

# In vitro probir novih derivata fenantrena na tumorskim staničnim linijama

---

Selgrad, Danijel

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:016963>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-26**

Repository / Repozitorij:

BIotech

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Biotehnologija u medicini

Danijel Selgrad

*In vitro* probir novih derivata fenantrena na tumorskim staničnim linijama

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Biotehnologija u medicini

*Danijel Selgrad*

*In vitro* probir novih derivata fenantrena na tumorskim staničnim linijama  
Diplomski rad

Rijeka, 2020.

Mentorica rada: prof. dr.sc. Sandra Kraljević Pavelić

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
Master's program  
Biotechnology in medicine

Danijel Selgrad  
*In vitro* evaluation of new fenantren derivatives on tumor cell lines  
Master's thesis

Rijeka, 2020.

Diplomski rad obranjen je dana 22.6.2020.

Pred povjerenstvom:

1. prof. dr. sc. Mirela Sedić
2. prof. dr. sc. Dean Marković
3. prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

Rad ima 46 stranica, 9 slika, 3 tablice i 46 literaturnih navoda.

## Sažetak

Danas se maligna oboljenja liječe različitim pristupima koji uključuju kirurške postupke, zračenje i terapiju lijekovima. Terapija antitumorskim lijekovima je pristup koji se temelji na induciranju citotoksičnosti za tumorske stanice. Prirodni spojevi su tijekom povijesti bili važan izvor u razvoju lijekova. Ti su spojevi važne početne strukture za razvoj lijekova specifičnog djelovanja odnosno važne strukture za dobivanje sintetičkih aktivnih tvari. Iz kolekcije novosintetiziranih spojeva provode se ispitivanja, kao primjerice testiranja na staničnim linijama zloćudnih tumora u čovjeka u uvjetima *in vitro* ili visokoprotočna istraživanja. Fenantreni su klasa aromatskih metabolita, od kojih neki, posjeduju prilično jaku citotoksičnu aktivnost protiv staničnih linija raka, kao što su A549 (adenokarcinom bazalnog epitela alveola), SK-OV-3 (humani adenokarcinom jajnika), HL-60 (humana promijelocitična leukemija), HeLa (karcinom grlića maternice), MCF-7 (karcinom dojke). Temeljem prethodnih istraživanja različitih struktura fenantrena koje su pokazale biološku aktivnost, uključujući i onu protutumorsku, ovim radom se željela utvrditi citotoksičnost i antiproliferativna djelotvornost nove serije derivata fenantrena na tumorskim staničnim linijama pomoću metode MTT testa koja je služila za analizu proliferacije stanica *in vitro*, te uz pomoć metode Western blot za analizu ekspresije potencijalnih meta u tretiranim stanicama. Pokusi su rađeni na tumorskim staničnim linijama: A549 (adenokarcinom pluća), CFPAC-1 (stanice dukalnog adenokarcinoma gušterače), HeLa (karcinom grlića maternice), HepG2 (stanice hepatocelularnog karcinoma jetra), SW620 (stanice adenokarcinoma debelog crijeva, metastaze) te na jednoj staničnoj liniji netransformiranih stanica fibroblasta HFF-1. Dcijano supstituirani akrilonitrili 8 i 11 i njihovi ciklički analozi 15 i 17 su pokazali najjaču antiproliferativnu aktivnost, dok su derivati 8 i 11 također pokazali i selektivnost prema HeLa i HepG2 staničnim linijama. Razina ubikvitinirane forme HIF-1 $\alpha$  statistički se povećala u stanicama HeLa i HepG2 nakon tretmana derivatima 8 i 11. Protein MEK 1/2 imao je smanjenu ekspresiju u stanicama HeLa i HepG2 nakon tretmana derivatima 8 i 11. Zaključno,

ovaj diplomski rad pokazuje potencijal testiranih derivata fenantrena 8 i 11 kao potencijalnih kandidata za daljnju optimizaciju u procesu razvoja lijekova.

Ključne riječi: fenantreni, antiproliferativni učinak, protutumorski učinak, HIF-1 $\alpha$ , MEK 1/2

## Abstract

Today, malignancies are treated with a variety of approaches that include surgical procedures, radiation, and drug therapy. Antitumor drug therapy is the approach based on cytotoxicity induction in tumor cells. Natural compounds have been an important source in drug development throughout history. These compounds are important starting structures for development of specific drugs or important structures for production of synthetic active substances. From a collection of newly synthesized compounds, tests are carried out, such as testing for human malignant tumor cell lines *in vitro* or in high-throughput studies. Phenanthrenes are a class of aromatic metabolites, some of them bearing fairly strong cytotoxic activity against cancer cell lines, such as A549 (adenocarcinoma of the basal epithelium of the alveoli), SK-OV-3 (human ovarian adenocarcinoma), HL-60 (human promyelocytic leukemia), HeLa (cervical cancer), MCF-7 (breast cancer). Guided by previous studies of various phenanthrene structures that have shown biological activity, including antitumor ones, this work was aimed to study cytotoxicity and antiproliferative efficacy of a new series of phenanthrene derivatives on tumor cell lines using the MTT assay method used for cell proliferation assessment *in vitro* and Western blot for analysis of expression of potential targets in treated cells. The experiments were performed on tumor cell lines: A549 (lung adenocarcinoma), CFPAC-1 (pancreatic ductal adenocarcinoma cells), HeLa (cervical carcinoma), HepG2 (hepatocellular carcinoma cells), SW620 (colon adenocarcinoma cells), and on one cell line of untransformed fibroblast cells HFF-1. Dicyano substituted acrylonitriles 8 and 11 and their cyclic analogs 15 and 17 showed the strongest antiproliferative activity, while derivatives 8 and 11 also showed selectivity for HeLa and HepG2 cell lines. The level of ubiquitinated form HIF-1 $\alpha$  was statistically increased in HeLa and HepG2 cells after treatment with derivatives 8 and 11. MEK 1/2 protein had reduced expression in HeLa and HepG2 cells after treatment with derivatives 8 and 11. In conclusion, this thesis demonstrates the potential of tested



phenanthrene derivatives 8 and 11 as potential candidates for further optimization in the drug development process.

Key words: phenanthrenes, antiproliferative effect, antitumor effect, HIF-1 $\alpha$ , MEK 1/2

## Sadržaj

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | UVOD.....  | 1  |
| 1.1.   | ZLOĆUDNI TUMORI .....  | 1  |
| 1.2.   | PROTUTUMORSKI LIJEKOVI .....   | 2  |
| 1.2.1. | RAZVOJ NOVIH PROTUTUMORSKIH LIJEKOVA.....  | 2  |
| 1.2.2. | METODE ISTRAŽIVANJA BIOLOŠKE AKTIVNOSTI ORGANSKIH MOLEKULA U RANIM FAZAMA RAZVOJA PROTUTUMORSKOG LIJEKA..... | 3  |
| 1.3.   | KEMOTERAPEUTICI.....   | 6  |
| 1.4.   | FENANTRENI.....  | 8  |
| 1.4.1. | FENANTRENI OPĆENITO.....   | 8  |
| 1.4.2. | STRUKTURA FENANTRENA.....  | 8  |
| 1.4.3. | BIOLOŠKA AKTIVNOST FENANTRENA.....   | 9  |
| 1.5.   | OKSIDATIVNI STATUS TUMORSKIH STANICA KAO META DJELOVANJA PROTUTUMORSKIH LIJEKOVA .....                       | 12 |
| 1.5.1. | ULOGA HIF-1 U HIPOKSIČNIM UVJETIMA U TUMORSKIM STANICAMA.....  | 12 |
| 1.6.   | SIGNALIZACIJA RAS-RAF-MEK-ERK.....   | 15 |
| 2.     | CILJ RADA .....  | 17 |
| 3.     | MATERIJALI I METODE.....   | 18 |
| 3.1.   | UZGOJ STANIČNIH KULTURA <i>IN VITRO</i> .....  | 18 |
| 3.2.   | DERIVATI FENANTRENA.....   | 18 |
| 3.3.   | TEST PROLIFERACIJE STANICA.....  | 23 |
| 3.4.   | ANALIZA EKSPRESIJE PROTEINA U STANICAMA.....   | 25 |
| 4.     | REZULTATI .....  | 28 |
| 4.1.   | ANALIZA ANTIPROLIFERATIVNOG UČINKA U UVJETIMA <i>IN VITRO</i> .....  | 28 |
| 4.2.   | ANALIZA MEHANIZAMA DJELOVANJA FENANTRENSKIH DERIVATA.....  | 30 |
| 4.2.1. | ANALIZA MEHANIZAMA DJELOVANJA FENANTRENSKIH DERIVATA <i>IN SILICO</i> .....                                  | 30 |
| 4.2.2. | ANALIZA MEHANIZAMA DJELOVANJA FENANTRENSKIH DERIVATA <i>IN VITRO</i> .....                                   | 33 |
| 5.     | RASPRAVA .....   | 35 |
| 6.     | ZAKLJUČAK .....  | 39 |
| 7.     | LITERATURA.....  | 40 |
| 8.     | ŽIVOTOPIS .....  | 44 |

## **1. UVOD**

### **1.1. ZLOĆUDNI TUMORI**

Izraz 'tumor' se koristi za definiranje abnormalne, promijenjene nakupine tkiva. Tumori mogu biti benigni i zloćudni. Upravo zloćudni tumori predstavljaju medicinski problem jer napadaju okolna tkiva i metastaziraju, što znači da se sistemski prošire u organizmu na druga ciljna tkiva poput primjerice kostiju, mozga i pluća. Poznato je kako brojni čimbenici poput kemijskih tvari, zračenja, genetskih čimbenika ili virusa mogu izazvati promjenu normalnih stanica u neoplazme (zloćudne tumorske stanice) koje se potom nekontrolirano umnažaju (1). Zloćudni oblici tumora, rak, pojavljuju se u gotovo svakom organu, od kojih su najčešće zahvaćeni pluća, probavni organi, prostata u muškaraca, jajnici i dojke u žena, krvne stanice i kosti. U podlozi raka izuzetno su važne mutacije dvaju skupina gena: tumor-supresorskih gena i protoonkogeni. Tumor-supresorski geni inhibiraju proliferaciju u normalnim stanicama, primjerice geni p53(2) i Rb(3), a protoonkogeni potiču diobu stanica, poput primjerice obitelji gena RAS koja uključuje HRAS, KRAS i NRAS(4). Novije spoznaje o biologiji raka govore kako je u progresiji ove bolesti izuzetno važan čimbenik i biokemijska deregulacija i promjena redoks statusa u tumorskim stanicama(5). Stanice raka mogu i metastazirati, što znači da se premještaju s primarnog mjesta nastanka u neko susjedno ili udaljeno mjesto u tijelu. Metastaze se smatraju posljednjim stupnjem raka i još uvijek se ne mogu u potpunosti ukloniti te potpuno izlječenje nije moguće (6).

## 1.2. PROTUTUMORSKI LIJEKOVI

### 1.2.1. RAZVOJ NOVIH PROTUTUMORSKIH LIJEKOVA

(1). Literaturni podaci ukazuju na činjenicu kako je razvoj novog lijeka, od identifikacije mete do odobrenja za tržište, dugotrajan proces koji traje preko 12 godina (7). Uz dugi period razvoja novog lijeka, pribrajaju se i troškovi. Pokazalo se kako trošak otkrića novog lijeka raste linearno od 1950.-ih. Iz tog razloga stalno se razvijaju efektivniji i jeftiniji modeli razvoja novih lijekova (8). Ukratko, postupak razvoja lijeka počinje s bazičnim istraživanjima, gdje se otkrivaju početni spojevi koji djeluju na neku odabranu metu. Potom se provode *in vitro* farmakološka istraživanja, nakon čega slijedi predklinički razvoj. Uloga predkliničkih istraživanja je odabir jednog ili više kliničkih kandidata, od kojih svaki pokazuje dovoljnu biološku aktivnost usmjerenu na odabranu metu bolesti, kao i odgovarajuću sigurnost i farmakodinamička svojstva da bi se mogao testirati na ljudima (7). Neka od testiranja uključuju evaluaciju *in vitro* toksičnosti, analizu metaboličke stabilnosti, ADME (apsorpcija, distribucija, metabolizam i eliminacija), analize biomarkera te *in vivo* toksičnost. U ovim fazama daljnji se razvoj prekida ukoliko se utvrde ozbiljne nuspojave. Toksičnost i manjak efikasnosti testiranih spojeva su najčešći uzroci prekida razvoja. Klinička faza razvoja se dijeli na 3 glavne faze, gdje se u prvoj testira dugoročna toksičnost te reproduktivna toksičnost, te *in vivo* metabolizam. U drugoj fazi ključni elementi koji se evaluiraju uključuju ciljani učinak, djelotvornost i farmakodinamičku aktivnost. Zadnja, 3 faza, provodi se na velikom broju pacijenata. U analizi nekliničkih publikacija vezanih za razvoj komercijalnih lijekova, 75% svih publikacija je imalo i autora iz akademske zajednice što nije čudno s obzirom da se rane faze otkrića i razvoja lijeka provode kao bazična istraživanja. Stoga su suradnje između farmaceutskih tvrtki i individualnih akademskih grupa važna komponenta u razvoju lijekova (8).

