

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Sara Berljavac

6967/BT

**DJELOVANJE NESTEROIDNIH PROTUUPALNIH
LIJEKOVA NA HUMANE STANIČNE LINIJE**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: Doc. dr. sc. Kristina Radošević

Zagreb, 2017

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

DJELOVANJE NESTEROIDNIH PROTUUPALNIH SPOJEVA NA HUMANE STANIČNE LINIJE

Sara Berljavac, 6967/BT

Sažetak: Nesteroidni protuupalni lijekovi imaju niz farmakoloških učinaka, a u posljednje vrijeme sve je više dokaza u prilog njihove primjene kao antikancerogenih lijekova. Oni mogu umanjiti ili zaustaviti proliferaciju stanica oštećenih slobodnim radikalima, koja može voditi do karcinoma, prvenstveno inhibicijom aktivnosti ciklooksigenaze, enzima ključnog u nizu fizioloških i upalnih procesa. Unatoč njihovoj dokazanoj primjeni kao lijekova protiv karcinoma i nadalje se postavljaju pitanja o njihovoj toksičnosti, sigurnosti i učinkovitosti. U ovom radu ispitan je učinak četiri nesteroidna protuupalna lijeka (ketoprofen, karprofen, fluniksin i 4-metilaminoantipirin monohidrat) primjenom *in vitro* metode i kultura stanica. Preživljenje stanica HEK293T i HepG2 određeno je primjenom kolorimetrijske MTS metode. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da ispitani lijekovi zaista imaju antiproliferativni učinak na tumorsku staničnu liniju, ali djeluju i na staničnu liniju podrijetlom iz zdravog tkiva. Također, zapaženi inhibitorski učinak ovisi o primjenjenoj dozi te o otapalu u kojem je otopljena djelatna tvar.

Ključne riječi: antitumorsko djelovanje, humane stanične linije, *in vitro* citotoksičnost, nesteroidni protuupalni lijekovi

Rad sadrži: 30 stranica, 12 slika, 1 tablicu, 24 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Doc.dr.sc. Kristina Radošević

Datum obrane: srpanj, 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of Bioengineering

Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

THE EFFECT OF NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS ON HUMAN CELL LINES

Sara Berljavac, 6967/BT

Abstract: Non-steroidal anti-inflammatory drugs have a number of pharmacological effects and recently there are evidences of their use as anticancer drugs. They can reduce or stop the proliferation of free radical-depleted cells, which could lead to a cancer, primarily by inhibiting cyclooxygenase activity, a key enzyme in a number of physiological and inflammatory processes. Despite their proven use as a anticancer drug, further questions are raised about their toxicity, safety and efficiency. In this work, four nonsteroidal anti-inflammatory drugs (ketoprofen, carprofen, flunixin and 4-methylaminoantipyrine monohydrate) were tested using the *in vitro* method and cell culture. The survival of HEK293T and HepG2 cells was determined using a colorimetric MTS method. Based on the obtained results we can conclude that the tested drugs indeed have an antiproliferative effect on the tumor cell line, but also have effect on the cell line from a healthy tissue. The observed inhibitory effect depends on the administered dose and the solvent in which the active substance is dissolved.

Keywords: antitumor activity, human cell lines, *in vitro* cytotoxicity, nonsteroidal anti-inflammatory drugs

Thesis contains: 30 pages, 12 figures, 1 table, 24 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ph.D. Kristina Radošević, Assistant professor

Defence date: July, 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Nesteroidni protuupalni lijekovi	2
2.1.1. Antitumorska aktivnost nesteroidnih protuupalnih lijekova	3
2.1.2. Mehanizam djelovanja nesteroidnih protuupalnih lijekova.....	4
2.2. Kulture životinjskih stanica, njihov uzgoj i primjena	5
2.2.1. Primjena kultura životinjskih stanica u toksikološkim istraživanjima	7
2.2.2. <i>In vitro</i> ispitivanja antitumorske aktivnosti primjenom kultura stanica	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	10
3.1. Materijali	10
3.1.1. Kemikalije	10
3.1.2. Otopine i puferi	10
3.1.3. Uređaji i oprema.....	11
3.1.4. Humane stanične linije.....	11
3.1.5. Nesteroidni protuupalni lijekovi.....	12
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Uzgoj stanica.....	13
3.2.2. Određivanje broja stanica pomoću boje tripan-plavo.....	13
3.2.3. Nacjepljivanje i tretman HEK293T i HepG2 stanica.....	14
3.2.4. MTS metoda za određivanje preživljenja stanica	15
3.2.5. Bojanje stanica otopinom kristal-ljubičasto	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Učinak nesteroidnih protuupalnih lijekova otopljenih u etanolu na HEK293T i HepG2 stanice ..	17
4.2. Učinak nesteroidnih protuupalnih lijekova otopljenih u mediju za uzgoj stanica na HEK293T i HepG2 stanice	19
4.3. Učinak nesteroidnih protuupalnih lijekova otopljenih u eutektnom otapalu na HEK293T i HepG2 stanične linije	21
4.4. Morfologija HEK293T i HepG2 stanica tretiranih NSAID-ovima otopljenim u različitim otapalima	23
5. ZAKLJUČCI.....	27
6. LITERATURA	28

1. UVOD

Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID, eng. *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*) skupina su farmaceutika koji imaju analgetsko, protuupalno i antipiretsko djelovanje. Jedna su od najčešće rabljenih skupina lijekova kako u humanoj, tako i u veterinarskoj medicini. NSAID, koji uključuju aspirin (acetilsalicilna kiselina), indometacin, piroksikam, sulindak i ibuprofen, su strukturno različiti spojevi sličnog djelovanja te se koriste za liječenje prvih znakova i simptoma upala, astme, ateroskleroze, artritisa.

Primjena ovih lijekova započinje 1898. godine kada su sintetizirani prvi spojevi. NSAID-i se međusobno razlikuju po kemijskoj strukturi te mogu biti derivati feniloctene i propionske kiseline, indoli, fenemati i oksikami. Ovi lijekovi primarno inhibiraju aktivnost enzima ciklooksigenaze, ključnog enzima u biosintetskom putu prostaglandina, signalnih molekula koje su uključene u niz fizioloških procesa te upalni proces. Upalni odgovor dovodi do aktiviranja mastocita i leukocita na mjestu oštećenja nakon čega slijedi otpuštanje slobodnih radikala, uključujući i reaktivne kisikove vrste. Dobro je poznato da slobodni radikali oštećuju makromolekule, lipide i DNA što za posljedicu ima oslobađanje eikozanoida, molekula koje pokreću proliferaciju stanica. Obzirom da NSAID-i inhibiraju nastajanje nekih eikozanoida brojna eksperimentalna, epidemiološka i klinička istraživanja ukazuju na obećavajuće djelovanje NSAID-a kao antikancerogenih lijekova. Unatoč brojnim znanstvenim radovima o mogućoj primjeni NSAID-a kao lijekova protiv karcinoma i nadalje se postavljaju pitanja o njihovoj sigurnosti, učinkovitosti, mehanizmima djelovanja i optimalnom načinu primjene u tu svrhu, stoga su nužna daljnja istraživanja te problematike. Kako bi se mogao predvidjeti mogući učinak NSAID-a, razina toksičnosti te procijeniti rizik za ljude, životinjski i biljni svijet te okoliš, prati se (eko)toksikološki učinak NSAID-a u *in vivo* i *in vitro* sustavima. Primjena kultura stanica odnosno *in vitro* toksikološka ispitivanja imaju niz prednosti nad *in vivo* sustavima te služe kako preliminarni testovi toksičnosti, zbog kojih je posljedično potrebno koristiti manji broj pokusnih životinja, što je i glavni razlog poticanja primjene *in vitro* testova.

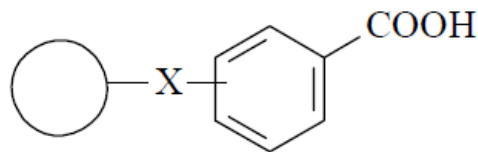
Stoga smo u ovom radu željeli ispitati djelovanje četiri NSAID-a otopljeni u različitim otapalima primjenom *in vitro* metode i humanih kultura stanica. Ispitivano je inhibitorno djelovanje ketoprofena, karprofena, fluniksina i 4-metilaminoantipirin monohidrata na humane stanične linije HEK293T i HepG2 primjenom kolorimetrijske MTS metode sa ciljem određivanja njihovog mogućeg antitumorskog djelovanja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Nesteroidni protuupalni lijekovi

Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID) koriste se za ublažavanje boli te ograničavanja trajanja i intenziteta upale. Strukturno su to različiti spojevi, ali sličnog djelovanja s analgetskim, protuupalnim, antipiretskim i antitrombotskim djelovanjem. Njihova primjena započinje 1898. godine, a danas je to jedna od najčešće rabljenih skupina lijekova u humanoj i u veterinarskoj medicini.

Po kemijskoj strukturi NSAID-i se mogu podijeti na salicilate, derivate propionske kiseline, aril i heteroariloctene kiseline, antranilate, oksikame, fenilpirazole i aniline. Općenito se sastoje od kiselinskog ostatka (karboksilne kiseline, enola) vezanog na planarnu, aromatsku skupinu. Neki od njih sadrže polarnu veznu skupinu koja planarnu skupinu pričvršćuje na dodatnu lipofilnu grupu kako prikazuje slika 1.



Slika 1. Osnovna struktura nesteroidnih protuupalnih lijekova (DeRuiter, 2002)

Iz navedene kemijske strukture proizlaze (bio)kemijska i farmakološka svojstva NSAID-a:

- Većina NSAID-a sadrži karboksilne kiseline, a sve jake organske kiseline imaju pK u rasponu od 3 do 5.
- Razlikuju se po lipofilnosti na temelju lipofilnog karaktera arilne skupine i adiranih lipofilnih ostataka i supstituenata.
- Kisela skupina je glavna vezna skupina za vezanje s proteinima. Svi NSAID-i se u plazmi vežu na proteine jakim ionskim vezama.
- Put uklanjanja većine NSAID-a iz organizma je inaktivacija glukorinizacijom nakon čega slijedi njihovo izlučivanje pomoću bubrega.

2.1.1. Antitumorska aktivnost nesteroidnih protuupalnih lijekova

U proteklih 30-tak godina intenzivno se istražuje mogućnost primjene NSAID-a kao antikancerogenih lijekova te je iznijet niz zanimljivih dokaza o njihovom obećavajućem djelovanju (Taketo, 1998; Janne i Mayer, 2000). Podaci iz epidemioloških studija, intervencijskih pokusa i istraživanja na životinjama pokazuju da aspirin i drugi NSAID-i inhibiraju kolorektalnu karcinogenezu (Giovannucci, 1999). Godine 1980., objavljeno je da indometacin inhibira tumorski rast u kemijskim induciranim tumorima debelog crijeva štakora, a ovi rezultati su replicirani na drugim istraživanjima na glodavcima. Također, eksperimentalno je pokazano da stimuliraju apoptozu tumorskih stanica i inhibiraju angiogenezu, dva važna mehanizma koja pridonose suzbijanju maligne transformacije i rasta tumora.

