expression and they are good candidates for next researches concerning antitumor effect.

**Key words:** carbonic anhydrase IX, coumarin derivatives, gene expression, hypoxia, leukemia.

## 9. LITERATURA

1. Benej M, Pastorekova S, Pastorek J. Carbonic anhydrase IX: regulation and role in cancer. *Subcell Biochem.* 2014; 75: p. 199-219.
2. Konopleva M, Thall P, Yi C, Borthakur G, Coveler A, Bueso-Ramos C. Phase I/II study of the hypoxia-activated prodrug PR104 in refractory/relapsed acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemias. *Haematologica.* 2015; 100(7): p. 927-34.
3. Nasu K, Yamaguchi K, Takanashi T, Tamai K, Sato I, Ine S. Crucial role of carbonic anhydrase IX in tumorigenicity of xenotransplanted adult T-cell leukemia derived cells. *Cancer Sci.* 2017; 108(3): p. 435-43.
4. Thakur A, Singla R, Jaitak V. Coumarins as anticancer agents: a review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. *Eur J Med Chem.* 2015; 101: p. 476-95.
5. Mboge M, Mahon B, McKenna R, Frost S. Carbonic anhydrase: Role in pH Control and Cancer. *Metabolites.* 2018; 8(1).
6. Závada J, Zavadová Z, Zát'ovicová M, Hyršl L, Kawaciuk I. Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *Br J Cancer.* 2003; 89(6): p. 1067-71.
7. McDonald P, Winum J, Supuran C, Dedhar S. Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics. *Oncotarget.* 2012; 3(1): p. 84-97.
8. Szymczak D, Dybko J, Kuliczowski K. The role of hypoxia-inducible factors in leukemias. *Adv Clin Exp Med.* 2018; 27(2): p. 271-5.
9. Kaluz S, Kaluzová M, Liao S, Lerman M, Stanbridge E. Transcriptional control of the tumor-andhypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show? *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1795(2): p. 162-72.
10. Molnar M, Čačić M. Biološka aktivnost derivata kumarina - pregledni rad. *Croat J Food Sci Technol.* 2011; 3(2): p. 55-64.
11. Sandhu S, Bansal Y, Silakari O, Bansal G. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. *Bioorg Med Chem.* 2014; 22(15): p. 3086-14.
12. Asif M. Pharmacologically potentials of different substituted coumarin derivatives. *Chemistry International.* 2015; 1(1): p. 1-11.
13. Kastori A, Hadjipavlou-Litina D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2012-2014). *Expert Opin Ther Pat.* 2014; 24(12): p. 1323-47.

14. De Raeve H, Vermeulen P, Vanderkerken K, Harris A, Van Marck E. Microvessel density, endothelial-cell proliferation and carbonic anhydrase IX wxpression in haematological malignancies, bone-marrow metastases and monoclonal gammopathy of undermined significance. *Virchows Arch.* 2004; 445(1): p. 27-35.
15. Stewart M, Talks K, Leek R, Turley H, Pezzella F, Harris A. Expression of angiogenic factors and hypoxia inducible factors HIF 1, HIF 2 and CA IX in non-Hodgkin`s lymphoma. *Histopathology.* 2002; 40(3): p. 253-60.
16. Chen L, Howison C, Spier C, Stopeck A, Maim S, Pagel M. Assessment of carbonic anhydrase IX expression and extracellular pH in B-cell lymphoma cell line models. *Leuk Lymphoma.* 2015; 56(5): p. 1432-9.
17. Ivanov S, Liao S, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G. Expression of hypoxia-inducible cell surface transmembrane carbonic anhydrase in human cancer. *Am J Pathol.* 2001; 158(3): p. 905-19.
18. Lounnas N, Rosilio C, Nebout M, Mary D, Griessinger E, Neffati Z. Pharmacological inhibition of carbonic anhydrase XII interferes with cell proliferation and induces cell apoptosis in T-cell lymphomas. *Cancer Lett.* 2013; 333(1): p. 76-88.
19. Marshall M, Kevin K, Benefield C, Umerani A, Albainy-Jenei S, Zhao Q. Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1994; 120(Suppl): p. S3-10.
20. Weber U, Steffen B, Siegers C. Antitumor-activities of coumarin, 7-hydroxy-coumarin and its glucuronide in several human tumor cell lines. *Res Commun Mol Pharmacol.* 1998; 99(2): p. 193-206.
21. Lacy A, O`Kennedy R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Cur Pharm Des.* 2004; 10(30): p. 3797-811.
22. Jain P, Joshi H. Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. *J Appl Pharm Sci.* 2012; 2(6): p. 236-240.

## 10. ŽIVOTOPIS

**Ime i Prezime:** Senka Toplak

**Datum i mjesto rođenja:** 24. 8. 1994., Metković

**Obrazovanje:**

- 2016. – 2018. Diplomski sveučilišni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Jopisa Jurja Strossmayera u Osijeku
- 2013. – 2016. Preddiplomski stručni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Zdravstvenom veleučilištu Zagreb
- 2009. – 2013. Opća gimnazija Metković