Važan korak u razvoju lijekova su i pokusi na životinjama. U pokusnim životinjama se umjetno izazivaju simptomi bolesti, pa se zatim

životinjama daju spojevi koji bi trebali smanjiti te simptome. Iako životinje često očituju simptome slične onima u oboljelom čovjeku, spoj koji je djelotvoran u životinja ne mora biti djelotvoran i u ljudskom organizmu. Važno je pitanje u razvoju lijekova kako pronaći početnu kemijsku strukturu s biološkim djelovanjem, a koja se može dalje razvijati u lijek. U suvremenom se pristupu istraživanju lijekova sve više pristupa dizajniranju lijekova koje se temelji na osnovi fiziološkog procesa pojedine bolesti. Da bi takav pristup bio uspješan, trebale bi biti ispunjene sljedeće pretpostavke:

- Poznavanje mehanizama patogeneze bolesti kao osnove potrebne za razumijevanje bolesti,
- Laboratorijski biološki testovi za ispitivanje djelovanja lijeka i
- Testovi kojima se može ispitati djelovanje lijeka na čovjeku u potencijalnoj terapijskoj primjeni(1).

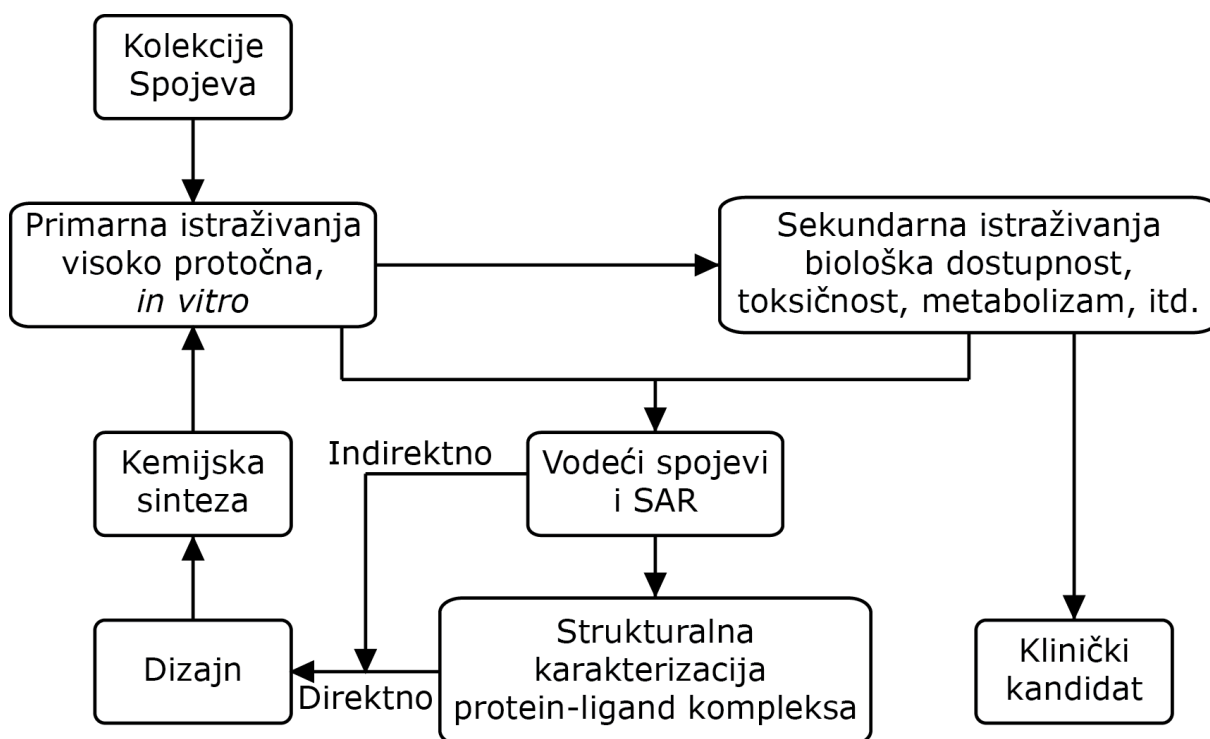
#### 1.2.2.METODE ISTRAŽIVANJA BIOLOŠKE AKTIVNOSTI ORGANSKIH MOLEKULA U RANIM FAZAMA RAZVOJA PROTUTUMORSKOG LIJEKA

U razvoju protutumorskih lijekova kemija ima važnu ulogu. Sintetička se kemija primjenjuje za optimiziranje prethodnih struktura lijekova dobivenih biološkim probirom, te za sintezu tvari izoliranih iz prirodnih spojeva koji su farmakološki učinkoviti., kao što je prikazano na slici 1 (6). *In vitro* (lat. u staklu) ispitivanja se provode na stanicama ili biološkim molekulama izvan njihovog normalnog biološkog okruženja. Primjerice, prvi korak u fenotipskom pristupu istraživanja vodećih bioaktivnih struktura s antitumorskim djelovanjem, oslanja se na procjeni antitumorske aktivnosti (9). Jedna od korisnih *in vitro* metoda za provjeru citotoksičnosti i stanične proliferacije je test MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid). Broj živih stanica koje rastu u mitrotitarskim pločicama se određuju automatskim spektrofotometrom, što čini ovu metodu brzom, jednostavnom,

sigurnom i jeftinom (10). Još jedna od korisnih metoda u primarnim istraživanjima je visoko-protočna metoda koja se temelji na probiru veće kolekcije spojeva koji se provode automatizirano na mikrotitarskim pločicama s 384 bunarića (11). Tako odabrani bioaktivni spojevi s najzanimljivijim i/ili selektivnim učinkom ulaze u postupak dodatnih ispitivanja kao što su analiza osnovnog mehanizma djelovanja *in vitro* i *in vivo*, analiza biološke dostupnosti, metabolizam spoja, evaluacija toksičnosti i slično (slika 1.). Važno je procijeniti i farmakološka svojstva ADME odabranih spojeva. Prije testiranja na životinjama, brojni, relativno brzi i jeftini *in vitro* testovi mogu poslužiti kao indikatori ADME svojstava spojeva *in vivo*. Iako je DNA jedna od ključnih meta, istraživanja su usmjerena i na razvoj protutumorskih lijekova čije su mete signalni procesi, angiogeneza (proces rasta novih krvnih žila iz već postojećih) te enzimi koji su, poput primjerice telomerase, aktivni u tumorskim stanicama (6). Osobito su stoga, u fazi definiranja ili evaluacije mete djelovanja novog lijeka, korisni računalni modeli uz pomoć kojih se oponašaju procesi i situacije bez potrebe provođenja eksperimenata na životinjskim modelima, što je isto kao i u *in vitro* metodama. Unatoč tome svemu i dalje je potrebna validacija rezultata (12).

Lipofilnost je važno svojstvo topivosti, ključno za apsorpciju i vezanje spoja za proteine plazme i općenito distribuciju. Lipofilnost se mjeri kao distribucija spoja između nevodene (oktanol) i vodene (voda) faze, te se rezultat prikazuje kao logaritam omjera koncentracija između te dvije faze, log P. Topivost u vodenoj otopini je također bitno svojstvo zato jer ono prikazuje biološku dostupnost spoja, a mjeri se spektrofotometrijski otapanjem u puferu određene pH vrijednosti. Metabolička stabilnost spoja se mjeri pomoću jetrenih mikrosoma (subcelularni dijelovi jetra) koji sadrže brojne enzime koji metaboliziraju lijekove, kao što su citokrom P450, monooksigenaze, karboksilesteraze i epoksid hidrolaze. Poboljšana ADME svojstva spojeva znače i bolja farmakokinetička svojstva, tj. ako se spoj brzo apsorbira, dobro distribuira, minimalno metabolički razgradi i sporo eliminira, a da nije toksičan, onda su veće

šanse da će brže doseći željenu koncentraciju u krvi, duže ju zadržati, prije nego padne na nisku koncentraciju, te na kraju bude eliminiran iz tijela (13). Kroz proces istraživanja, spojevi koji bi mogli postati vodeći se grupiraju. Kao dio tog procesa, u obzir će ulaziti grupacije čiji spojevi pokazuju odnos strukture i aktivnosti (SAR, od engl. *structure-activity relationship*), odnosno spojevi koji imaju zajedničke strukturne značajke koje povećavaju aktivnost, specifičnost vezanja i selektivnost (13,14). Jedna od važnih metoda istraživanja biološke aktivnosti u razvoju lijekova je i strukturalna karakterizacija protein-ligand kompleksa, kao što je prikazano na slici 1. NMR (nuklearna magnetska rezonancija) spektroskopija je ključna metoda u otkriću vodećeg spoja na temelju strukture zato jer je to jedna od robustnijih tehnika koja daje informacije o proteinskoj strukturi, dinamici i interakciji na atomskoj razini u otopini. Od interakcija, za istraživanje lijekova, najvažnije je identificirati i validirati vezanje malih molekula, odnosno potencijalnih lijekova, za protein odnosno metu od interesa (15). Temeljem tako prikupljenih saznanja iz ide se u proces dizajna i sinteze novih spojeva, koji se opet testiraju na isti način kao i početni spojevi (slika1.). Nakon *in vitro* ispitivanja provode se *in vivo* ispitivanja, na živim organizmima kao modelima bolesti (16). Metoda humane tumorske ksenografije, koja se zasniva na transplantaciji ljudskog tumorskog tkiva u imunotolerantne životinje, je korisna kod odabira protutumorskih lijekova jer ksenograf omogućuje simulaciju kemoterapijskih učinaka lijeka u uvjetima sličnim u ljudskom organizmu (1). Selektivna aktivnost spojeva između različitih staničnih linija u *in vitro* ispitivanjima, može dati naznake za selektivni učinak *in vivo* te konačno u kliničkim ispitivanjima.



**Slika 1.** Rane faze razvoja lijeka uključuju faze kemijske sinteze i optimizacije te biološku evaluaciju aktivnosti spojeva i osnovnih mehanizama njihovog djelovanja (17).

### 1.3. KEMOTERAPEUTICI

Novije tehnologije i strategije su dovele do razvoja sve učinkovitijih lijekova, od kojih monoklonalna protutijela i novi imunoterapeutske lijekovi omogućuju razvoj novih personaliziranih protokola koji pokazuju visoku učinkovitost i nisku toksičnost za pacijente. Za razvoj protutumorskih lijekova ključna je integracija multidisciplinarnih vještina, gdje su bioinformatika i predklinička istraživanja ključni koraci u razvoju najučinkovitih lijekova. Lijekovi koji se standardno koriste u kliničkim protokolima dijele se na kemoterapeutike (alkilirajući citostatici, antimetaboliti, protutumorski antibiotici, inhibitori topoizomeraze, mitotski inhibitori), ciljanu terapiju usmjerenu na protein kinaze i receptor, imunoterapiju i hormonalnu terapiju(18). Zbog visokog proliferativnog indeksa, mnoge hematološke malignosti dobro reagiraju



na citotoksičnu kemoterapiju. Citotoksična kemoterapija također se koristi i kod pacijenata sa uznapredovalim tumorima, gdje je najbolji odgovor na kemoterapiju često smanjenje volumena tumora, što omogućuje uspješno produženje života i/ili kontrolu simptoma. Najčešći razlog neuspjeha tretmana je otpornost stanica tumora na lijek(19).

Pomoćna kemoterapija se nudi pacijentima koji imaju visoki rizik od vraćanja tumora poslije kirurškog uklanjanja mnogih tumora, ili kao tretman lokaliziranog tumora prije operacije. Kemoterapija u kombinaciji sa radioterapijom se pokazala često učinkovitija nego sama kemoterapija(19).