Prvo epidemiološko istraživanje datira iz 1988. godine, kada je ustanovljeno da se rizik od razvoja karcinoma debelog crijeva smanjuje upotrebom aspirina. Dokazi o ulozi NSAID-a u kemoprevenciji raka debelog crijeva potkrijepljeni su s dva pokusa koji su testirali može li aspirin biti učinkovit u sekundarnoj prevenciji, odnosno, može li smanjiti metakrozne lezije među pacijentima s primarnim kolorektalnim adenomima ili kolorektalnim karcinomom. U tim istraživanjima mjerila se učestalost novih incidentnih slučajeva neke bolesti među 1121 bolesnika s nedavnom poviješću histološki dokumentiranih adenoma i 635 bolesnika s ranijim kolorektalnim karcinomom. Među pacijentima s prethodnim adenomima, aspirin je imao umjeren zaštitni učinak na rizik od razvoja novih adenoma ili raka. Zaštitni učinak se razlikovao ovisno o primjenjenoj dozi: manja doza (81 mg dan⁻¹) bila je povezana s 19% smanjenjem rizika od adenoma, dok veća doza (325 mg dan⁻¹) nije bila povezana sa smanjenjem rizika od adenoma. U pokusu kojim je ispitivana zaštita od ponovnog pojavljivanja karcinoma korištena je doza od 325 mg dan⁻¹. Rezultati te studije ukazali su da je aspirin bio vrlo učinkovit kemoprevencijski agens među pacijentima s rakom (Baron, 2003; Sandler, 2003).

Osim s karcinomom crijeva, prisutnost upalnih procesa također se povezuje s razvojem drugih tipova karcinoma. Epidemiološki dokazi navode da je upotreba NSAID-a korisna i u prevenciji raka jednjaka i želuca te je obećavajuća njihova primjena i protiv karcinoma prostate, jajnika i pluća (Corley i sur., 2003; Mahmud i sur., 2004; Holick i sur., 2003). Do sada je najviše opisanih dokaza za kemoprevenciju raka debelog crijeva, a za ispitivanje kemopreventivnog potencijala NSAID-a protiv drugih vrsta karcinoma potrebna su daljnja znanstvena istraživanja.

2.1.2. Mehanizam djelovanja nesteroidnih protuupalnih lijekova

Nesteroidni protuupalni lijekovi imaju nekoliko farmakoloških učinaka. Ono što je zajedničko cijeloj skupini NSAID-a je inhibitorno djelovanje na aktivnost enzima ciklooksigenaze (COX). Inhibicijom COX enzima NSAID-i blokiraju sintezu prostaglandina. Dvije su glavne izoforme COX enzima: COX-1 i COX-2. COX-1 i COX-2 su bifunkcionalni enzimi koji su ključni za sintezu prostaglandina. Prva reakcija sinteze prostaglandina je pretvorba arahidonske kiseline u prostaglandin G₂ (PGG₂), a naknadna reakcija peroksidacije pretvara PGG₂ u prostaglandin H₂ (PGH₂), koji je prekursor niza tromboksana i prostaglandina. COX-1 je konstitutivna ciklooksigenaza koja je prisutna u većini tkiva uključujući endotelne stanice, stanice želučane sluznice, krvne pločice i stanice bubrega te sudjeluje u sintezi prostaglandina koji djeluju kao homeostatički regulatori. COX-2 je inducibilni enzim koji nije normalno prisutan u većini stanica, ali se njegova ekspresija povećava kod upalnih podražaja. NSAID-i su kategorizirani po selektivnoj inhibiciji ta dva izoformna oblika ciklookcigenaze. Neselektivni NSAID-i inhibiraju i COX-1 i COX-2 (aspirin, ibuprofen, naproksen), dok selektivni NSAID-i inhibiraju samo COX-2 (celekoksib). Selektivni nesteroidni protuupalni lijekovi imaju jednak farmakološki učinak kao i neselektivni, ali s manje neželjenih nuspojava tj. manje oštećuju želučanu sluznicu i ne uzrokuju krvarenja.

Prostaglandini spadaju u skupinu eikozanoida, lipidnih signalnih molekula građenih od arahidonske kiseline i drugih visoko nezasićenih masnih kiselina. Oni se proizvode u većini ljudskih tkiva i imaju važnu ulogu kod upala i reguliranja drugih fizioloških procesa, uključujući zgrušavanje krvi, zacjeljivanje rana, imunološki odgovor, metabolizam kostiju i rast živčanih stanica (Mead i sur., 1986). Prostaglandini djeluju kao autokrino tj. djeluju na stanicu koja ih luči te parakrino tj. djeluju na susjedne stanice. Neoplastična tkiva, uključujući i humani karcinom debelog crijeva, sadrže visoke koncentracije prostaglandina (Gupta i Dubois, 2001). Prekomjerna ekspresija COX-2 također se uočena i kod nekoliko drugih malignih tumora. Otkriveno je da enzim koji degradira prostaglandine, 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaza, nedostaje u tumorskim stanicama debelog crijeva što u stanicama raka rezultira većom proizvodnjom prostaglandina (Yan, 2004; Backlund, 2005).

Nesteroidni protuupalni lijekovi, u visokim koncentracijama, osim na ciklooksigenaze 1 i 2, mogu djelovati i na niz drugih staničnih procesa. Jedan od njih je inhibicija aktivnosti 5-lipoksigenaze pomoću oslobođenog dušikovog oksida i posljedično tome, smanjenje proizvodnje leukotriena. Mogu izazvati apoptozu, ali i aktivirati PPAR δ gen. PPAR δ gen kodira za APC- β -katenin protein koji je odgovoran za degregaciju β -katenina, čija je uloga aktivacija

onkogeni odgovorni za rast stanice. Utvrđeno je da je gen koji kodira za APC protein (eng. *Adenomatous Polyposis Coli*) mutiran kod osoba koje imaju familijarnu adenomatoznu polipozu (FAP). Stoga je veoma važno i nadalje istraživati mehanizme djelovanja NSAID-a koji se povezuju s njihovim antitumorskom aktivnošću. Međutim, koncentracije NSAID-a potrebne za induciranje ovakvih mehanizama djelovanja znatno su više od onih koje su potrebne za inhibiciju ciklooksigenaze. Stoga je kod primjene viših doza velik rizik od izazivanja toksičnosti, što naravno nije isključeno i kod korištenja manjih doza. Također, velik je rizik od gastrointestinalnih krvarenja i negativnog djelovanja na bubrege te je klinička primjena ovih lijekova s ciljem liječenja tumora i dalje ograničena. Potrebno je provesti još mnogo istraživanja i odgovoriti na brojna pitanja o mehanizmu djelovanja, optimalnoj dozi, načinu liječenja te pronaći ravnotežu između rizika i učinkovitosti lijeka.

2.2. Kulture životinjskih stanica, njihov uzgoj i primjena

Kultura tkiva je pojam koji opisuje izuzimanje stanica, tkiva ili organa iz životinje ili biljke i njihovo presađivanje u okoliš s kontroliranim uvjetima koji sadrži medij potreban za njihov rast. Prvu životinjsku staničnu kulturu je uspostavio Ross Harrison 1907. godine, no tek od 1940. do 1950. godine je došlo do značajnijeg razvoja i kulture stanica su postale dostupnije znanstvenicima. Danas stanične kulture predstavljaju važan „alat“ koji se koristi u različitim znanstvenim istraživanjima, od onih temeljnih do primjenjenih. Kulture stanica danas se koriste za fiziološka ili biokemijska istraživanja; ispitivanje učinaka različitih tvari poput hormona, metabolita ili faktora rasta na specifičnim tipovima stanica; proizvodnju umjetnih tkiva (umjetna koža); sintezu visokovrijednih proizvoda u većoj količini poput virusnih cjepiva, monoklonskih protutijela i drugih proizvoda biotehnološke industrije (Butler, 2004).

Primarna kultura stanica nastaje kada se tkivo izuzme iz organizma, mehanički i enzimski obradi kako bi se dobile pojedinačne stanice te nacijepe u medij pogodan za uzgoj gdje se one pričvrste, dijele i rastu. Primarna kultura najbližnja je izvornom tkivu tj. *in vivo* stanicama. S obzirom da su tako izuzete stanice adherentnog tipa, kako bi rasle i djelile se, ključan korak je njihovo prihvaćanje za površinu za rast. Nakon što su stanice u primarnoj kulturi dovoljno narasle i popunile sav prostor potrebno je provesti subkultiviranje. Subkultiviranje je precijepivanje stanica u novu, veću posudu za uzgoj uz dodatak novog, svježeg medija za uzgoj kako bi imale dovoljno mjesta i hranjivih tvari. Primarne se kulture

smatraju primarnim sve dok se višestrukom subkultivacijom ne postignu svojstva stanične linije (Freshney, 2000). Konačna stanična linija će nakon određenog broja subkultiviranja odumrijeti zbog skraćivanja telomera te se nakon toga stanice više ne dijele (iznimke su transformirane stanice, matične i spolne stanice). Transformacijom životinjskih stanica omogućava se njihov neograničeni rast i tada ih smatramo kontinuiranim staničnim linijama. Karakteristike transformiranih (kontinuiranih) stanica su uspješna proliferacija, neograničeni životni vijek, promijenjena morfologija i metabolizam stanica, smanjena potreba za serumom, brži rast (Freshney, 2000). Primjenom postupaka selekcije ili kloniranja staničnih linija nastaje populacija genetički jednakih stanica koja se naziva stanični soj. Karakteristike kultiviranih stanica rezultat su njihovog podrijetla i o tome ovisi kako će se brzo prilagoditi i opstati u *in vitro* uvjetima u kulturi. Ovisno u promjenama kojima su stanice bile izložene tijekom prilagodbe od primarne kulture stanica pa do kontinuirane stanične linije ili staničnog soja, one se mogu manje ili više razlikovati od izvornih stanica u organizmu. Pomoću biokemijskih markera i genskih testova može se provjeriti imaju li stanice u kulturi još uvijek specifične funkcije koje imaju ishodne stanice *in vivo*.