Procesi koji su vezani za proliferaciju stanica su uobičajeni i za normalne i za tumorske stanice, što znači da su obje populacije stanica podložne oštećenju uzrokovanom kemoterapijom, no selektivnost prema tumorskim stanicama se javlja zato jer neki tumori brže proliferiraju od normalnih stanica ili nemaju sposobnost popravka DNK, što im onemogućuje repopulaciju nakon citotoksičnog oštećenja. Brzo rastuće stanice koštane srži, gastrointestinalne sluznice, folikula dlake i gonada su najosjetljivije, te su zbog toga česte nuspojave mijelosupresije, mučnine i povraćanja, gubitka kose i smanjenje plodnosti. Nuspojave se mogu pojaviti i nakon nekoliko mjeseci (kardiomiopatija uzrokovana doksorubicinom, i plućna fibroza uzrokovana bleomicinom)(19). Zbog toksičnosti za normalno tkivo, većina lijekova se primjenjuje naizmjenično u ciklusima od 2,3 ili 4 tjedna. Kemoterapija se administrira na razne načine, ovisno o farmakološkim svojstvima lijeka *in vivo*, uključujući intravenozno, intramuskularno i oralno. Da bi se proširio terapijski prozor, kemoterapija se pokušava dostaviti direktno u područje tijela gdje je najveći utjecaj tumora. To se postiže specijalnim nosačima koji imaju veći afinitet prema tumorskim stanicama tako što ulaze u interakciju s tumor specifičnim ili tumor-povezanim antigenima. Primjer takvih lijekova uključuje doksorubicin enkapsuliran u liposomima i paklitaksel vezan za proteine(19). Rak je genetska bolest, i uz napredak sekvencioniranja, tisuće gena se mogu umnožiti iz malih fragmenata

tumora, što bi moglo jednog dana omogućiti planiranje terapija prema vjerojatnosti uspjeha u individualnim pacijentima.

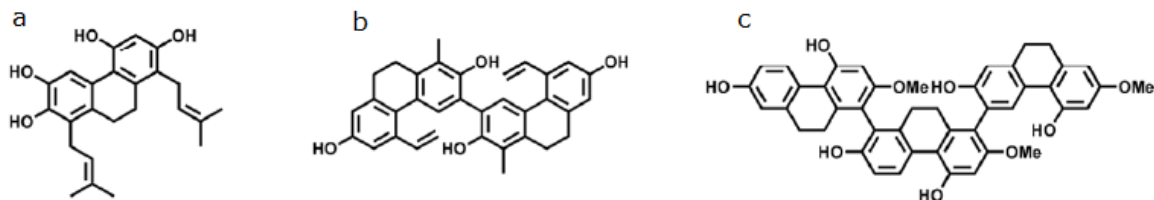
## **1.4. FENANTRENI**

### **1.4.1. FENANTRENI OPĆENITO**

Veliki broj različito supstituiranih fenantrena koji posjeduju različite biološke aktivnosti je pronađen u biljkama (20). U prošlosti je izolirano preko 200 novih derivata fenantrena iz biljaka porodica *Annonaceae*, *Cannabaceae*, *Euphorbiaceae*, *Juncaceae*, *Lauraceae*, *Malpighiaceae*, *Orchidaceae* i drugih. Iako su mnoge biljke, koje sadrže fenantrene, korištene stotinama godina u tradicionalnoj medicini za liječenje bolesti, kemijski sastav i mehanizam djelovanja mnogih od tih vrsta nije dovoljno poznat, te je predmet daljnjih istraživanja (21).

### **1.4.2. STRUKTURA FENANTRENA**

Dosada izolirani fenantreni mogu se svrstati u tri velike grupe: monofenantreni, difenantreni i trifenantreni (slika 2.). Monofenantreni se dijele prema broju i tipu strukturnog ostatka. Difenantreni se dijele po tipu veze fenantrenskih jedinica, dok je do sad od grupe trifenantrena identificiran samo jedan spoj. Većina prirodnih fenantrena (oko 210 spojeva) su monofenantreni (20). Dokazano je kako je L-fenilalanin ključni prekursor za biosintezu, iz kojeg većina biljaka sintetizira derivate malonil-CoA i CoA-estera cimetne kiseline (21). Ti su spojevi prekursori stilbenoida, iz kojeg se uz pomoć enzima stilben sintaze, formira stilbenski kostur. Fenantrenska jezgra se može proizvesti iz stilbena UV radijacijom u prisutnosti oksidanta (21).



**Slika 2.** Prikaz struktura fenantrena i iz tri grupe fenantrena: a- prenil supstituirani fenantren (monofenantreni), b- efususin A (difenantreni), c- monbarbatain D (trifenantreni) (21)

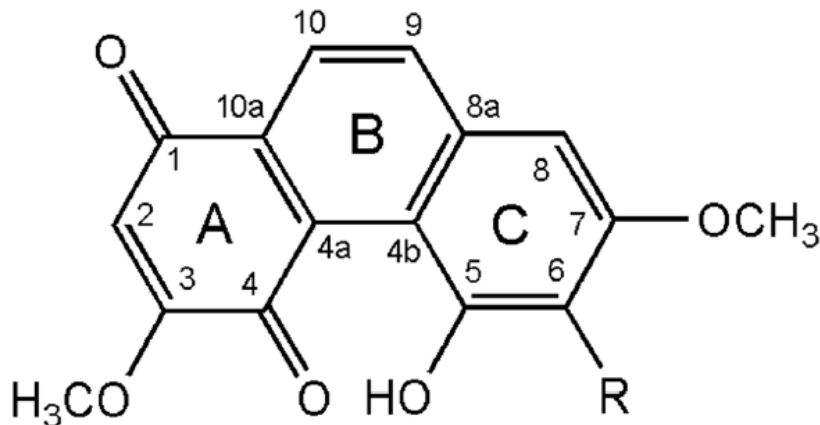
Utvrđeno je kako su skoro svi prirodno pristuni fenantreni supstituirani. Većina supstituenata je prisutna na C-2 i C-7, a zatim slijede po zastupljenosti supstituenti na C-10, C-9, C-3, C-6 i C-4 (21). Skoro svi monofenantreni imaju supstituiranu hidroksi grupu kao što je prikazano na slici 1a, O-glikozidi su spojevi koji nemaju ovaj supstituent. Druga najzastupljenija je metoksi grupa, kao što je vidljivo na slici 1c (21).

#### 1.4.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST FENANTRENA

Fenantreni pokazuju širok raspon biološke aktivnosti, uključujući: antiproliferativnu aktivnost koja je testirana većinom koristeći MTT ili SRB (od engl. *sulfate reducing bacteria*) testove na brojnim tumorskim stanicama i bakterijama (HCT-116, MCF-7, HeLa, HepG2, PC3, MCR-5, itd.), inhibiciju rasta virusa, gljivica i bakterija što je testirano metodom mikrodilucije u bujonu, anti-inflamatornu aktivnost koja je testirana LPS-induciranom proizvodnjom dušikovog oksida na makrofazima, antioksidativnu aktivnost utvrđenu uz pomoć metode deplecije slobodnih radikala, antialergijsku aktivnost koja je testirana na mononuklearnim stanicama koštane srži, te anksiolitičku aktivnost koja je testirana EMP (od engl. *elevated plus maze*) testom na miševima (20–23).

### 1.4.3.1. CITOTOKSIČNO DJELOVANJE

(20). Od svih, denbinobin, izoliran iz biljke *Dendrobium nobile*, jedan od najbolje istraženih derivata fenantrena sa značajnim citotoksičnim učinkom (22). Citotoksično djelovanje denbinobina smatra se da uključuje nekoliko različitih mehanizama djelovanja poput primjerice apoptoze stanica raka crijeva . Pokazano je kako denbinobin inducira apoptozu tako što inducira veće razine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *eactive oxygen species*) u stanicama adenokarcinoma pluća i u stanicama Jurkat leukemije. Čini se da je ovaj učinak u vezi s kinonskom podstrukturom spoja koja dovodi do MAPK-neovisne aktivnosti proizvodnje ROS (21). Nadalje, kalankinon A, fenantren izoliran iz biljke *Calanthe arisanensis*, pokazao je do 7 puta jači citotoksični učinak od denbinobina, na stanicama karcinoma jetra HepG2 , raka pluća A549 i raka dojke MCF7 (24). Stukture kalankinona A i denbinobina su prikazane na slici 3.



Kalankinon A    R = OCH<sub>3</sub>  
Denbinobin    R = H

**Slika 3.** Stukture fenantrena kalankinona A i denbinobina (24).

#### 1.4.3.2. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE

Nakupljanje fitoaleksina u biljkama je njihov odgovor na infekciju patogenih gljivica, čime sprječavaju njihov rast. Fenantreni i dihidrofenantreni su poznati kao fitoaleksini (20). Nekoliko fenantrena je testirano na različitim bakterijskim i gljivičnim sojevima, i mnogi od njih su pokazali dobru inhibiciju rasta bakterija. Etanolni ekstrakt *Combretum adenogonium* je pokazao antimikrobnu aktivnost protiv 9 bakterijskih sojeva (*B. anthracis*, *B. cereus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. aureus*, and *S. faecalis*)(21).

#### 1.4.3.3. ANTI-INFLAMATORNO DJELOVANJE

Nekoliko biljaka koje sadrže fenantrene su se koristile tradicionalno kao antiflogistici (sredstva koja smanjuju upalu). Stabljika biljke *Dendrobium denneanum* sadrži 12 spojeva, uključujući kumarine, derivate cimetine kiseline te fenantrene. Fenantreni izolirani iz *D. denneanum* su pokazali snažno anti-inflamatorno djelovanje u RAW264.7 stanicama koje su proizvodile NO (dušikov oksid) potaknute liposaharidom(LPS)sa IC<sub>50</sub> vrijednostima 0.7-4.6 μM. NO je upalni medijator koji igra ključnu ulogu u brojnim upalnim bolestima (23).

#### 1.4.3.4. OSTALI UČINCI

Fenantreni izolirani iz biljaka roda *Dendrobium* su pokazali, također i dobro antioksidativno djelovanje. 5 fenantrena izoliranih iz biljke *D. nobile* su testirani DPPH metodom (test za mjerenje antioksidativnog djelovanja). Jedan od izoliranih fenantrena, konfuzarin, je pokazao usporedivu aktivnost askorbinskoj kiselini (vitamin C) sa IC<sub>50</sub> vrijednosti 12.9 μM. Studije odnosa strukture i aktivnosti ukazuju na to da metoksi-

i hidroksi- grupe u orto poziciji pridonose jačoj antioksidativnoj aktivnosti (21).

## **1.5. OKSIDATIVNI STATUS TUMORSKIH STANICA KAO META DJELOVANJA PROTUTUMORSKIH LIJEKOVA**

U tumorskim je stanicama promijenjena redoks ravnoteža, a time je poremećena razina slobodnih radikala i redoks signalizacija, te je osobito povećana količina reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species, ROS*). Povećane razine ROS mogu potaknuti rast tumora, aktivaciju upalnih procesa a što je pokazano da često ovisi o stabiliziranom obliku hipoksija inducibilnog faktora-1 (HIF-1) odnosno promjene metabolizma stanice. Međutim, visoke razine ROS mogu biti štetne za tumorske stanice, zbog čega se one metabolički prilagođavaju kako bi razina antioksidativnih molekula bila dovoljna za opstanak stanice u uvjetima povećanog oksidativnog stresa. Povezanost između metabolizma i redoks ravnoteže u tumorskim stanicama mnogo se istražuje, posebno uloga glikolize, oksidacije masnih kiselina te glutaminolize. Pretpostavlja se da razine ekspresije određenih onkogeni, npr. c-Myc, koji su dio signalne kaskade Ras-Raf-Mek-Erk (25) također reguliraju metabolički profil tumora(26). Upravo je uloga HIF-1 i c-Myc ključna u promjeni metabolizma tumorskih stanica s anaerobne respiracije u glikolizu odnosno u održavanju Warburg efekta koji opisuje preferencijalno korištenje anaerobnog procesa glikolize tumorskih stanica čak i u aerobnim uvjetima(27).

### **1.5.1. ULOGA HIF-1 U HIPOKSIČNIM UVJETIMA U TUMORSKIM STANICAMA**

Hipoksija inducibilni faktor (HIF) je heterodimerni, DNA-vezujući protein koji se sastoji od proteina HIF-1 $\beta$  i jedne od dvije hipoksija-inducibilne  $\alpha$ -podjedinice, HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  imaju sličnu

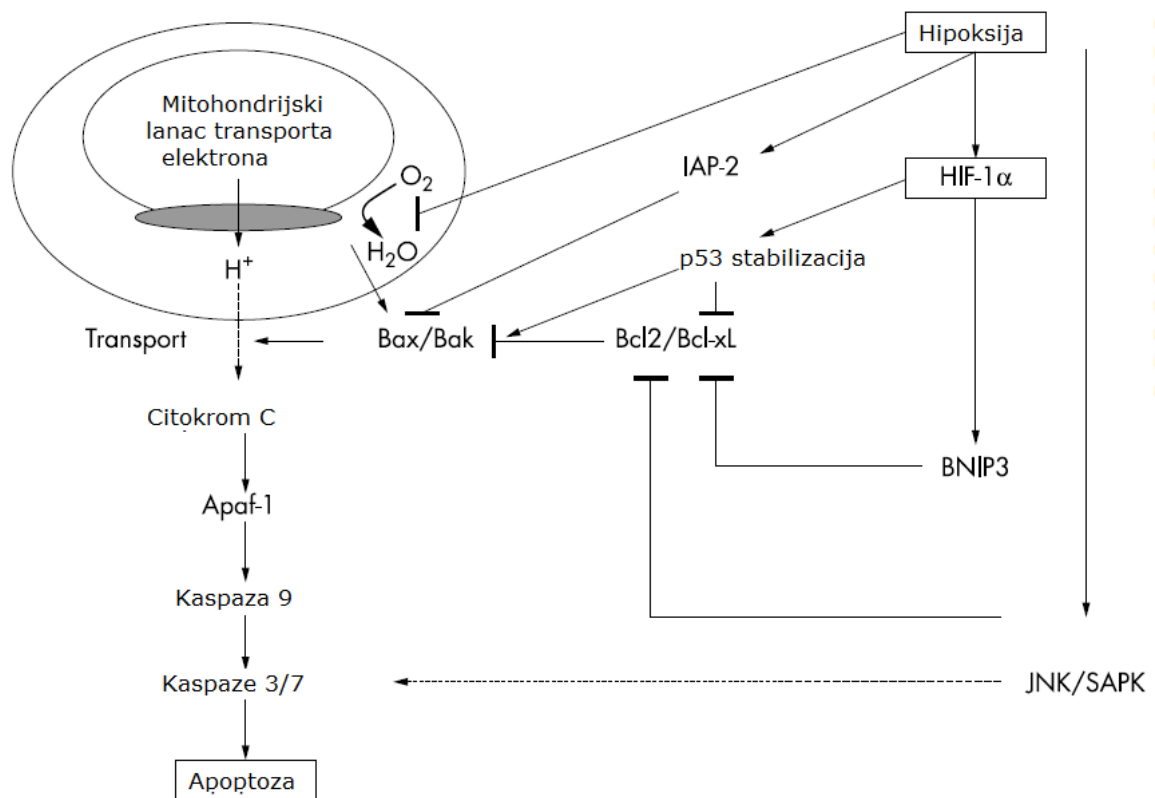
strukturu i proteolitičku regulaciju, no ekspresija HIF-2 $\alpha$  je u tkivima ograničene prirode. Postoji i HIF-3 $\alpha$  izoforma, no njena uloga nije još u potpunosti razjašnjena(28). HIF- $\alpha$  proteini djeluju kao regulatorne podjedinice, ključne u odgovoru na kisikom uzorkovan stres (29). U normoksičnim uvjetima (uvjeti normalne koncentracije kisika), HIF- $\alpha$  podjedinice imaju jako kratko vrijeme poluraspada, zbog čega ih stanice kontinuirano sintetiziraju i degradiraju. Međutim, u hipoksičnim uvjetima (uvjeti sa smanjenim koncentracijama kisika ili u tumorskim stanicama), dolazi do smanjenja degradacije HIF- $\alpha$ (28).

HIF-om posredovani stanični putevi uključuju metaboličku prilagodbu, eritropoezu, angiogenezu i krvožilni tonalitet, rast i diferencijaciju stanica, njihovo preživljavanje i apoptozu, što ih čini ključnim faktorima u razvoju, fiziologiji i bolesti. U hipoksičnim uvjetima,  $\alpha/\beta$  heterodimer se vežu za tzv. pentanukleotidni niz RCGTG u dijelu genoma/ciljnom genu odgovornom za odgovor na hipoksiju (engl. *hypoxia response elements, HREs*) (28). Odnos između kisika i HIF- $\alpha$  podjedinice je omogućen enzimatskom reakcijom, hidroksilacije dva prolilska ostatka (Pro402 i Pro564) u regiji degradacije ovisne o kisiku (engl. *oxygen dependent degradation domain, ODDD*). U hipoksičnim uvjetima, hidroksilacija prolila je potisnuta, što dovodi do nakupljanja HIF- $\alpha$  proteina u stanici (28).

Vezujuća mjesta HIF-1 $\alpha$  su otkrivena i u genima koji kodiraju za glikolitičke enzime fosfoglicerat kinazu-1 i laktat dehidrogenazu A. Metabolizam glukoze je ovisan o kisiku i energetski je jako učinkovit. Glukoza se pretvara u piruvat, u citoplazmi, nakon čega se piruvat razgradi u mitohondriju kroz krebsov ciklus (engl. *tricarboxylic acid cycle, TCA*) i oksidativnu fosforilaciju. U nedostatku kisika stanice koriste, energetski neisplativiji, metabolizam piruvata u laktatnu kiselinu. Mnogi enzimi odgovorni za mijenjanje metabolizma prema anaerobnoj glikolizi su pod direktnom kontrolom HIF-1 $\alpha$  (28). Nakon dosezanja određene veličine tumora, jednostavna difuzija kisika postane nedovoljna da bi se dostigli metabolički zahtjevi brzo proliferirajućih stanica. Stoga se s rastom tumora odvija i proces angiogeneze odnosno

stvaranja novih krvnih žila za opskrbu tumora kisikom i hranjivim tvarima. To je proces koji uključuje veliki broj signalnih putova i biomolekula, od kojih mnoge, kao što su to sintetaza dušikovog oksida, angiogenetski i vaskularni faktori rasta (VEGF) i geni koji reguliraju metabolizam matriksa, kontrolira HIF-1 $\alpha$  (28). Jedan mogući odgovor stanice na hipoksiju uključuje i aktivaciju programirane stanične smrti – apoptoze. Jačina hipoksije uvjetuje hoće li stanice ući u apoptozu ili će se prilagoditi na hipoksiju i preživjeti. S obzirom je hipoksija učestala u tumorskim stanicama, tumori razvijaju otpornost na apoptozu uzrokovanu hipoksijom ako su duže vremena izloženi hipoksiji. Takvi tumori su manje osjetljivi čak i na protutumorske lijekove. Ključni regulator tog procesa, HIF-1, može inducirati apoptozu tako što potiče velike koncentracije proapoptotskih proteina, kao što su to BNIP3, te može izazvati stabilizaciju proteina p53. Apoptoza je proces koji zahtjeva energiju, pa tako u stanicama tumora gdje je koncentracija ATP-a niska zbog manjka kisika i nutrijenata, dolazi do stanične smrti nekrozom, umjesto apoptozom. Apoptozu regulira kaskada proteina koji se zovu kaspaze, prisutne u svim stanicama. Cijepanjem kaspaze postanu aktivne i pokreću proteolizu staničnih proteina. HIF-1 $\alpha$  može inducirati apoptozu na dva načina: (1) povećanjem stabilnosti tumor supresorskog gena p53, tako da se veže direktno na p53 ubikvitin ligazu mdm2 ili da (2) inducira apoptozu je putem proapoptotičkih proteina BNIP3 i NIX (BNIP3 homolog), koji su pretjerano eksprimirani u hipoksičnim perinekrotičkim regijama tumora. Poznato je kako aktivacija p53 inducira programiranu staničnu smrt u slučaju stresa ili oštećenja DNA, regulirajući proteine poput Bax, ili može izazvati zaustavljanje rasta aktivacijom proteina p21. BNIP3 inducira apoptozu tako da se veže i inhibira antiapoptotske proteine Bcl-2 i Bcl-xL. Oba načina su prikazana shematski na slici 4. Uzevši u obzir da je HIF-1 povezan sa otpornošću na kemoterapiju i radioterapiju, ciljanje HIF-1 može poboljšati protutumorsku terapiju (30).





**Slika 4.** Shematski prikaz signalnih puteva induciranih hipoksijom koji vode do apoptoze. Pune linije pokazuju direktnu vezu, dok iscrtane pokazuju indirektnu interakciju. Apaf-1, apoptotski proteaza aktivirajući faktor-1; BNIP3, BCL-2/adenovirus E1B 19kDa interagirajući protein 3; HIF-1, hipoksija inducirajući faktor 1; IAP-2, inhibitor apoptotskog proteina 2; JNK, c-Jun NH<sub>2</sub> terminalna kinaza; SAPK, stresom aktivirana protein kinaza (30).

## 1.6. SIGNALIZACIJA RAS-RAF-MEK-ERK

MEK1 i MEK2 su hidrofilni, nerekceptorski proteini, eksprimirani u tkivima cijelog organizma. Oni sudjeluju u RAS-RAF-MEK-ERK signalnoj kaskadi, koja se često naziva i kaskada mitogen aktivirane protein kinaze (MAPK). MEK proteini se sastoje od trifunkcionalne N-terminus sekvence od oko 70 aminokiselina, domene protein kinaze koja se sastoji od oko 290 ostataka i C-terminus sekvence od oko 30 ostataka. MEK1/2 imaju

mali N-terminalni i veliki C-terminalni kraj koji sadrže nekoliko konzerviranih  $\alpha$ -heliksa i  $\beta$ -ploča. N-terminalna sekvenca sadrži inhibitorne segmente, sekvencu koja služi za transport iz jezre i segment koji pomaže u vezanju za ERK supstrate. Faktori rasta važni su u kontroli procesa diferencijacije, proliferacije i stanične smrti, a vrše tu ulogu upravo aktivacijom signalnih kaskada vezanjem za pripadajuće membranske receptore. Tako primjerice, Ras-mitogenom aktivirana protein kinaza (MAPK) signalni put također regulira rast i preživljavanje stanica. MAPK signalizacija prenosi signale za rast stanica s površine stanice ili citoplazme u jezgru putem kaskade protein kinaza. MAPK put poremećen je u malignim bolestima čovjeka što pridonosi malignoj transformaciji stanica te se u mnogim radovima povezuje s agresivnim neoplastičnim fenotipom, uključujući nekontroliranu proliferaciju stanica i otpornost na apoptozu, kao i otpornost na kemoterapiju u mnogim malignim oboljenjima (rak crijeva, pluća, jajnika, dojke, štitnjače i bubrega). Ključni geni koji su uključeni u MAPK signalni put, a čije mutacije uzrokuju abnormalne aktivnosti, su RAS i BRAF. Mutacije RAS i BRAF mogu rezultirati onkogenim učincima putem zajedničkog nizvodnog proteina, primjerice MEK ili zbog čega su ti proteini odlične mete za protutumorske lijekove. Aktivnost proteina MEK1 je pozitivno regulirana Raf fosforilacijom, dok je za protein MEK1 nizvodna meta najčešće ERK. ERK nizvodno ima brojne mete, što čini terapijsko ciljanje proteina MEK1 relativno specifičnim (25).

## 2. CILJ RADA

Glavni ciljevi rada:

1. Ispitati citotoksičnost i antiproliferativno djelovanje novih derivata fenantrena na odabranom panelu tumorskih staničnih linija u uvjetima *in vitro* te za kandidate s najjačim i/ili selektivnim učinkom na stanice utvrditi strukturne karakteristike;
2. Odabrati potencijalne mete novih derivata fenantrena utvrđenih uz pomoć *in silico* analize PIDGIN;
3. Ispitati relativnu proteinsku ekspresiju odabranih potencijalnih meta temeljem *in silico* analize (proteina HIF-1 $\alpha$  i MEK 1/2) uz u stanicama tretiranim odabranim fenantrenskim kandidatima.

Hipoteza istraživanja je da će s obzirom na prethodna istraživanja različitih struktura fenantrena koje su pokazale biološku aktivnost, uključujući i onu protutumorsku, nova serija fenatrenskih derivata pokazati antiproliferativne učinke na tumorskim staničnim linijama temeljem kojih se mogu odabrati nove strukture ili struktura za daljnju optimizaciju u razvoju novih protutumorskih struktura.