Prilikom kultivacije životinjskih stanica potrebno je paziti da ne dođe do kontaminacije mikroorganizmima, tako da sve radnje izvode u komori za sterilni rad, a svo posuđe i pribor koje se koristi mora biti sterilno. Za dobar rast i razvoj stanica u kulturi potrebno je ostvariti *in vitro* uvjete što sličnije onima koje su stanice imale *in vivo*, odnosno u izvornom mediju za uzgoj, stanicama je potrebno osigurati optimalne fizikalno-kemijske uvjete, koji ovise o staničnoj liniji koja se uzgaja. Većina staničnih linija sisavaca rastu pri pH 7,4 dok je optimalan raspon osmotskog tlaka 260-320 mOsm/kg. Idealna atmosfera za uzgoj životinjskih stanica sadrži 5%-7% CO₂, a osigurava se uzgojem stanica u inkubatoru s kontroliranom atmosferom. Za većinu ljudskih staničnih linija i staničnih linija sisavaca optimalna temperatura uzgoja je 36 °C-37 °C, dok su temperature pri kojima se uzgajaju stanične linije riba nešto niže, uglavnom od 18 °C-30 °C, jer optimalna temperatura za uzgoj životinjskih stanica ovisi o tjelesnoj temperaturi organizma iz kojeg stanice potječu.

Prvotni medij koji se koristio za uzgoj kultura stanica sastojao se od komponenti čiji kemijski sastav nije bilo moguće točno definirati, poput plazme, seruma i embrionalnog ekstrakta. Veliki napredak je postignut 1955. godine kada je Harry Eagle opisao formulaciju prvog kemijski definiranog medija za uzgoj stanica u kulturi. Izbor odgovarajućeg medija jedan je od najbitnijih čimbenika za uspješnost uzgoja životinjskih stanica u kulturi, a njegov sastav ovisi o tipu stanica i o namjeni uzgoja. Glavni sastojci hranjivog medija potrebni za rast i razmnožavanje stanica su ugljikohidrati, aminokiseline, anorganske soli i vitamini.

Mediji koji se danas najčešće koriste su: BME (*Basal Medium Eagle's*) oblikovan 1955. godine za miše L i humane HeLa stanice; EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) oblikovan kao poboljšanje BME; DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*) i GMEM (*Glasgow's Modification of Eagle's Medium*) koji sadrže veću koncentraciju aminokiselina i vitamina od EMEM i BME. Za rast i razmnožavanje stanica u kulturi koristi se medij točno definiranog sastava, kojem se najčešće dodaje serum sisavaca u volumnom udjelu 5-10 %. Serum se dobiva zgrušavanjem krvi životinjskog podrijetla, a služi prvenstveno kao izvor raznih proteina i polipeptidnih faktora rasta koji stimuliraju staničnu diobu i ključni su u procesima diferencijacije i stanične komunikacije. Serum je iznimno složenog i kemijski nedefiniranog sastava, skup je te je glavni izvor kontaminacija. Zbog navedenih i nekih drugih nedostataka uporabe seruma, kao što je npr. okrutnost prema životinjama (etički razlozi), nastoji se smanjiti upotreba seruma te se iz godine u godinu povećava primjena medija bez seruma (SFM, *serum-free media*). Medij bez seruma je selektivan i specifičan za određeni tip stanica te je održavanje različitih staničnih linija u laboratoriju otežano, jer svaki tip stanica zahtijeva posebnu formulaciju i sastav SFM. Ostali nedostaci primjene SFM su sporiji rast staničnih linija, manji prinos i ograničeni životni vijek stanica.

2.2.1. Primjena kultura životinjskih stanica u toksikološkim istraživanjima

Kao što je već spomenuto kulture životinjskih stanica imaju široku primjenu. Koriste se kao modelni sustavi za osnovnu staničnu biologiju i biokemiju, u području biomedicine za proučavanje interakcija između uzročnika bolesti i stanice, procesa i uzročnika starenja te u nutritivnim istraživanjima, genetskom inženjerstvu i genskoj terapiji. Također se koriste i različitim toksikološkim istraživanjima, kod testiranja toksičnosti raznih novosintetiziranih kemikalija pri čemu se prati preživljenje više različitih staničnih linija. Sve više se pažnja pridaje i korištenju kultura životinjskih stanica sa ciljem otkrivanja novih antitumorskih lijekova i njihove citotoksičnosti.

In vitro sustavi su idealni za praćenje molekularnih, staničnih i fizioloških mehanizama tijekom ispitivanja toksičnosti nekog spoja koja se ne može proučavati *in vivo*. *In vitro* sustavi razvijeni su kao alternativa ispitivanju toksičnosti na životinjama. Uključuju ispitivanja na različitim staničnim frakcijama, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva, kulturama organa itd. Prednosti primjene kultura životinjskih stanica u toksikološkim istraživanjima su bolja kontrola modelnog sustava, jeftiniji su, toksičnost se

može uočiti puno brže, moguće je učinkovito i brzo testirati veliki broj kemikalija u širokom rasponu koncentracija te se u konačnici smanjuje potreba za brojem pokusnih životinja u *in vitro* testiranjima (Kniewald i sur., 2005). U ekotoksikološkim istraživanjima, proučavanje djelovanja spojeva na stanice je vrlo važno jer se primarna interakcija između kemikalije i organizma odvija na površini ili unutar stanice, što je i osnova na kojoj se temelji primjena kultura stanica i *in vitro* testova. Ukoliko se utvrdi štetan učinak na stanicu, može se zaključiti da će učinak biti štetan i na višim razinama biološke organizacije budući da je utvrđena dobra korelacija rezultata dobivenih u brojnim *in vivo* i *in vitro* studijama (Fent, 2001). U *in vitro* testovima toksičnosti najčešće se određuje bazalna citotoksičnost koja je definirana kao učinak nastao međudjelovanjem ispitivane tvari i procesa neophodnih za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu (Ekwall, 1995).

2.2.2. *In vitro* ispitivanja antitumorske aktivnosti primjenom kultura stanica

Nacionalni institut za rak (NCI, eng. *National Cancer Institute*) je 1990. godine predložio primjenu tumorskih staničnih linija za ispitivanje različitih tvari od kojih se očekuje antitumorsko djelovanje. Utemeljen je test u kojem se primjenjuje 60 različitih humanih staničnih linija na kojima se testiraju spojevi, nosintetizirani ili izolirani iz prirodnih izvora, ali i razni biljni ekstrakti ili frakcije, u širokom rasponu koncentracija kako bi se ustanovilo ima li koja od njih inhibitorni ili citotoksični učinak na tumorske stanične linije. Od 1990. godine do danas ispitano je više od 30 000 spojeva primjenom tog preliminarnog testa. Tretman može trajati 24, 48 ili 72 sata i nakon toga slijedi primjena najčešće neke kolorimetrijske metode i određivanje postotka preživljenja stanica, odnosno inhibicije rasta kao posljedice djelovanja ispitivanog spoja. Primjena NCI metode je vrlo važna u *in vitro* istraživanjima, jer olakšava otkrivanje novih antikancerogenih lijekova i odabir onih spojeva koji imaju potencijal za daljnja *in vivo* istraživanja (Boyd i Paull, 1995).

U raznim istraživanjima, ispitana je i *in vitro* antitumorska aktivnost nekih NSAID-a. Jedna studija je ispitala djelovanje derivata hidroksamske kiseline (ibuproksam i oksametacin). Navedenim lijekovima tretirane su stanice HeLa (karcinom vrata maternice), SW620 (karcinom debelog crijeva), MIA Pa Ca-2 (karcinom gušterače), MCF-7 (karcinom dojke), WI38 (normalna diploidna humana stanična linija vezivnog tkiva) te L1210, Molt4/C8 i CEM stanice (limfocitna leukemija). Rezultati su pokazali da NSAID-i, derivati hidroksamske kiseline, imaju antiproliferativni učinak na testirane stanične linije i da je taj učinak izražen pri

koncentraciji od $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. No, nemaju svi testirani NSAID lijekovi jednak učinak na stanične linije, a djelovanje im je također ovisno o dozi (Rajic i sur., 2009). Druga studija je istraživala zajednički učinak aspirina i reversina na HeLa i U14 stanične linije. Poznato je da aspirin može inducirati apoptozu nekih kancerogenih stanica, no više doze tog lijeka uzrokuju nuspojave poput gastrointestinalnih čireva i krvarenja. Reversin je jedan od jeftinih alternativnih lijekova za oralnu uporabu kod liječenja karcinoma dojke, a u ovoj studiji je testirano može li zajedno s aspirinom učinkovito djelovati i na suzbijanje karcinoma vrata maternice. Rezultati su pokazali da aspirin i reversin inhibiraju rast tumorskih stanica vrata maternice u ovisnosti o primjenjenoj koncentraciji, što ukazuje na njihov sinergistički antitumorski učinak. Također, dokazano je i da je njihov inhibicijski učinak veći kada se koriste zajedno nego pri pojedinačnoj primjeni (Qin i sur., 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- 0,25 % Trypsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- Trypsin-plavo, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Kristal-ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH
- CellTiter 96[®] A_{Queous} One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, SAD
- Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev hidroksid, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Nesteroidni protuupalni lijekovi: Ketoprofen (KTP), Karprofen (CPF), Fluniksin (FLU), 4-metilaminoantipirin monohidrat (MAA), Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- euteklično otapalo kolin klorid:ksilitol (Ch:Xyol) 50%, Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF, Zagreb, RH

3.1.2. Otopine i puferi

- PBS pufer (pH=7,4)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Destilirana voda	do 1000 mL

- 0,4 % otopina tripan-plavo

boja tripan-plavo	0,04 g
PBS pufer	do 10 mL

- 0,2 % otopina kristal-ljubičasto

boja kristal-ljubičasto	0,02 g
2 % etanol	do 10 mL

3.1.3. Uređaji i oprema

- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Dyno-Eye digital camera, ANMO Electronics Corporation, Tajvan
- T-boce od 25 cm², Corning, SAD
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Hladnjak (-75 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka
- Digitalna vaga Tehnica ET-1111, Železnik, Slovenija
- Digitalna vaga AX200, Shimadzu Co., Japan
- Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichert, NY, SAD
- Laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše)

3.1.4. Humane stanične linije

Stanične linije korištene u ovom pokusu su HEK293T i HepG2. HepG2 stanična linija iz ATCC banke stanica uspostavljena je iz epitelnih stanica jetre, izvedenih iz hepatocelularnog karcinoma. HEK293T stanična linija iz ATCC banke stanica uspostavljena je iz epitelnih stanica bubrega embrija, izvedenih iz zdravog tkiva. Za uzgoj obje stanične linije potrebni su kontrolirani uvjeti u inkubatoru s atmosferom od 95% zraka i 5% CO₂ te temperaturom od 37 °C. Preporučeni medij za uzgoj stanica je ATCC-formuliran EMEM uz dodatak seruma

goveđeg fetusa do konačne 10% koncentracije. Za HEK293T stanice potreban je još dodatak 2 mmol L⁻¹ glutamina i 1% penicilina/streptomicina. U ovom radu stanice su uzgajane u DMEM mediju uz dodatak 10% FBS-a, bez korištenja antibiotika/antimikotika.

3.1.5. Nesteroidni protuupalni lijekovi

U radu su korišteni nesteroidni protuupalni lijekovi koji su za potrebe eksperimenta otopljeni u etanolu, mediju za uzgoj stanica i eutektnom otapalu kolin klorid:ksilitolu (Ch:Xyol) s udjelom vode od 50% koji je prethodno sintetiziran u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF, Zagreb. Pripremljene su ishodne otopine pojedinog NSAID-a u svakom od navedenih otapala kako je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Pregled nesteroidnih protuupalnih lijekova korištenih u radu

Nesteroidni protuupalni spojevi			
IME	KRATICA	MOLARNA MASA (g mol ⁻¹)	ISHODNE OTOPINE masene koncentracije (mg mL ⁻¹)
Ketoprofen	KTP	254,281	1
Karprofen	CPF	273,714	1
Fluniksin	FLU	296,24	1
4-metilaminoantipirin monohidrat	MAA	217,27	0,5

3.2. Metode

Tijekom rada s kulturama stanica u laboratoriju je potrebno koristiti sterilne tehnike rada i sterilan pribor te održavati aseptične uvjete kako nebi došlo do kontaminacije stanica. Rad sa stanicama provodi se u laminaru, a radnu površinu i ruke je prije rada potrebno prebrisati 70% etanolom.

3.2.1. Uzgoj stanica

Sve stanične linije navedene u poglavlju 3.1.4. čuvane su na -70 °C. Najprije je potrebno odmrznuti ampulu stanica uranjanjem u kupelj na 37 °C. Nakon odmrzavanja stanice se centrifugiraju pri 1000 okretaja min⁻¹ kroz 3 minute, kako bi se uklonio sav medij za zamrzavanje te se talog stanica resuspendira u svježem mediju za uzgoj uz dodatak 10% FBS. Stanice se održavaju u petrijevoj zdjelici, u inkubatoru s reguliranom atmosferom koja sadrži 95% zraka i 5% CO₂ pri temperaturi od 37 °C. Uzgoj se svakodnevno prati inverznim mikroskopom, a stanice je potrebno precjepljivati kada površina petrijeve zdjelice bude prekrivena oko 80%, budući da su HEK293T i HepG2 stanice adherentnog tipa treba paziti da stanice ne uđu u stacionarnu fazu rasta zbog kontaktne inhibicije. Najbolje je stanice održavati u eksponencijalnoj fazi rasta stoga su pasažirane otprilike svaka 3-4 dana.

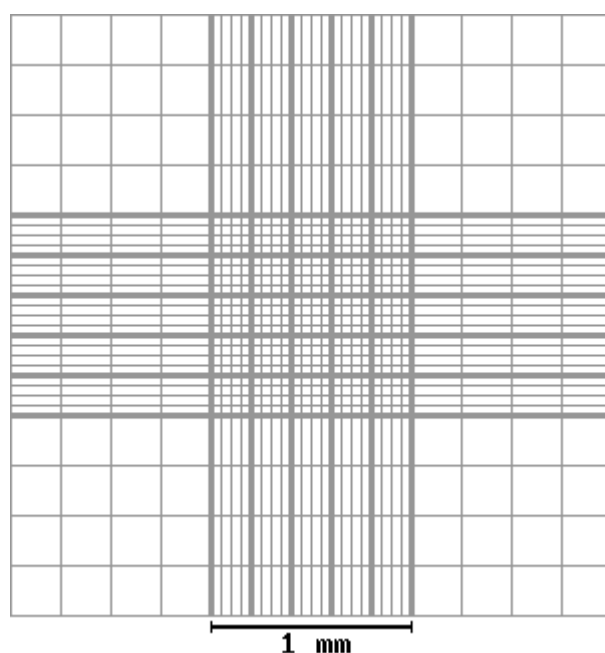
3.2.2. Određivanje broja stanica pomoću boje tripan-plavo

Kod određivanja broja stanica najprije je potrebno ukloniti hranjivi medij u kojem se stanice uzgajaju i zatim dodati 1 mL tripsina, proteolitičkog enzima koji služi za odvajanje adherentnih stanica od podloge za uzgoj. Petrijevka sa stanicama i tripsinom vraća se u inkubator na 37 °C na 5 do 10 minuta. Nakon inkubacije, pod inverznim mikroskopom provjeri se djelovanje tripsina. Prihvaćene stanice u su nepravilnog, romboidalnog i izduljenog oblik, dok su stanice odvojene djelovanjem tripsina pravilnog i kružnog oblika te plutaju u njemu. Nakon što su se stanice odvojile, dodaje se 1 mL medija kako bi se zaustavila reakcija tripsinizacije. Uzme se 20 µL tako pripremljene suspenzije stanica i doda se 20 µL boje tripan-plavo te se dobro resuspendira. U Neubauerovu komoricu za brojanje (Slika 2) nanese se tako pripravljena obojena suspenzija stanica. Neubauerova komorica se sastoji od 9 kvadrata (Slika 3) površine 0,0025 mm² i dubine 0,1 mm. Stanice se broje u 4 kvadrata koji se nalaze na kutevima velikog kvadrata i podijeljeni su na 16 (4x4) malih kvadrata. Broj stanica se računa prema formuli :

$$\boxed{\text{Broj stanica mL}^{-1} \text{ suspenzije} = \text{broj stanica izbrojenih u sva 4 kvadrata} \times 5000} \quad (1)$$



Slika 2. Neubaerova komorica za brojanje stanica



Slika 3. Podjela Neubaureove komorice za brojanje stanica

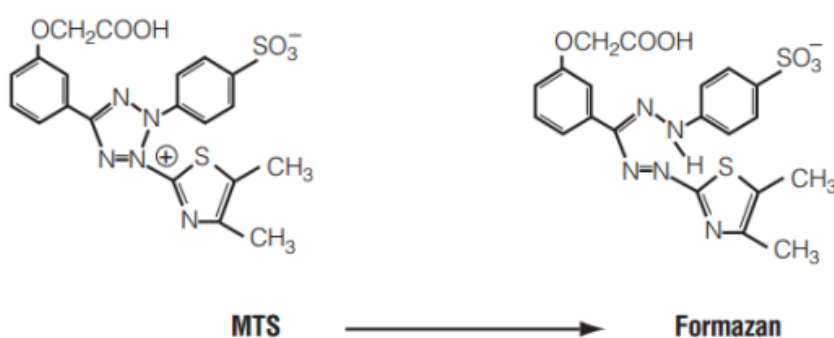
3.2.3. Nacjepljivanje i tretman HEK293T i HepG2 stanica

Nakon brojanja stanica u Neubaerovoj komorici izračunat je volumen suspenzije stanica potreban za nacjepljivanje ploče s 96 jažica za svaku staničnu liniju kako bi početna koncentracija suspenzije bila 3×10^4 stanica mL^{-1} (HEK293T stanice) odnosno 5×10^4 stanica mL^{-1} (HepG2 stanice). U svaku jažicu nacjepljeno je 100 μL suspenzije stanica te je ploča stavljena u inkubator na 37 °C narednih 24 sata, koliko je potrebno da se stanice prihvate za površinu i nastave rasti. Nakon 24 sata stanice su tretirane NSAID-ima otopljenima u etanolu, DMEM-u te i Ch:Xyol 50%. Za tretman stanica korištene su ishodne otopine NSAID-

a kako je navedeno u Tablici 1. te su odgovarajuće nominalne koncentracije u jažici bile 10 μM , 50 μM , 100 μM i 200 μM što je postignuto dodatkom određenog volumena ishodne otopine NSAID-a. Za svaku koncentraciju postavljene su po tri paralele, a kontrolne stanice nisu bile tretirane. Pokus je ponovljen dva puta. Potom su stanice inkubirane na 37 °C tijekom 72 sata nakon čega je određen učinak NSAID-a na HEK293T i HepG2 stanice primjenom kolorimetrijske MTS metode.

3.2.4. MTS metoda za određivanje preživljenja stanica

Za određivanje preživljenja stanica korišten je The CellTiter 96[®] AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, SAD) ili skraćeno MTS-test. MTS metoda je kolorimetrijska metoda koja se koristi za praćenje proliferacije stanica u ovisnosti o faktorima rasta, citokinima, mitogenima i nutrijentima, za analizu citotoksičnih i citostatičkih spojeva te za određivanje antitijela koja inhibiraju rast stanica u kulturi. The CellTiter 96[®] AQ_{ueous} reagens sadrži tetrazolijevu sol MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium] i PES (fenazin etosulfat) koji služi sa povećanje stabilnosti reagensa. MTS sol se u stanicama, djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza, reducira do ljubičasto obojenog produkta, formazana koji je topljiv u staničnom mediju (Slika 4). Ta konverzija se vrši u prisutnosti NADH i NADPH koji se djelovanjem dehidrogenaze oksidiraju u NAD⁺ i NADP⁺.



Slika 4. Struktura tetrazolijeve soli MTS i njezinog produkta formazana

Nakon tretmana NSAID-ima u trajanju od 72 sata, medij s ispitivanom tvari se ukloni te se u svaku jažicu doda 100 μL svježeg medija s MTS reagensom (10% v/v). Ploča se vrati u inkubator i inkubira iduća 3-4 sata. Intenzitet razvijene boje mjeri se spektrofotometrijski primjenom čitača ploča pri valnoj duljini od 490 nm u odnosu na slijepu probu. Izmjerena apsorbancija proporcionalna je broju živih stanica u jažici, jer je količina nastalog obojenog produkta tj. formazana proporcionalna broju živih stanica. Dobiveni rezultat izražen je kao postotak preživljenja tretiranih stanica u odnosu na netretirane kontrolne stanice prema izrazu:

$$\text{Preživljenje (\%)} = (\text{Apsorbancija tretiranih stanica} / \text{Apsorbancija kontrolnih stanica}) \times 100$$

(2)