### **3. MATERIJALI I METODE**

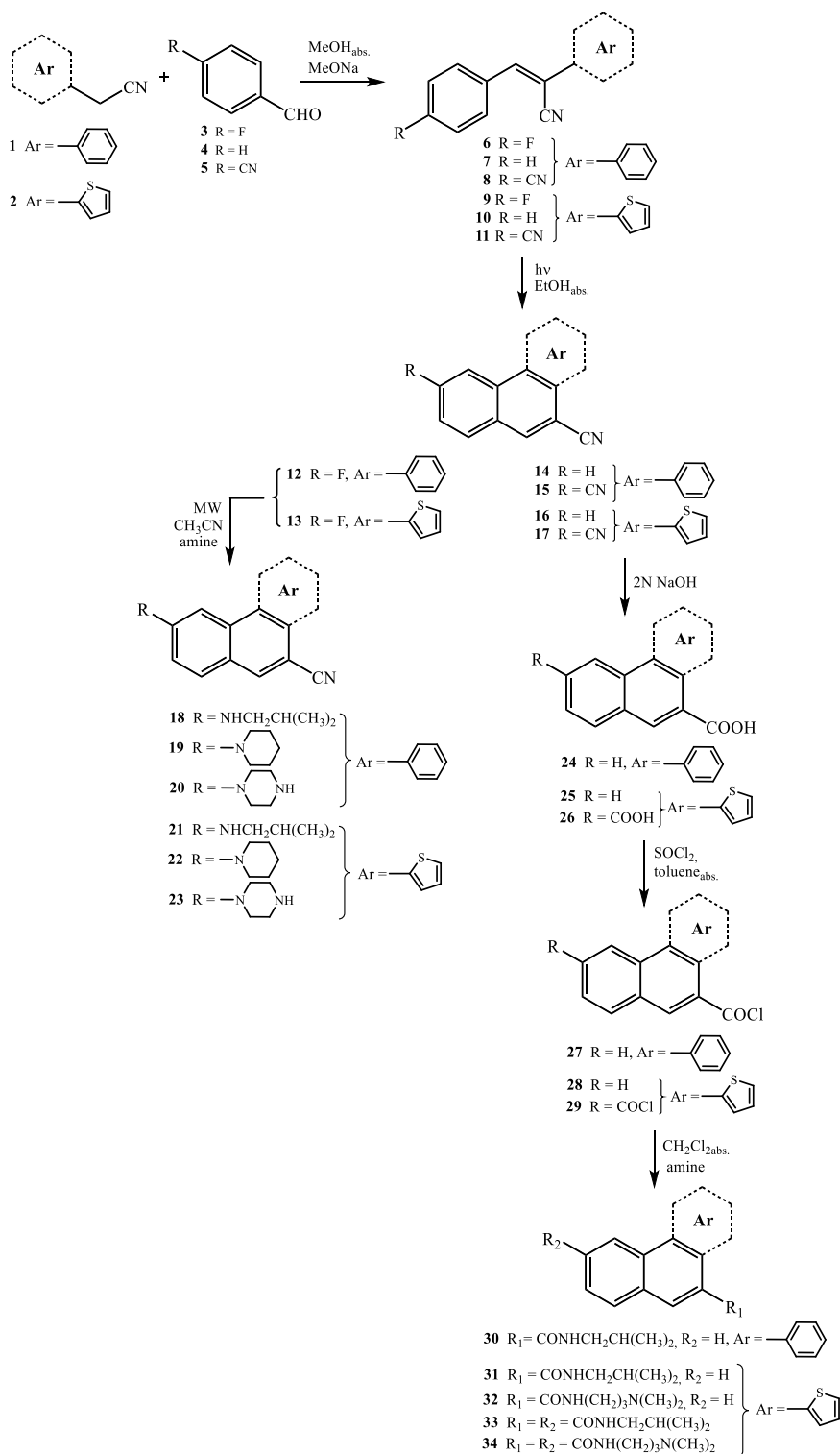
#### **3.1. UZGOJ STANIČNIH KULTURA *IN VITRO***

Stanične linije koje su korištene u pokusima u ovom radu su: A549 stanice adenokarcinoma bazalnog epitela alveola, CFPAC-1 stanice dukalnog adenokarcinoma gušterače, HeLa stanice karcinoma grlića maternice, HepG2 stanice hepatocelularnog karcinoma jetre, SW620 stanice adenokarcinoma debelog crijeva nabavljene preko ATCC (The American Type Culture Collection, SAD). Tekuća hranjiva podloga DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza, Bazel, Švicarska) je korištena za uzgoj stanica, prethodno kompletirana sa 10%-tnim serumom goveđeg fetusa (FBS, engl. Fetal bovine serum, Lonza), 2mM L-glutaminom (Lonza), 100 jedinica/mL penicilinom i 100 µg/mL streptomycinom (Lonza). Tumorske stanice uzgajane su u inkubatoru pri temperaturi od 37°C i 5% CO<sub>2</sub> u plastičnim bocama za stanične kulture (Falcon, SAD). Nakon što su postale konfluentne, tumorske stanice su presađene korištenjem 0,25%-tne otopine tripsina (Lonza). Utvrđivanje broja i vijabilnosti stanica provodilo se tako da je 10 µL suspenzije stanica pomiješano s 10µL 10%-tne otopine tripanskog modrila, koja specifično boji mrtve stanice u plavo, nakon čega su stanice prebrojane pomoću automatskog brojača stanica (Countess™ Automated Cell Counter, Invitrogen SAD). Kalibracija uređaja je odrađena prethodno sa 10µL 10%-tne otopine tripanskog modrila i 10 µL PBS.

#### **3.2. DERIVATI FENANTRENA**

Novi derivati fenantrena sintetizirani su u suradnji s grupom kemičara na Fakultetu za kemijsko inženjerstvo i tehnologiju u Zagrebu pod voditeljstvom prof. Marijane Hranjec. Svi novo pripremljeni spojevi su sintetizirani prema glavnoj eksperimentalnoj proceduri za sintezu prezentiranu na slici 5. Aciklički prekursori 6-11 su pripremljeni u reakciji aldolne kondenzacije odgovarajućih benzaldehida 3-5 i benzilcijanida 1 ili

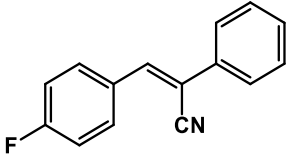
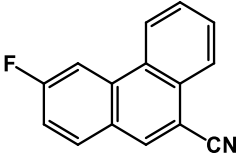
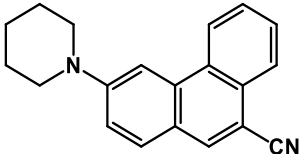
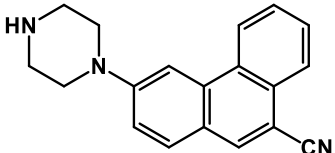
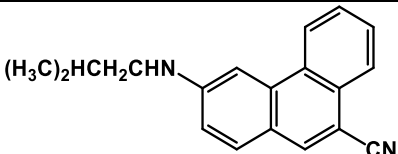
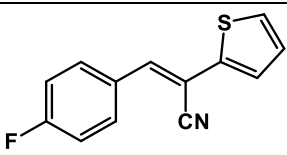
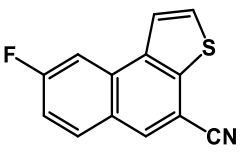
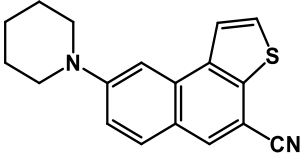
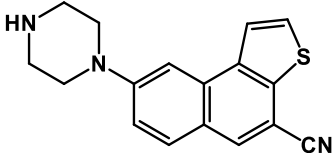
2-(tiofen-2-il)acetonitril 2 u apsolutnom metanolu koristeći natrijev metoksid kao bazu (31).

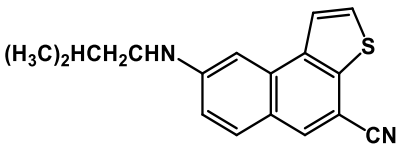
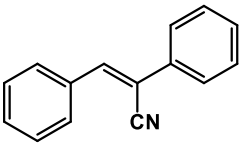
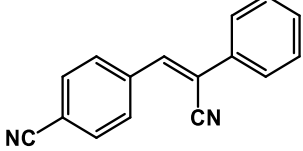
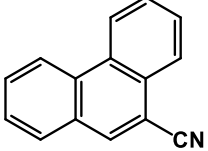
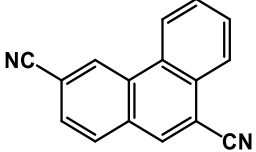
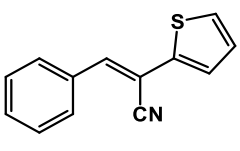
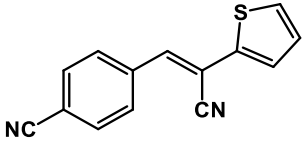
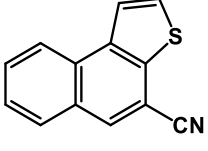
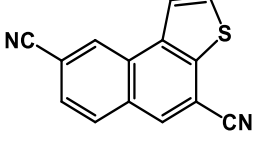
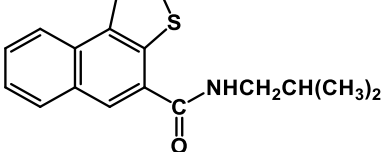


**Slika 5.** Shematski prikaz sinteze fenantrena i nafto[2,1-b]tiofen derivata (31).

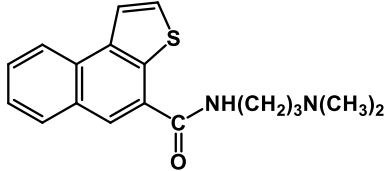
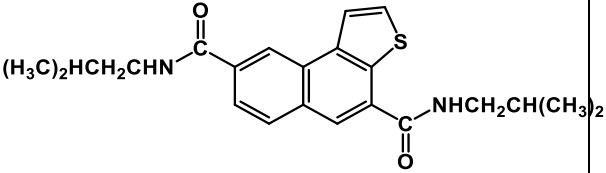
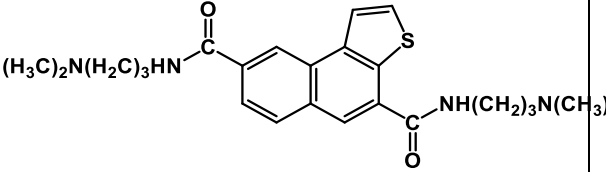
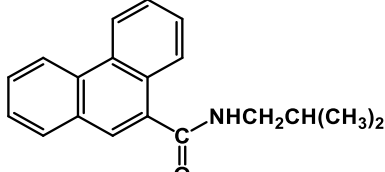
Cicklički derivati fenantrena 12-14 i nafto[2,1-b]tiofena 15-17 su pripremljeni fotokemijskom dehidrociklizacijom u etanolnoj otopini sa dodatkom male količine joda, koristeći 400 W visoko-tlačnu živinu lampu i Pyrex filter 2-37 sati. Fotokemijska dehidrociklizacijska reakcija je kontrolirana sa UV/Vis spektroskopijom. Ciljani amino substituirani fenantreni 18-20 i nafto[2,1-b]tiofeni 21-23 su pripremljeni za glavne prekursore, točnije 3-fluorofenantren-9-karbonitril 12 ili 8-fluoronafto[2,1-b]tiofen-4-karbonitril 15 pomoću nekatalizirane, mikrovalno potpomognute aminacije sa suviškom dodanog odgovarajućeg amina. Reakcija je provedena u acetonitrilu na 170°C. Unutar bazične hidrolize derivata sa cijano skupinama 13-14 i 16-17 u 2N NaON, dobivene su odgovarajuće karboksilne kiseline 24-26. Karboksilne kiseline su u reakciji sa tionil kloridom dale odgovarajuće acil halogenide 27-29 kao glavne prekursore za sintezu amida. Derivati supstituirani sa amidima 30-34 su dobiveni sa reakcijom acil halogenida 27-29 i suviškom odgovarajućeg amina u apsolutnom diklormetanu. Strukture svih pripremljenih spojeva su određene sa NMR spektroskopijom ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ )(31).

**Tablica 1.** Popis testiranih spojeva, strukture i njihova svojstva.

| ID | Strukture   | Strukturna grupa                   | Mr / g mol <sup>-1</sup> | m / mg |
|----|---|------------------------------------|--------------------------|--------|
| 6  |    | fluoro<br>supstituirani<br>derivat | 223,25                   | 5,1    |
| 12 |    | fluoro<br>supstituirani<br>derivat | 221,23                   | 5,1    |
| 19 |    | amino<br>supstituirani<br>derivat  | 286,38                   | 3,9    |
| 20 |   | amino<br>supstituirani<br>derivat  | 287,37                   | 5,7    |
| 18 |  | amino<br>supstituirani<br>derivat  | 274,37                   | 3,4    |
| 9  |  | fluoro<br>supstituirani<br>derivat | 229,27                   | 4,9    |
| 13 |  | fluoro<br>supstituirani<br>derivat | 227,26                   | 4,0    |
| 22 |  | amino<br>supstituirani<br>derivat  | 292,40                   | 5,6    |
| 23 |  | amino<br>supstituirani<br>derivat  | 293,39                   | 5,0    |

|           |   |                                      |        |     |
|-----------|---|--------------------------------------|--------|-----|
| <b>21</b> |    | amino<br>supstuitirani<br>derivat    | 280,39 | 4,2 |
| <b>7</b>  |    | cijano<br>supstuitirani<br>derivat   | 205,26 | 4,4 |
| <b>8</b>  |    | dicijano<br>supstuitirani<br>derivat | 230,27 | 5,6 |
| <b>14</b> |    | cijano<br>supstuitirani<br>derivat   | 203,24 | 3,8 |
| <b>15</b> |   | dicijano<br>supstuitirani<br>derivat | 228,25 | 3,7 |
| <b>10</b> |  | cijano<br>supstuitirani<br>derivat   | 211,28 | 5,1 |
| <b>11</b> |  | dicijano<br>supstuitirani<br>derivat | 236,29 | 5,6 |
| <b>16</b> |  | cijano<br>supstuitirani<br>derivat   | 209,27 | 5,3 |
| <b>17</b> |  | dicijano<br>supstuitirani<br>derivat | 234,28 | 3,7 |
| <b>31</b> |  | amido<br>supstuitirani<br>derivat    | 283,39 | 3,5 |



|    |   |                                   |        |     |
|----|---|-----------------------------------|--------|-----|
| 32 |  | amido<br>supstituirani<br>derivat | 312,43 | 5,1 |
| 33 |  | amido<br>supstituirani<br>derivat | 382,52 | 4,5 |
| 34 |  | amido<br>supstituirani<br>derivat | 440,61 | 6,0 |
| 30 |  | amido<br>supstituirani<br>derivat | 277,37 | 4,2 |

### 3.3. TEST PROLIFERACIJE STANICA

Analiza proliferacije stanica izvršena je pomoću MTT testa na 5 tumorskih staničnih linija *in vitro* (A549 stanice adenokarcinoma bazalnog epitela alveola, CFPAC-1 stanice duktalnog adenokarcinoma gušterače, HeLa stanice karcinoma grlića maternice, HepG2 stanice hepatocelularnog karcinoma jetre, SW620 stanice adenokarcinoma debelog crijeva) te na jednoj staničnoj liniji netransformiranih stanica fibroblasta HFF-1. MTT test je kolorimetrijska metoda koja se temelji na metaboličkoj aktivnosti stanica. Gleda se sposobnost živih stanica da reduciraju tetrazolijevu sol, žute boje, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid) u netopljive kristale formazana ljubičaste boje, čija je reakcija prikazana na slici 6. Korišten je protokol opisan u (32). Na pločice sa 96 jažica (FALCON®, SAD) nasaden je volumen od 150  $\mu\text{L}$  stanične suspenzije u koncentraciji  $5 \times 10^3$  stanica/jažici. 24 sata nakon nasadivanja, u jažice se dodalo 50  $\mu\text{L}$

ispitivanih derivata u razrjeđenjima  $1 \times 10^{-8}$ - $1 \times 10^{-4}$   $\mu\text{M}$ , dok je u kontrolu dodano 50  $\mu\text{L}$  medija bez derivata. Stanice sa su inkubirane 72 sata nakon čega im je uklonjen sav medij sa spojevima ili bez spojeva. Dodano je potom u svaku jažicu 40  $\mu\text{L}$  otopine MTT (Sigma, Njemačka), koncentracije 2 mg/ml. Nakon inkubacije (3h), u svaku jažicu dodan je 160  $\mu\text{L}$  DMSO (dimetil-sulfoksid, Kemika, Hrvatska). Kako bi se formazan potpuno otopio u DMSO, za vrijeme mjerenja na čitaču mikrotitarskih pločica (Sunrise™, Tecan, Švicarska) uređaj je podešen na trešenju (cca. 2 minute). Apsorbancija, koja je proporcionalna broju živih stanica, je mjerena pri valjnoj duljini od 570 nm. Preživljenje stanica (PG, engl. Percentage of growth) se određuje pomoću srednjih vrijednosti optičke gustoće  $OD_{\text{nulti dan}}$  (srednja vrijednost apsorbancije netretiranih stanica nakon 24 sata od nasađivanja),  $OD_{\text{test}}$  (srednja vrijednost apsorbancije 72 sata nakon tretmana ispitivanim spojevima) i  $OD_{\text{kontrola}}$  (srednja vrijednost apsorbancije netretiranih stanica nakon 72 sata od nasađivanja) prema protokolu NCI-a (engl. National Cancer Institute, SAD).

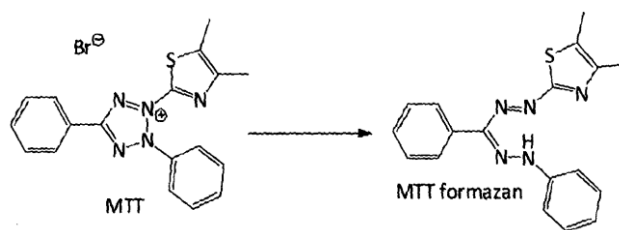
Ukoliko je (srednja vrijednost  $OD_{\text{test}}$  – srednja vrijednost  $OD_{\text{nulti dan}}$ )  $\geq 0$  tada se izračun provodi na sljedeći način:

$$PG = 100 \times \left( \frac{\text{srednja vrijednost } OD_{\text{test}} - \text{srednja vrijednost } OD_{\text{nulti dan}}}{\text{srednja vrijednost } OD_{\text{kontrola}} - \text{srednja vrijednost } OD_{\text{nulti dan}}} \right)$$

Međutim, ukoliko je (srednja vrijednost  $OD_{\text{test}}$  – srednja vrijednost  $OD_{\text{nulti dan}}$ )  $< 0$  tada izračunavamo na sljedeći način:

$$PG = 100 \times \left( \frac{\text{srednja vrijednost } OD_{\text{test}} - \text{srednja vrijednost } OD_{\text{nulti dan}}}{OD_{\text{nulti dan}}} \right)$$

Nakon izračuna izrađuje se krivulja ovisnosti preživljenja stanica o koncentraciji ispitivanih spojeva. Interpolacijom na apscisi izračunava se  $IC_{50}$  (koncentracija spoja koja inhibira rast 50% stanica) vrijednost za svaki derivat. Svaka koncentracija testiranih derivata je ispitana u tetraplikatu u četiri uzastopna biološka pokusa.



**Slika 6.** Strukturni prikaz redukcije MTT u formazan (33).

### 3.4. ANALIZA EKSPRESIJE PROTEINA U STANICAMA

Metodom Western blot provedena je analiza ekspresije proteina u stanicama, koja se temelji na prijenosu proteina sa poliakrilamidnog gela (služi za razdvajanje proteina u smjesi) na membranu, te njihovoj detekciji na površini membrane vezanjem na specifično antitijelo. Prvo se provede gel elektroforeza, koja služi za razdvajanje proteina iz smjese na temelju njihove molekulske mase. Potom se vrši prijenos proteina na membranu (nitroceluloznu ili PDVF). Nakon prijenosa proteina na membranu, proteini se blokiraju u cilju sprječavanja nespecifičnog vezanja antitijela. Nakon čega započinje inkubacija primarnim antitijelom (primarno antitijelo specifično prepoznaje samo ciljni protein), a zatim inkubacija sekundarnim antitijelom koje prepoznaje i veže se za primarno antitijelo. Sekundarno antitijelo je obilježeno enzimom koji razgrađuje specifični supstrat, čime se oslobađa signal, omogućujući vizualizaciju ciljnog proteina na membrani. Stanice HepG2 i HeLa nasađene su na pločice sa 6 jažica (FALCON®, SAD) u koncentraciji od  $1,5 \times 10^5$  stanica po jažici. Tretiranje spojevima 8 i 11 u koncentraciji  $2 \times IC_{50}$  je izvršeno 24 sata nakon nasađivanja. Tretman je trajao 48h i 72h, nakon čega je izvršena liza stanica koristeći RIPA pufer (engl. RadioImmunoPrecipitation Assay; 50 mM Tris HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% natrijev deoksikolat, 0.1% SDS, te koktel inhibitora proteaza i nukleaza; Roche, Švicarska). Nakon lize, lizati su centrifugirani 20 minuta na 14000 rpm i 4°C te je supernatant alikvotiran po 100  $\mu$ L i pohranjen na -20°C. Kvantifikacija proteina provedena je na prethodno

kalibriranom uređaju za fluorimetrijsku kvantifikaciju (Qubit, Invitrogen, SAD) kako bi se odredila količina uzorka koja sadrži potrebnih 50 µg proteina za analizu. Nakon kvantifikacije, slijedi taloženje uzoraka koje se vrši pomoću acetona, gdje se koristi 4 puta veća količina acetona od količine uzorka, te se uzorci drže na -20°C preko noći. Idući dan, istaloženim uzorcima je uklonjen aceton i otapaju se u 25 µL pufera za uzorke (0,5 M Tris, pH 6,8; 10% SDS; glicerol, 2M DTT i bromfenol plavo). Sabijanje 50 µg proteina provodilo se na 4% SDS poliakrilamidnom gelu, a razdvajanje na temelju njihove molekulske mase na 10% SDS-poliakrilamidnom gelu. Elektroforeza je provedena u Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD, SAD) pri konstantnom naponu od 200 V što je bilo vremenski ovisno o postotku gela, uzorcima i u konačnici željenom rezultatu. Za prijenos proteina su korištene PVDF (engl. *polyvinylidene fluoride*), BIO-RAD) membrane koje su prethodno aktivirane u metanolu (Prolabo, VWR, SAD). Transfer proteina s gela na membranu je trajao sat vremena pri 350 mA, nakon čega je membrana obojena u Amido-BlueBlack boji te odmah potom prebačena u otopinu za odbojavanje. Nakon odbojavanja, vršilo se ispiranje u TBST (engl. Tris Buffered Saline with Tween® 20, pH 7,5). Nakon ispiranja, ovisno o tome jesu li analizirani proteini fosforilirane forme ili ne, slijedilo je blokiranje u 4% BSA, frakcija V (engl. Bovine Serum Albumin, Sigma) ili 4%-tnom bezmasnom mlijeku u prahu (BIO-RAD, SAD) u trajanju od sat vremena. Korak nakon blokiranja je priprema otopina primarnih antitijela u 3% otopini mlijeka u prahu ili BSA u TBST, u kojoj se membrane inkubiraju preko noći na + 4°C. Korištena primarna protutijela bila su hydroxy-HIF-1α (1:1000, zečje monoklonalno antitijelo, Cell Signalling Technology, Danvers, SAD) i phospho MEK1/2 (1:1000, zečje monoklonalno protutijelo, Cell Signalling Technology). Nakon inkubacije slijedi ispiranje u TBST, nakon čega su membrane inkubirane u otopini sa sekundarnim protutijelima (1%-tna otopina BSA u TBST) usmjerena protiv zečjih IgG (1:2000, HRP-vezana protutijela, Cell Signalling Technology) sat vremena na sobnoj temperaturi. Uređaj ImageQuant LAS500 (GE Healthcare, USA) služio je za vizualizaciju dobivenih rezultata uz pomoć Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche, Švicarska). Intenzitet loading kontrole je služio za normalizaciju

intenziteta signala određenih vrpca koji su uspoređeni u QuantityOne softveru (Bio-Rad, SAD).

## **4. REZULTATI**

### **4.1. ANALIZA ANTIPROLIFERATIVNOG UČINKA U UVJETIMA *IN VITRO***

Prirodni spojevi mogu se koristiti kao lijekovi ili kao osnovne strukture za razvoj i dizajn novih molekula, te su važni u procesu otkrivanju i razvoja novih lijekova. Fenantreni su prema literaturnim podacima pokazali raznoliku biološku aktivnost, kao što je to antiproliferativna, antimikrobna, antiinflamatorna, antioksidativna, antialergijska, spazmolitička i anksiolitička (20–23). Iz tog razloga smo u ovom diplomskom radu testirali 23 derivata, akrilonitrili 6-11, fenantreni 12-15, 18-20 i 30 i derivati nafto[2,1-b]tiofena koji su označeni šiframa 16-17, 21-23 i 31-34 uz pomoć metode MTT čiji je postupak opisan u odjeljku 3.3. Radi se o analizi antiproliferativne aktivnosti čiji je rezultat krivulja rasta stanica iz koje se matematičkom aproksimacijom izračunavaju vrijednosti spojeva koje inhibiraju rast stanica za 50% (IC<sub>50</sub> vrijednosti). Rezultati MTT-testa su prikazani u tablici 2 iz čega se može zaključiti da većina testiranih derivata pokazuje umjerenu aktivnost u mikromolarnom rasponu testiranih koncentracija te da neki od testiranih spojeva djeluju selektivno na rast tumorskih stanica.