3.2.5. Bojanje stanica otopinom kristal-ljubičasto

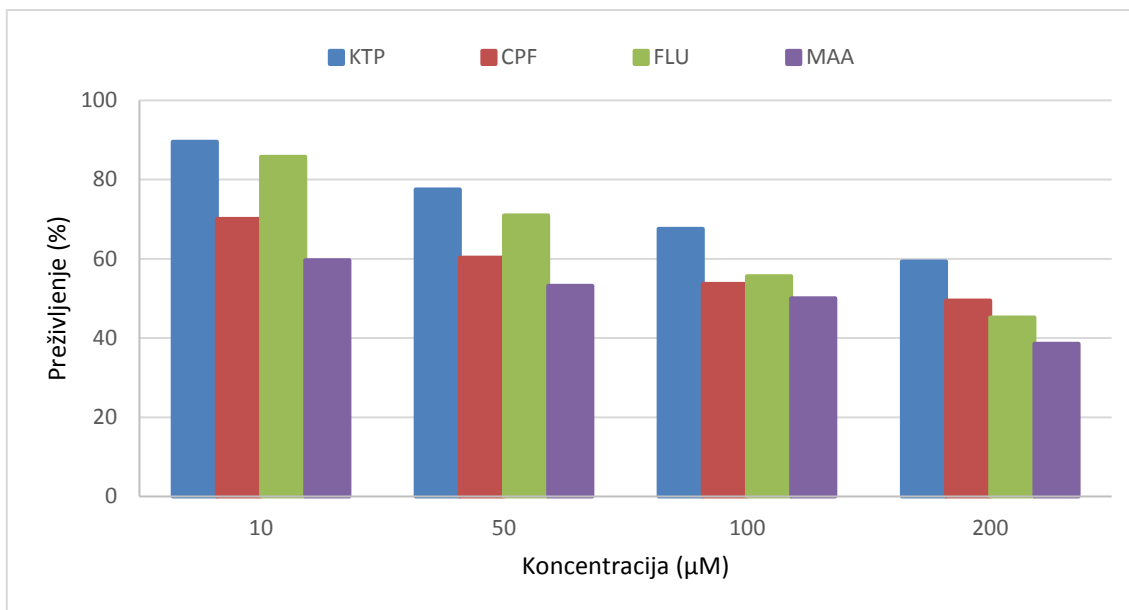
Kako bi lakše uočili i fotografirali eventualno nastale promjene u izgledu HEK293T i HepG2 stanica tijekom tretmana ispitivanim NSAID-ovima stanice su nacijepljenje u ploču sa 6 jažica. Nacijepljeno je 1 mL suspenzije stanica koncentracije 3×10^4 stanica mL^{-1} (HEK293T stanice) i 5×10^4 stanica mL^{-1} (HepG2 stanice) te tretirano kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.3. Nakon 72 sata tretmana uklonjen je medij za uzgoj te su stanice isprane dodatkom 0,5 mL PBS pufera, a zatim je dodano 0,25 mL otopine boje kristal-ljubičasto. Ploča je vraćena u inkubator na 15-tak min do pola sata, nakon čega je uklonjena boja, stanice su isprane PBS puferom te slikane Dyno-Eye kamerom pod inverznim svjetlosnim mikroskopom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

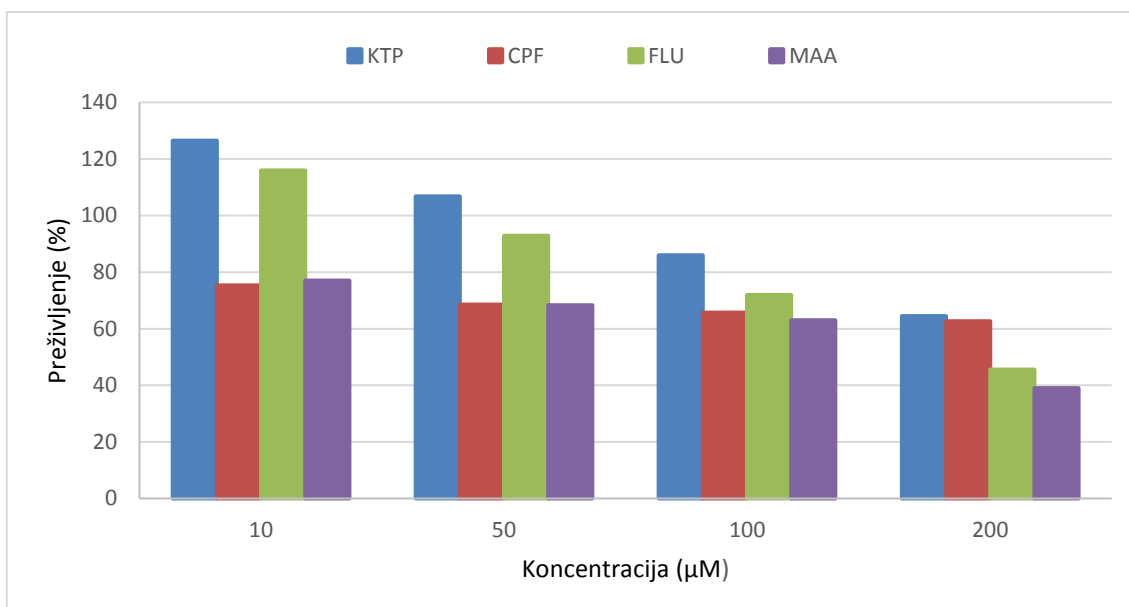
Nesteroidni protuupalni lijekovi su danas jedni od najzastupljenijih lijekova u humanoj i veterinarskoj medicini zbog svog analgetskog, protuupalnog, antipiretskog i antitrombotskog djelovanja. Zbog široke rasprostranjenosti i upotrebe NSAID-a, velik je interes znanstvenika za njihovo unaprijeđenje i otkrivanje novih potencijalnih primjena te rješavanje problema toksičnosti. U proteklih 30-ak godina provedene su brojne eksperimentalne, epidemiološke i kliničke studije koje su pokazale da osim već poznatog djelovanja, NSAID-i imaju potencijalno antikancerogeno djelovanje. Istraživanja se i nadalje provode kako bi se utvrdila njihova sigurnost i učinkovitost. Stoga je u ovom radu ispitano djelovanje četiri NSAID-a (ketoprofen, karprofen, fluniksin i 4-metilaminoantipirin monohidrat), otopljeni u tri različita otapala, na humane stanične linije HEK293T i HepG2. Djelovanje je ispitano primjenom kulture stanica i *in vitro* metode. *In vitro* testovi se sve više koriste kao alternativa *in vivo* testovima na pokusnim životinjama sa ciljem smanjenja broja laboratorijskih životinja potrebnih za ispitivanja. Na *in vitro* modelnim sustavima može se učinkovito i brzo ispitati velik broj kemikalija u širokom rasponu koncentracija (Kniewald i sur., 2005), a ukoliko se neka od ispitanih tvari pokaže štetnom za stanicu, može se zaključiti da će učinak biti štetan i na višim razinama biološke organizacije (Fent, 2001).

4.1. Učinak nesteroidnih protuupalnih lijekova otopljenih u etanolu na HEK293T i HepG2 stanice

Etanol koji se često koristi za otapanje raznih tvari u toksikološkim ispitivanjima, odabran je kao prvo od otapala za otapanje navedenih NSAID-a. U radu je ispitano djelovanje četiri NSAID-a otopljeni u etanolu u ishodnim koncentracijama navedenim u Tablici 1. Ukratko, stanice su nacijepljene u ploče s 96-jažica i nakon 24 sata tretirane različitim koncentracijama ispitivanih spojeva (10 μ M, 50 μ M, 100 μ M i 200 μ M) te je nakon 72-satnog tretmana njihovo djelovanje na preživljenje stanica određeno primjenom kolorimetrijskog MTS testa, a rezultati su izraženi kao postotak preživljenja tretiranih u odnosu na kontrolne stanice. Učinak ispitanih NSAID-ova na staničnu liniju HEK293T prikazan je na slici 5., a na staničnu liniju HepG2 na slici 6.



Slika 5. Učinak ketoprofena (KTP), karprofena (CPF), fluniksina (FLU) i 4-metilaminoantipirin monohidrata (MAA) otopljenih u etanolu na HEK293T staničnu liniju



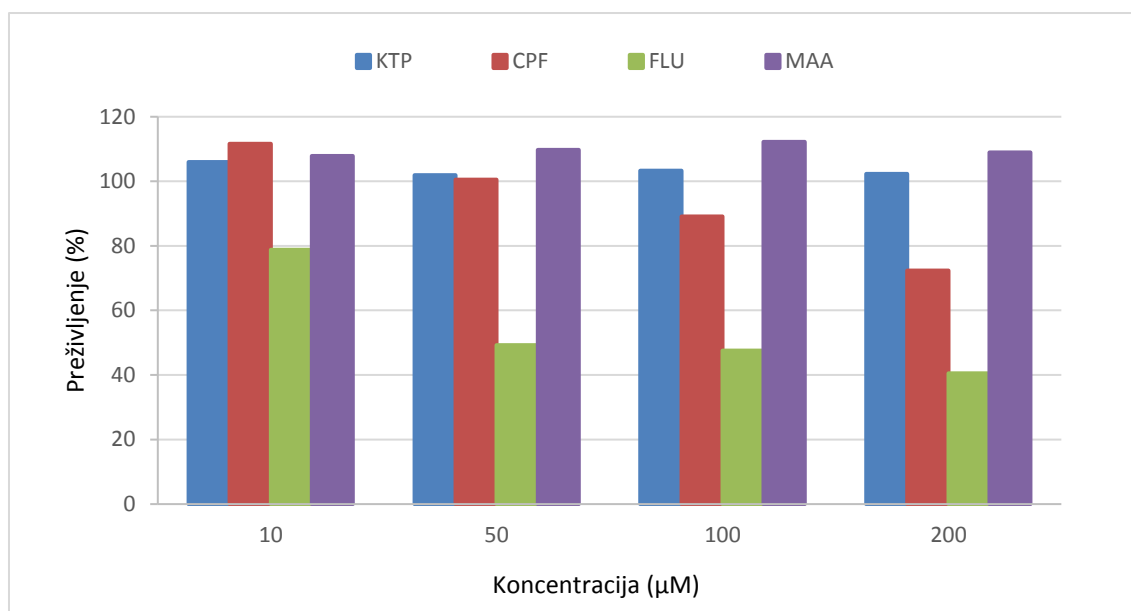
Slika 6. Učinak ketoprofena (KTP), karprofena (CPF), fluniksina (FLU) i 4-metilaminoantipirin monohidrata (MAA) otopljenih u etanolu na HepG2 staničnu liniju

Iz rezultata prikazanih na slici 5. može se zaključiti da sva četiri ispitana lijeka pokazuju antiproliferativan, odnosno inhibitoran učinak na HEK293T stanice koji je ovisan o dozi te je sukladno tome najmanje preživljenje stanica zapaženo pri najvišoj ispitanoj