**Tablica 2.** *In vitro* antiproliferativna aktivnost prikazana kao IC<sub>50</sub> vrijednost (μM) za testirane derivate fenantrena.

| Spoj      | IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM) |         |       |       |       |       |
|-----------|------------------------------------|---------|-------|-------|-------|-------|
|           | A549                               | CFPAC-1 | HeLa  | HepG2 | SW620 | HFF-1 |
| <b>6</b>  | 45.76                              | 46.92   | 3.44  | 7.73  | 38.45 | 52,70 |
| <b>7</b>  | 64.60                              | 88.19   | 48.88 | 81.51 | >100  | 93,73 |
| <b>8</b>  | 8.39                               | 6.70    | 0.33  | 0.52  | 9.18  | 6,07  |
| <b>9</b>  | 40.84                              | 34.24   | 3.59  | 5.22  | 36.41 | 86,89 |
| <b>10</b> | 58.95                              | 97.84   | 19.99 | 43.43 | >100  | 84,33 |
| <b>11</b> | 47.70                              | 52.35   | 0.21  | 0.30  | 61.39 | >100  |
| <b>12</b> | 9.57                               | 13.22   | 8.31  | 18.33 | 7.80  | 3,43  |
| <b>13</b> | 49.91                              | 50.98   | 11.63 | 32.11 | 42.42 | 16,35 |
| <b>14</b> | 72.37                              | 80.05   | 30.31 | 48.75 | >100  | >100  |
| <b>15</b> | 3.30                               | 8.20    | 0.65  | 10.85 | 6.80  | 1,78  |
| <b>16</b> | 50.43                              | 55.65   | 29.93 | 54.28 | 70.31 | 84,61 |
| <b>17</b> | 5.53                               | 8.19    | 0.45  | 7.22  | 6.04  | 5,13  |
| <b>18</b> | 31.10                              | 35.46   | 23.63 | 33.56 | 43.36 | 52,91 |
| <b>19</b> | 58.91                              | >100    | 59.37 | 81.78 | >100  | >100  |
| <b>20</b> | 5.49                               | 6.19    | 3.33  | 19.44 | 4.62  | 23,82 |
| <b>21</b> | 31.01                              | 18.57   | 18.56 | 47.63 | 41.46 | 98,42 |
| <b>22</b> | 61.30                              | 25.72   | 32.22 | 62.01 | 64.14 | 62,01 |
| <b>23</b> | 7.09                               | 3.66    | 2.38  | 20.91 | 2.58  | 37,46 |
| <b>30</b> | 64.23                              | 68.58   | 28.42 | 93.35 | 61.32 | >100  |
| <b>31</b> | 63.90                              | 97.52   | 39.59 | 75.40 | >100  | 96,82 |
| <b>32</b> | 20.23                              | 17.46   | 14.38 | 23.19 | 17.67 | 23,97 |
| <b>33</b> | 27.74                              | >100    | 10.76 | 86.08 | 0.90  | 0,74  |
| <b>34</b> | 5.57                               | 6.59    | 4.21  | 16.23 | 4.40  | 5,83  |

Tako je primjerice, spoj 6, koji je fluoro supstituirani akrilonitril pokazao selektivnu aktivnost na rast staničnih linija HeLa i HepG2. Isti spoj slabije

je djelovao na rast stanica A549, CFPAC-1, SW620 i HFF-1. Nadalje, spoj 9 koji je također fluoro supstituirani akrilonitril selektivno je djelovao na stanice HeLa i HepG2. Najjači učinak na rast stanica su pak pokazali generalno dicijano supstituirani akrilonitrili 8 i 11 te njihovi ciklički analozi 15 i 17. Spojevi 8 i 11 su k tome još pokazali i dodatnu selektivnost na stanice HeLa i HepG2. Spoj 8 je međutim i snažno citotoksično djelovao na stanice fibroblasta za razliku od spoja 11. Njihovi ciklički analozi, dicijano supstituirani derivati fenantrena 15 i nafto[2,1-b]tiofena 17, pokazali su selektivnu aktivnost na HeLa staničnoj liniji. Spoj 34, nafto[2,1-b]tiofen supstituiran sa di-N,N-dimetilaminopropilom, jedan od amido supstituiranih derivata, pokazao je najizraženiju antiproliferativnu aktivnost. Derivat 12 je pokazao umjereno antiproliferativno djelovanje na staničnim linijama A549, HeLa, SW620 i HFF-1. Spoj 20, koji se sastoji od fenantrenskog kostura i piperazinske skupine, je pokazao umjereno proliferativno djelovanje na A549, CFPAC-1, HeLa i SW620 stanicama. Jako sličnu antiproliferativnu aktivnost je imao nafto[2,1-b]tiofen 23 koji je također supstituiran sa piperazinskom skupinom. Spojevi 7, 10, 13, 14, 16, 18, 19, 21, 22, 30 i 31 nisu pokazali značajnu antiproliferativnu aktivnost ni na jednoj od ispitivanih staničnih linija, od kojih je derivat 19 pokazao najslabije antiproliferativno djelovanje.

## **4.2. ANALIZA MEHANIZAMA DJELOVANJA FENANTRENSKIH DERIVATA**

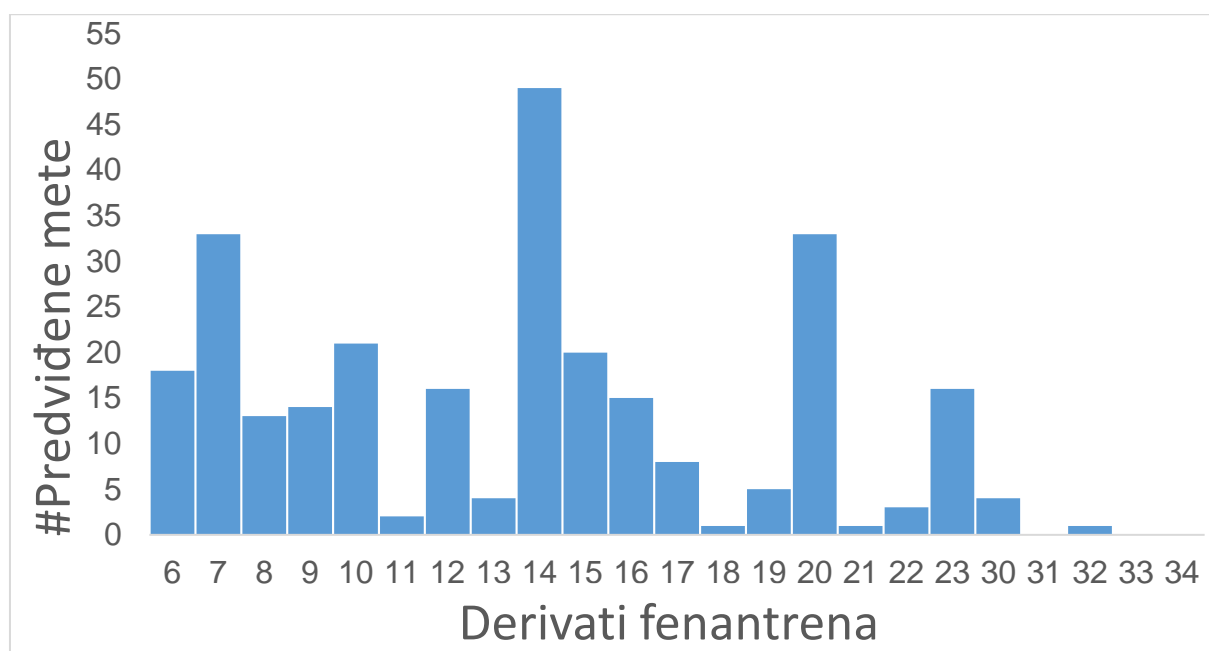
### **4.2.1. ANALIZA MEHANIZAMA DJELOVANJA FENANTRENSKIH DERIVATA *IN SILICO***

Kako bi se odredile potencijalne biološke mete derivata fenantrena, korišten je PIDGIN algoritam za predviđanje meta. PIDGIN analiza je napravljena uz pomoć bioinformatičkih platformi u suradnji s kolegama sa Computer Science Department, University College London pod voditeljstvom prof. Nataše Pržulj. Ovi su rezultati u sklopu ovog diplomskog rada kratko prepričani radi boljeg razumijevanja diskusije i *in vitro* rezultata



koji su provedeni kao diplomsko istraživanje temeljem objavljenog rada (31).

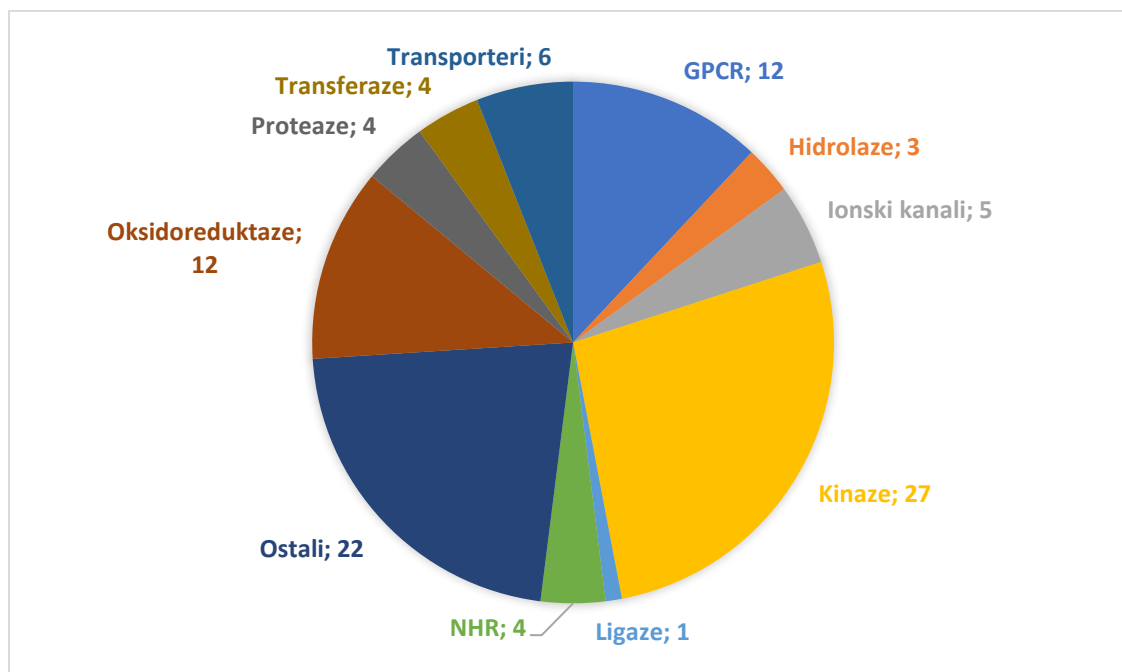
Svi derivati fenantrena analizirani su s obzirom na afinitet vezanja na istražene 1651 potencijalne mete što je rezultiralo s ukupno 37973 interakcije. Prag sigurnosti analize postavljen je bio na 90% sigurnosti čime je predviđeno 277 interakcija za 23 derivata fenantrena i 112 jedinstvenih meta. Pronađeno je da su testirani derivati aktivni na oko pola poznatih meta originalnog fenantrena. Derivat fenantrena 14 ima najveći broj predviđenih meta (49 meta), kao što je i prikazano u slici 7. Odmah iza derivata 14 dolaze derivati 20 i 7 sa 33 mete. Suprotno od njih, tri derivata (31, 33 i 34) nisu pokazala nikakvu aktivnost prema predviđenim metama.



**Slika 7.** Stupičasti dijagram pokazuje broj meta (y-os) koja je predviđena za svaki derivat (x-os), primjenjujući određeni prag ( $P_a > 0.9$ ). Adaptirano prema (31).

Da bi se analizirao način djelovanja derivata fenantrena na razne grupe meta, morala se identificirati klasa proteina ciljanih meta. Najveći udio predviđenih meta spada u klasu protein kinaza (27%), kao što je prikazano na slici 8. Između predviđenih meta protein kinaza identificirani su NUA1 (NUAK family SNF1-like kinase 1, Uniprot ID: 0060285) i MAP2K1 (Dual specificity mitogen-activated protein kinase 1, Uniprot ID:

Q02750), koji djeluju na najveći udio derivata fenantrena (39.13% i 26.08%). Značajni su i proteini oksidoreduktaze i GPCR (engl. G protein-coupled receptor) sa 12% podudaranja. Najmanje predviđenih meta spada u klasu ligaza (1%).



**Slika 8.** Postotna raspodjela klasa meta za 112 jedinstvenih predviđenih meta derivata fenantrena (adaptirano prema 31).

Korišten je za *in silico* analizu i ClueGO alat koji izvlači reprezentativne funkcionalne informacije za listu gena/proteina bazirane na najnovijim javno dostupnim podacima. ClueGO je korišten za Gensku ontologiju (GO), Biološke procese (BP), Molekularne funkcije (MF) i Stanične Komponente (CC- engl. Cellular Component). Za biološke procese pronađeno je kako je veliki broj meta povezan sa negativnom regulacijom bioloških procesa, praćeno zatim staničnim metaboličkim procesom aromatskih spojeva. Značajan broj meta je povezan sa signalnim putem serotoninskog receptora. Što se tiče molekularnih funkcija, mete derivata fenantrena su pokazale značajne aktivnosti kod serotoninskog receptora, HIF-1 signalnog puta vezanja DNA kao i dimerizacije proteina (Tablica 3) (31).