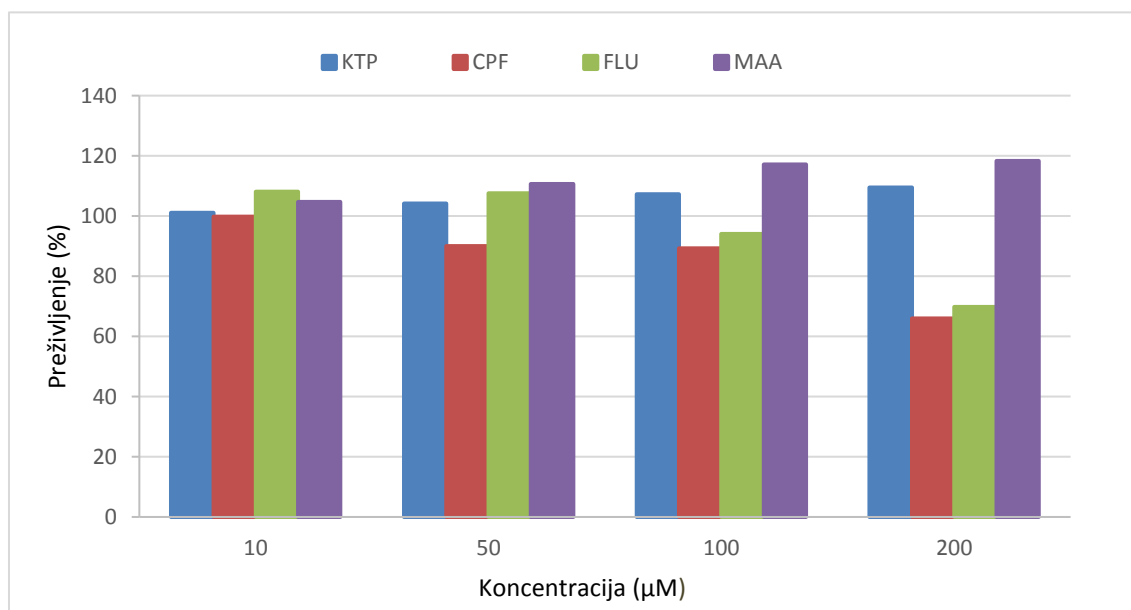
koncentraciji (200 μM). Najveću inhibiciju rasta ($\sim 61,5\%$) izazvao je 4-metilaminoantipirin monohidrat, gdje pri 200 μM koncentraciji preživljenje iznosi oko 38,5 %. Kod rezultata na HepG2 staničnoj liniji prikazanih na slici 6. također je vidljivo da veća koncentracija NSAID-a izaziva veću inhibiciju rasta, pri čemu je taj trend skoro pa neznatan pri djelovanju CPF-a. Najjaču inhibiciju rasta pri 200 μM također je izaziva izazvao je MAA ($\sim 61\%$), dok je najslabiji utjecaj na proliferaciju stanica imao ketoprofen, kod kojeg čak vidljiva i stimulacija rasta stanica od +27% pri najnižoj ispitanoj koncentraciji KTP-a (10 μM). U dostupnoj literaturi nisu pronađeni rezultati *in vitro* ispitivanja citotoksičnosti navedenih NSAID-ova na kulturama stanica stoga je moguća usporedba samo s drugim spojevima iz te velike skupine lijekova. U radu Dai i suradnika (2012) ispitivan je antiproliferativni učinak celekoksiba na dvije stanične linije raka dojke, MCF-7 i MDA-MB-231 te je također ustanovljena ovisnost učinka o primjenjenoj koncentraciji i vremenu provođenja tretmana, što je u skladu s ovdje prikazanim rezultatima.

4.2. Učinak nesteroidnih protuupalnih lijekova otopljenih u mediju za uzgoj stanica na HEK293T i HepG2 stanice

Drugo korišteno otapalo je medij za uzgoj stanica. Ako je moguće, otapanje u mediju za uzgoj stanica idealno je za ispitivanje spojeva primjenom kultura stanica, jer omogućava praćenje učinka čistih spojeva u uvjetima koji su najpogodniji za rast stanica. Time se također izbjegava mogući nepovoljni učinak samog otapala na stanice. Proveden je postupak naciepljivanja i tretmana opisan u poglavlju 3.2.3. i 3.2.4. Ukratko, ketoprofen, karprofen, fluniksini i 4-metilaminoantipirin monohidrat otopljeni su u DMEM-u, mediju korištenom za uzgoj staničnih linija te su pripremljene ishodne otopine NSAID-a kako je navedeno u Tablici 1. HEK293T i HepG2 stanice su tretirane 24 sata nakon naciepljivanja te je nakon 72-satnog tretmana određeno preživljenje dviju staničnih linija tretiranih različitim koncentracijama ispitivanih NSAID-a, što je prikazano na slikama 7. i 8.



Slika 7. Učinak ketoprofena (KTP), karprofena (CPF), fluniksina (FLU) i 4-metilaminoantipirin monohidrata (MAA) otopljenih u DMEM-u na HEK293T staničnu liniju



Slika 8. Učinak ketoprofena (KTP), karprofena (CPF), fluniksina (FLU) i 4-metilaminoantipirin monohidrata (MAA) otopljenih u DMEM-u na HepG2 staničnu liniju

Na slici 7. prikazan je učinak ispitivanih NSAID-ova na HEK293T staničnu liniju. Iz prikazanih rezultata je vidljivo da je trend ovisnosti preživljenja stanica o primjenjenoj koncentraciji lijeka jasno izražen samo kod karprofena i fluniksina, koji se ujedno pokazao

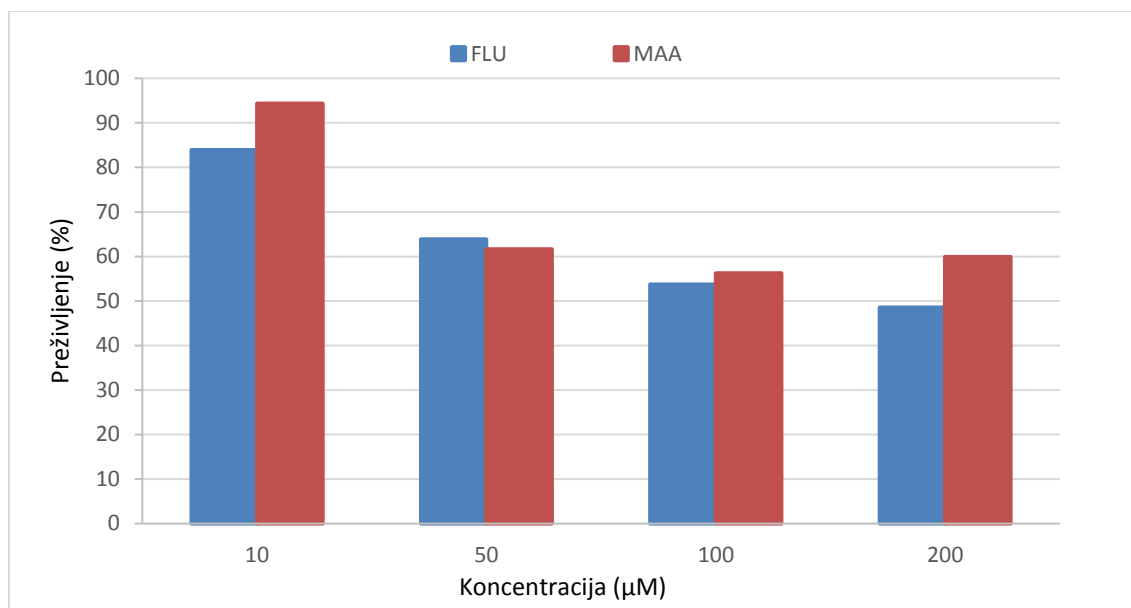
kao i učinkovitiji od četiri ispitana NSAID-a obzirom na *in vitro* inhibiciju proliferacije HEK293T stanica. Preživljenje stanica tretiranih 200 μ M otopinom FLU iznosi \sim 39,5%. Rezultati sa slike 8. prikazuju utjecaj NSAID-a otopljenih u mediju na HepG2 staničnu liniju. Vrlo slično kao i kod HEK293T stanica, CPF i FLU pokazuju inhibitorni učinak na rast HepG2 stanica ovisan o koncentraciji ispitivane tvari, pri čemu je najveći postotak inhibicije zapažen pri tretmanu s 200 μ M (\sim 34%). Ketoprofen i 4-metilaminoantipirin monohidrat otopljeni u DMEM-u ne pokazuju antiproliferativni učinak na HepG2 stanice, čak i kod najveće ispitane koncentracije. Dapače, tu je zapažen pozitivan učinak na rast stanica (+ 18%).

Istraživanjem u kojem je ispitano *in vitro* djelovanje fenprofena i ketoprofena te njihovih derivata na različite humane tumorske stanične linije i normalnu humanu staničnu liniju ustanovljeno je da neki od testiranih spojeva pokazuju antiproliferativni učinak. Fenprofen i ketoprofen, primjenjeni u niskim koncentracijama, nisu pokazali inhibicijski učinak, kao i ketoprofen u našem slučaju, dok su njihovi derivati s amidnom skupinom pokazali jak antiproliferativni učinak (Marjanović i sur., 2007). Iz svega navedenog, jasno je da je potrebno i dalje provoditi istraživanja i testiranja kako bi se pronašla optimalna doza i odgovarajući lijek za antitumorsku primjenu.

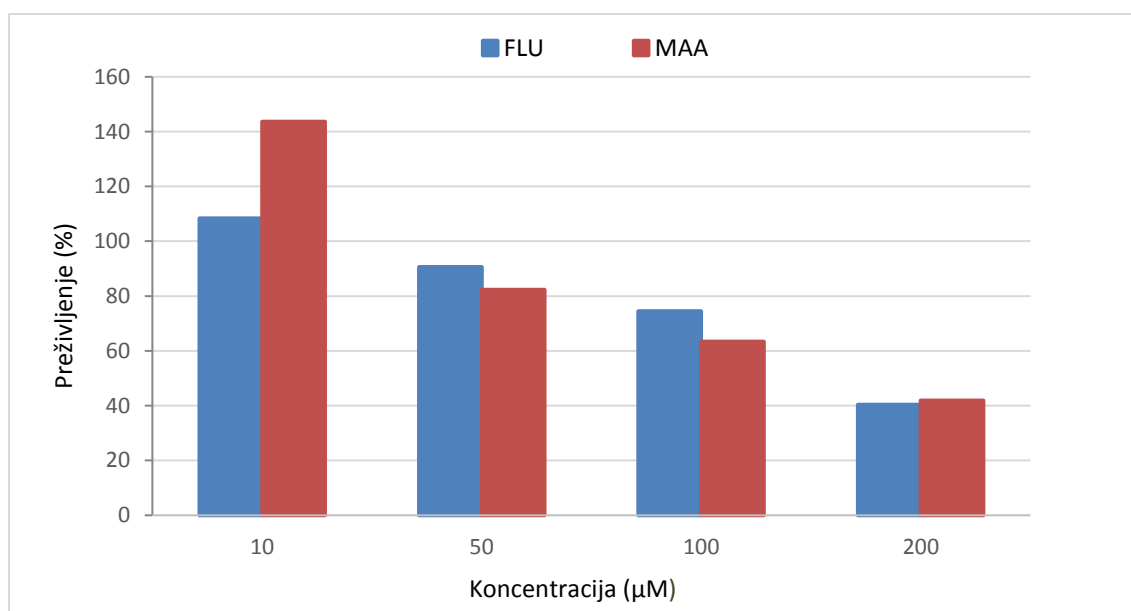
4.3. Učinak nesteroidnih protuupalnih lijekova otopljenih u eutektičnom otapalu na HEK293T i HepG2 stanične linije

Treće otapalo korišteno za otapanje NSAID-a je eutektično otapalo, kolin klorid:ksilitol (Ch:Xyol) s udjelom vode od 50%. Eutektična otapala se nazivaju „zelenim“ otapalima jer imaju povoljniji utjecaj na okoliš od klasičnih organskih otapala, a pri tome imaju dobra tehnološka svojstva (nehlapljivost, nezapaljivost, mogućnost višestruke upotrebe) koja im omogućuju primjenu u različitim područjima. Sastoje se od dviju ili više komponenta koje stvaraju eutektičnu smjesu nižeg tališta od temperature tališta komponenata zasebno. Zbog prirodnog podrijetla i sinergističkog učinka komponenti eutektične smjese, topljivost lijekova u njima je dosta dobra. Stoga se primjena eutektičnih otapala sve više istražuje u biomedicini kao biorazgradivi elastomeri te u biotehnologiji i u farmaceutskoj industriji kao sredstva za otapanje lijekova (Mbous i sur., 2016). Eutektično otapalo korišteno za otapanje NSAID-a je kolin klorid:ksilitol (Ch:Xyol) s udjelom vode od 50%. Budući da ketoprofen i karprofen nisu bili topivi u navedenom eutektičnom otapalu, ispitan je učinak samo dva NSAID-a, fluniksina i 4-metilaminoantipirin monohidrata, koji su pripremljeni kao ishodne otopine istih masenih

koncentracija kao i u ostala dva otapala (Tablica 1). Rezultati dobiveni nakon tretmana HEK293T i HepG2 stanica prikazani su na slikama 9. i 10.



Slika 9. Učinak fluniksina (FLU) i 4-metilaminoantipirin monohidrata (MAA) otopljenih u eutekličnom otapalu kolin klorid:ksilitol na HEK293T staničnu liniju



Slika 10. Učinak fluniksina (FLU) i 4-metilaminoantipirin monohidrata (MAA) otopljenih u eutekličnom otapalu kolin klorid:ksilitol na HepG2 staničnu liniju

Iz rezultata prikazanih na slici 9. vidljivo je da FLU i MAA imaju antiproliferativno djelovanje na HEK293T stanice pri svim ispitivanim koncentracijama, a intenzitet inhibicije

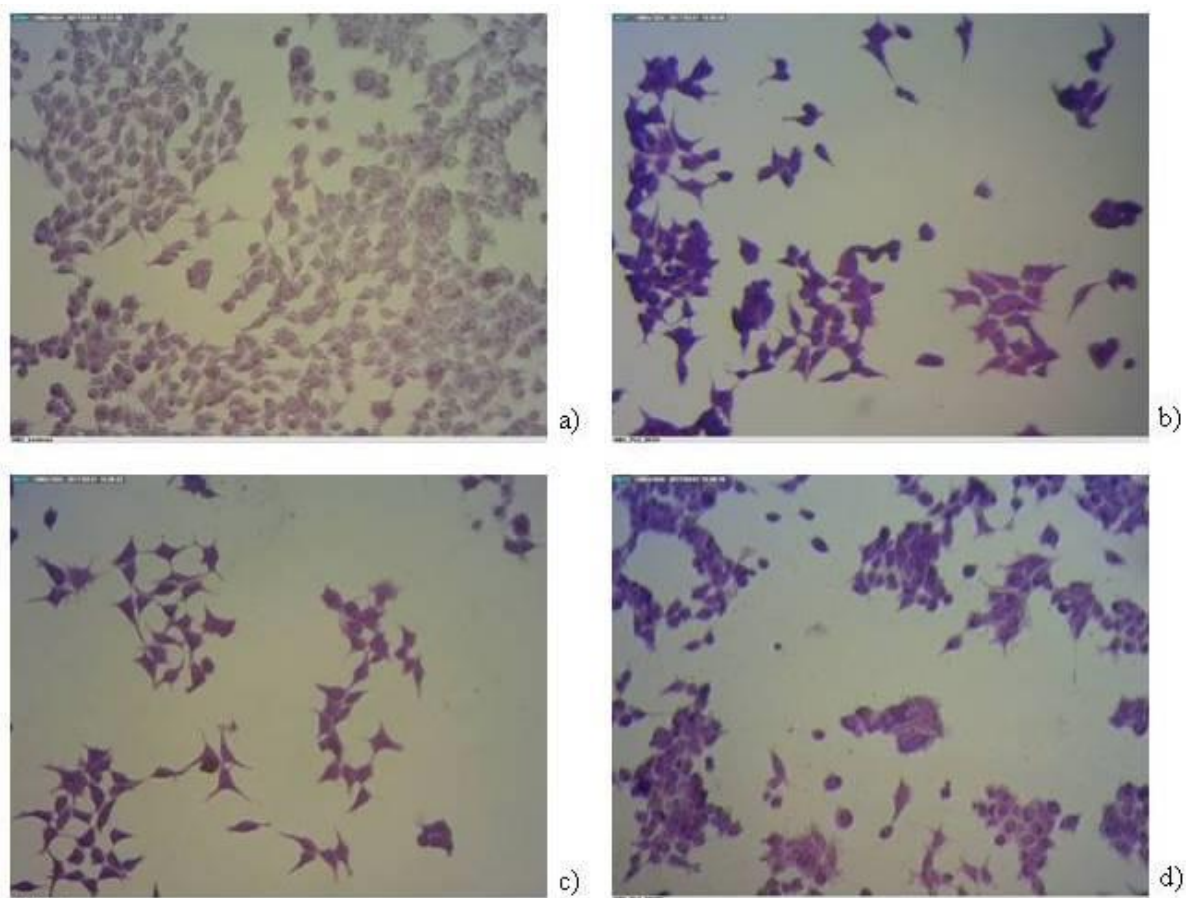
ovisi o koncentraciji. Jači inhibitorni učinak na rast HEK293T stanice ima FLU, koji pri najvećoj ispitanoj koncentraciji (200 μ M) iznosi oko 51,5%. Rezultati prikazani na slici 10. pokazuju da su oba lijeka jače inhibirala rast HEK293T stanica nego HepG2 stanica, pri čemu je postotak inhibicije s najvećom ispitanom koncentracijom (200 μ M) sličan za FLU i MAA te iznosi oko 60%. Također, vidljivo je da je MAA pri najmanjoj koncentraciji (10 μ M) pozitivno djelovao na rast stanica (+ 40%), što je stimulatorni učinak koji nije zapažen kod HEK293T stanica. Sličan trend zapažen je u studiji koja je ispitivala antitumorsku aktivnost ibuproksama i oksimetacina na tumorske i normalne humane stanične linije. Rezultati su pokazali da učinak nije jednak kod svih staničnih linija i da ovisi o dozi (Rajic i sur., 2009).

Ako uspoređujemo djelovanje ketoprofena, karprofena, fluniksina i 4-metilaminoantipirin monohidrata na HEK293T i HepG2 stanice obzirom na korišteno otapalo učinak sva četiri lijeka otopljeni u etanolu bio je inhibitoran i ovisan o dozi (Slika 5 i 6), a od ispitivanih spojeva najjače je djelovanje imao 4-metilaminoantipirin monohidrat. Ketoprofen i 4-metilaminoantipirin monohidrat otopljeni u DMEM-u nemaju antiproliferativni učinak i čak je zapažen pozitivan učinak na rast navedenih stanica, dok je jasno izražen trend ovisnosti preživljenja stanica o primjenjenoj dozi ispitivanih tvari otopljenih u DMEM-u vidljiv samo kod karprofena i fluniksina koji jače djeluju što je primjenjena doza veća (Slika 7 i 8). Kada je za otapanje djelatnih tvari korišteno eutektično otapalo ispitana su samo dva lijeka koja su bila topiva u ChCl:Xyol, fluniksina i 4-metilaminoantipirin monohidrat. Usporedbom slika 9 i 10 može se zaključiti da je inhibicijski učinak oba lijeka bio jači na HEK293T stanice nego na HepG2 stanice, s time da je kod HepG2 stanica uočen i pozitivan učinak na rast najmanje doze 4-metilaminoantipirin monohidrata, dok je taj isti lijek otopljen u etanolu imao najjači inhibitorni učinak od sva četiri ispitana spoja. Budući se učinak fluniksina i 4-metilaminoantipirin monohidrata, koji su ispitani u sva tri otapala, razlikuje ovisno o vrsti otapala, možemo pretpostaviti da interakcije djelatne tvari i samog otapala, također utječu na zapaženi učinak, što svakako treba nadalje istražiti i imati na umu pri formulaciji lijeka.

4.4. Morfologija HEK293T i HepG2 stanica tretiranih NSAID-ovima otopljenim u različitim otapalima

Uz ispitivanje djelovanja NSAID-a otopljenih u različitim otapalima na rast i preživljenje HEK293T i HepG2 stanične linije, svakodnevno je promatran izgled i brojnost stanica svjetlosnim mikroskopom te su stanice fotografirane nakon 72-satnog tretmana i

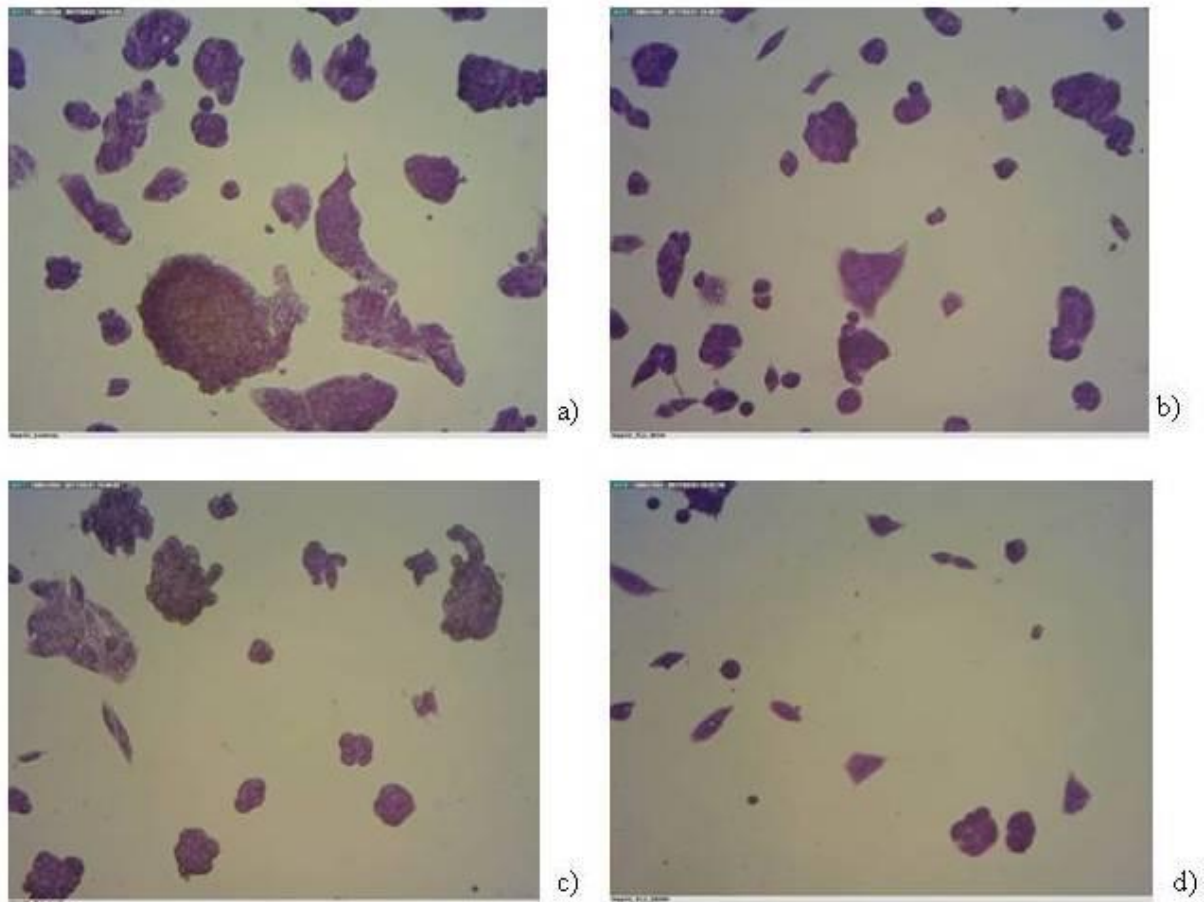
bojanja otopinom boje kristal-ljubičasta. Obzirom da je fluniksin bio ispitan u sva tri otapala te da je uglavnom imao i najizraženiji inhibitorni učinak, slikane su upravo morfološke promjene uočene pri njegovom djelovanju, što je prikazano na slikama 11(a-d) i 12(a-d).



Slika 11. Izgled HEK293T stanica tretiranih s fluniksinom ($100 \mu\text{M}$) tijekom 72 sata i potom obojanih kristal-ljubičastim i slikanih pod svjetlosnim inverznim mikroskopom (povećanje 400x): kontrolne stanice (a), stanice tretirane FLU otopljenim u etanolu (b), stanice tretirane FLU otopljenim u DMEM-u (c), stanice tretirane FLU otopljenim u eutektičnom otapalu s 50% udjelom vode (d).

Vidljivo je da se izgledom i gustoćom HEK293T stanica tretirane $100 \mu\text{M}$ fluniksinom (Slika 11 b-d) razlikuju od kontrolnih stanica (Slika 11a), koje imaju gušći monosloj i odgovarajuće su morfologije za taj tip stanica. Osim manje gustoće monosloja kod tretiranih stanica, može se uočiti gubitak međusobnog kontakta i zaokruživanje stanica. Brojnost tretiranih HEK293T, u odnosu na kontrolne stanice, u skladu je s rezultatima citotoksičnosti

budući da je tretman FLU otopljenim u etanolu, DMEM-u i eutektnom otapalu kolin klorid:ksilitolu izazvao u određenom postotku inhibiciju rasta stanica.



Slika 12. Izgled HepG2 stanica tretiranih s fluniksinom ($100 \mu\text{M}$) tijekom 72 sata i potom obojanih kristal-ljubičastim i slikanih pod svjetlosnim inverznim mikroskopom (povećanje $400\times$): kontrolne stanice (a), stanice tretirane FLU otopljenim u etanolu (b), stanice tretirane FLU otopljenim u DMEM-u (c), stanice tretirane FLU otopljenim u eutektnom otapalu s 50% udjelom vode (d).

Iz slike 12. jasno je vidljivo da tretman $100 \mu\text{M}$ fluniksinom, neovisno o korištenom otapalu, rezultira značajnim promjena u izgledu i broju tretiranih (Slika b-d) u odnosu na kontrolne HepG2 stanice (Slika 12a). Najveća razlika u morfologiji HepG2 stanica vidljiva je kod onih koje su tretirane FLU otopljenim u eutektnom otapalu kolin klorid:ksilitolu.

Općenito, možemo zaključiti da je kod obje stanične linije jasno vidljiva razlika između kontrolnih i tretiranih stanica koja se očituje manjom gustoćom monosloja, zaokruživanjem

stanica te gubitkom međusobnog kontakta što je u skladu sa zapaženom inhibicijom rasta stanica u *in vitro* testu preživljenja stanica.

Ovim radom potvrđena je glavna hipoteza da nesteroidni protuupalni lijekovi imaju antiproliferativno, odnosno moguće antitumorsko djelovanje, koje je ovdje pokazano za spojeve koji do sada nisu ispitani *in vitro* testom citotoksičnosti na humanim staničnim linijama. Budući da zapaženi antiproliferativni učinak ovisi o primjenjenoj dozi te o otapalu u kojem je djelatna tvar otopljena svakako su potrebna daljnja ispitivanja njihove učinkovitosti i najbolje formulacije kao lijeka. Također, u ovom su radu ketoprofen, karprofen, fluniksini i 4-metilaminoantipirin monohidrat djelovali inhibitorno na tumorske HepG2 stanice, što je u skladu s pretpostavljenim antitumorskim učinkom, ali i na normalnu staničnu liniju HEK293T stoga su nužna opsežnija istraživanja kako bi se potvrdio njihov antitumorski potencijal te sigurnost primjene kao lijeka za tu namjenu.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće :

1. Učinak četiri NSAID-a (ketoprofena, karprofena, fluniksina i 4-metilaminoantipirin monohidrata) ispitan na HEK293T i HepG2 staničnim linijama ovisan je o dozi ispitivanih tvari te u većini slučajeva veća koncentracija uzrokuje veći inhibicijski učinak na preživljenje stanica.
2. Učinak ispitivanih NSAID-a razlikuje se ovisno o otapalu u kojem su djelatne tvari otopljene.
3. Inhibitorni učinak zapažen je i na normalnoj HEK293T staničnoj liniji i na tumorskim HepG2 stanicama, što ukazuje da su potrebna daljna ispitivanja navedenih NSAID-a kao potencijalnih antitumorskih lijekova.

6. LITERATURA

Backlund, M.G. (2005) 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer. *J. Biol. Chem.* **280**, 3217-3223.

Baron, J.A. (2003) A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N. Engl. J. Med.* **348**, 891-899.

Boyd, M.R., Paull K.D. (1995) Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute *in vitro* anticancer drug discovery screen. *Drug development research* **34**, 91-109.

Butler, M. (2004) Animal cell culture and technology, 2. izdanje, Garland Science/Bios Scientific Publishers, New York.

Corley, D.A., Kerlikowske, K., Verma, R., Buffler, P. (2003) Protective association of aspirin/NSAIDs and esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* **124**, 47-56.

Dai, Z., Ma, X., Kang, H., Gao, J., Min, W., Guan, H., Diao, Y., Lu W., Wang, X. (2012) Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer *in vitro* and *in vivo*. <https://cancerbiomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2867-12-53> Pristupljeno 6.lipnja 2017.

DeRuiter, J. (2002) Principles of drug action 2: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. http://www.auburn.edu/~deruija/nsaids_2002.pdf Pristupljeno 1.lipnja 2017.

Ekwall, B. (1995) The basal cytotoxicity concept. U: *Alternative Methods in Toxicology and the Life Sciences*, (Goldberg, A., van Zutphen, L., ured.), The World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: Education, Researches, Testing, **11**. Mary Ann Libert, New York, str. 721-725.

Fent, K. (2001) Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol. in vitro* **15**, 477-488.

Freshney, R.I. (2000) Animal cell culture, 2. izd., Oxford University Press, New York.

Giovannucci, E. (1999) The prevention of colorectal cancer by aspirin use. *Biomed. Pharmacother.* **53**, 303-308.

Gupta, R.A., Dubois, R.N. (2001) Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nature Rev. Cancer* **1**, 11-21.

Holick, C.N., Michaud, D.S., Leitzmann, M.F., Willett, W.C., Giovannucci, E. (2003) Aspirin use and lung cancer in men. *Br. J. Cancer* **89**, 1705-1708.

Janne, P.A., Mayer, R.J. (2000) Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl. J Med.* **342**, 1960–1968.

Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina Šrček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing and xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **56**, 195-204.

Mahmud, S., Franco, E., Aprikian, A. (2004) Prostate cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs : a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Cancer* **90**, 93-99.

Marjanović M., Zorc B., Pejnović L., Zovko M., Kralj M. (2007) Fenoprofen and ketoprofen amides as potential antitumor agents. *Chem. Biol. Drug Des.* **69**, 222–226.

Mbous, Y.P., Hayyan M., Hayyan A., Wong W.F., Hashim M.A., Looi C.Y. (2016) Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering-Promises and challenges. *BiotechnologyAdvances* **35**(2),105-134.

Mead, J., Alfin-Slater, R., Howton, D., Popjak, G. (1986) Prostaglandins, Tromboxanes and Prostacyclin. *Plenum Press*, New York.

Qin H., Yang J., Cui H., Li S., Zhang W., Ding X., Xia Y. (2013) Synergistic antitumor activity of reversine combined with aspirin in cervical carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Cytotechnology* 65(4): 643–653.

Rajic, Z., Batula, I., Zorc, B., Kraljevic Pavelic, S., Hock, K., Pavelic, K., Naesens, L., De Clercg, E., Balzarini, J., Przyborowska, M., Ossowski, T., Mintas, M. (2009) Cytostatic and antiviral activity evaluations of hydroxamic derivatives of some non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Chem Biol. Drug Des.* **73**, 328–338.

Sandler, R.S. (2003) A randomized trial od aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N. Engl. J Med.* **348**, 883-890.

Taketo, M. (1998) Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl. Cancer Inst.* **90**, 1529–1536.

Yan, M. (2004) 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX2 oncogene antagonist, is a TGF- β -induced suppressor of human gastrointestinal cancers. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 17468-17473.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Sara Bergjavec

ime i prezime studenta