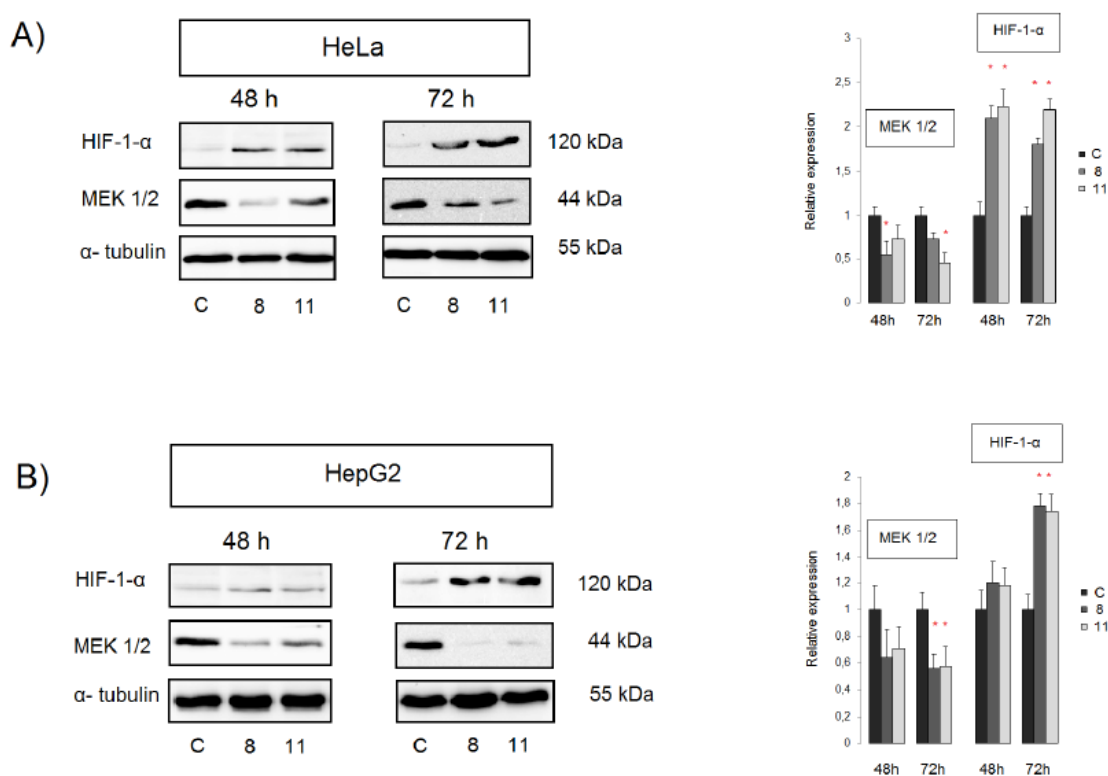
**Tablica 3.** Analiza prisutnosti predviđenih meta derivata fenantrena u staničnim signalnim putovima i procesima (adaptirano iz (31)).

| <b>Signalni put ili proces</b> | <b>Broj meta</b> | <b>% meta</b> | <b>P-vrijednost</b> | <b>Bonferroni (ispravljena P-vrijednost)</b> |
|--------------------------------|------------------|---------------|---------------------|--|
| Serotoninska sinapsa           | 15               | 13.39         | 6.59E-05            | 0.0118                                       |
| Akutna mijeloidna leukemija    | 8                | 7.14          | 8.57E-03            | 0.787  |
| cAMP signalni put              | 15               | 13.39         | 1.73E-02            | 0.957  |
| Ovisnost o kokainu             | 6                | 5.35          | 2.30E-02            | 0.984  |
| HIF-1 signalni put             | 9                | 8.03          | 3.75E-02            | 0.998  |
| Prionske bolesti               | 4                | 3.57          | 4.23E-02            | 0.999  |
| Kronična mijeloidna leukemija  | 7                | 6.25          | 4.84E-02            | 0.999  |

#### 4.2.2. ANALIZA MEHANIZAMA DJELOVANJA FENANTRENSKIH DERIVATA *IN VITRO*

Na temelju rezultata MTT testa mogu se izdvojiti neki derivati sa značajnim antiproliferativnim djelovanjem. Uzimanjem u obzir i *in silico* rezultata odabrane su neke potencijalne mete djelovanja derivata fenantrena. Naime, važno je potencijalni mehanizam djelovanja i metu djelovanja potvrditi i na razini stanice za što je u ovom radu korištena metoda Western blot za analizu relativne ekspresije odabranih meta - proteina HIF-1 $\alpha$  i MEK 1/2. Stanične linije na kojima se vršilo testiranje su bile HeLa i HepG2 iz razloga jer su spojevi 8 i 11 pokazali najjaču antiproliferativnu aktivnost i veliku selektivnost prema tim staničnim linijama u MTT-testu. Stanice su tretirane spojevima 8 i 11 nakon 24 sata, te je tretman trajao 48 i 72 sata. Western blot analiza relativne ekspresije proteina HIF-1- $\alpha$  pokazala je značajno povećanu razinu pri  $p < 0.05$

hidroksiliranog proteina HIF-1- $\alpha$  nakon tretmana HeLa stanica sa spojevima 8 i 11 nakon 48 i 72 sata (slika 9A). Također, sličan trend relativne ekspresije proteina HIF-1- $\alpha$  je opažen u HepG2 stanicama tretiranim sa spojevima 8 i 11 ali samo nakon 72 sata (slika 9B). Zatim, značajno smanjenje relativne ekspresije aktivnog MEK1/2 je opaženo u HeLa stanicama tretiranim spojem 8 nakon 48 sati i nakon 72 sata sa spojem 11 (slika 9A), dok je u HepG2 stanicama zabilježeno značajno smanjenje ekspresije MEK1/2 tek nakon 72 sata sa oba spoja (slika 9B).



**Slika 9.** Western blot rezultati i prikaz relativne ekspresije (A) HIF-1- $\alpha$  i (B) MEK1/2 u HeLa i HepG2 stanicama tretiranim sa spojevima 8 i 11 na 48 i 72 sata. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti relativne ekspresije + SEM kemiluminescentnih signala dobivenih iz triplikata. Statistički značajne promjene (Students t-test,  $p < 0.05$ ) su označene zvjezdicom. Adaptirano prema (31).

## 5. RASPRAVA

Razvoj lijeka od trenutka otkrića do komercijalnog proizvoda je kompleksan proces koji uključuje veliki broj različitih disciplina, iako se slijedi standardizirani redosljed faza u istraživanju i razvoju koji počinje s otkrićem, a slijedi razvoj. Cilj otkrića je pronalazak i potvrda kliničkog kandidata, odnosno potencijalnog budućeg aktivnog spoja lijeka (34). Prirodni spojevi su tijekom povijesti korišteni kao početne strukture za razvoj lijekova (1). Fenantreni su također takva klasa spojeva iz grupe aromatskih metabolita koji su prisutni u velikom broju biljaka, te pokazuju veliki broj bioloških aktivnosti uključujući i antiproliferativnu što je zanimljivo u protu-tumorskoj terapiji (20). Prilikom izrade ovog diplomskog rada, cilj je bio ispitati učinkovitost derivata fenantrena na tumorske stanične linije, te odrediti koji su proteini uključeni u antiproliferativno djelovanje tih derivata. Derivati su se stoga testirali na pet staničnih linija tumora: A549 stanice adenokarcinoma bazalnog epitela alveola, CFPAC-1 stanice dukalnog adenokarcinoma gušterače, HeLa stanice karcinoma grlića maternice, HepG2 stanice hepatocelularnog karcinoma jetre, SW620 stanice adenokarcinoma debelog crijeva i na jednoj ne transformiranoj staničnoj liniji fibroblasta HFF-1. MTT testiranje (tablica 2.) je pokazalo da je najjača antiproliferativna aktivnost prisutna za dicijano supstituirane akrilonitrile 8 i 11 i njihove cikličke analoge 15 i 17. Također, dobiveni rezultati otkrivaju da tiofenska jezgra u strukturi acikličkih 11 i cikličkih 17 derivata pojačava antiproliferativni učinak u usporedbi sa fenilnim analogima 8 i 15, što je i potvrđeno u literaturi (35). Uvođenje piperazinske skupine na fenantrenski kostur (20) je vjerojatno potaknulo pojačanje antiproliferativnog djelovanja u odnosu na druge amino supstituirane nafto[2,1-b]tiofene 21-23. Za potrebe korištenja rezultata ovog diplomskog rada u objavljivanju znanstvene publikacije u suradnji s kolegama sa Computer Science Department, University College London pod voditeljstvom prof. Nataše Pržulj napravljena je i *in silico* analiza potencijalnih meta djelovanja testiranih fenantrena. Otkriveno je kako

najveći udio predviđenih meta spada u klasu protein kinaza (27%). Protein kinaze igraju predominantnu regulatornu ulogu u skoro svakom aspektu stanične biologije i imaju sposobnost da mijenjaju funkciju proteina tako da ih aktiviraju ili inhibiraju (36). Protein kinaze danas predstavljaju važnu metu djelovanja mnogih komercijalnih protutumorskih lijekova(37). Nadalje, *in silico* analiza je pokazala kako su osim kinaza važne potencijalne mete testiranih spojeva i neki proteini uključeni u važne signalne procese pa tako i metabolički put reguliran s HIF-1 $\alpha$ . Stoga su odabrani proteini HIF-1 $\alpha$  i MEK 1/2 za validaciju na razini proteinske ekspresije u staničnim linijama HeLa i HepG2, koje su se pokazale kao najosjetljivije stanične linije na derivate fenantrena 8 i 11, kao što je prikazano u tablici 2. Western blot analiza relativne ekspresije proteina HIF-1 $\alpha$  pokazala je povećanje razina hidroksiliranog proteina nakon tretmana HeLa stanica sa spojevima 8 i 11 nakon 48 i 72 sata (slika 9A). Također, slični rezultati relativne ekspresije proteina HIF-1 $\alpha$  su opaženi u HepG2 stanicama tretiranima sa spojevima 8 i 11 samo nakon 72 sata (slika 9B). S obzirom da se pokus proveo s antitijelom koje se veže na ubikvitiniranu formu HIF-1 $\alpha$  koja odlazi u proteasom te se tamo proteolitički razgrađuje, dobiveni rezultat ukazuje na vjerojatnu pojačanu proteosomalnu degradaciju HIF-1 $\alpha$  podjedinice HIF-1 proteinskog kompleksa. Naime hidroksilacija HIF-1 $\alpha$  na prolinu 564, formi koju veže korišteno antitijelo, pojačava njegovu proteosomalnu degradaciju posredovanu ubikvitinom (38). Inače je HIF-1 $\alpha$  prekomjerno eksprimiran u mnogim tumorima, gdje je regulator promjene metaboličkog statusa stanica u korist anaerobne glikolize. Također ovaj protein potiče i angiogenezu na način da se posljedično aktiviraju faktora rasta poput VEGF (28). Stoga je ovaj rezultat moguće interpretirati na način da je antiproliferativno djelovanje povezano djelomično sa degradacijom HIF-1 $\alpha$ , odnosno smanjenjem njegove razine u tumorskim stanicama. Uz promjenu metaboličkog statusa stanica i poticanje angiogeneze, HIF također regulira druge gene koji sudjeluju u smanjenju efikasnosti protutumorske terapije, kao što je radijacija, kemoterapija i imunoterapija (39,40). Brojni HIF inhibitori su otkriveni i sintetizirani, te su neki i klinički testirani, no dosad niti jedan lijek koji direktno inhibira HIF nije odobren za liječenje tumora

zbog sigurnosti ili ograničene terapijske učinkovitosti. Jedan od inhibitora, Chetomin, je inhibirao interakciju HIF-1 $\alpha$  sa p300 (transkripcijski koaktivator) što je dovelo do smanjenog rasta ksenografta u miševa(41). Važno je napomenuti da smanjenje jedne HIF  $\alpha$ -podjedinice uzrokuje povećanje druge putem recipročnog regulirajućeg mehanizma, što može značiti da je ključno ciljati HIF-1 i HIF-2 zajedno da bi se razvila efektivnija terapija tumora. Također u nekim pacijentima nije prisutna povećana ekspresija HIF-a u tumorima, pa kod njih terapija nije toliko učinkovita(40). Iz tog razloga treba poraditi na konceptu personalizirane medicine u dizajnu kliničkih ispitivanja za HIF inhibitore. Dobiveni rezultat iz rada je dobar kao početna točka za daljnja istraživanja ovih spojeva u protutumorskom liječenju.

Zatim se izmjerilo i smanjenje relativne ekspresije aktivnog MEK1/2 u HeLa stanicama tretiranim spojem 8 nakon 48 sati i nakon 72 sata sa spojem 11 (slika 9A), dok je u HepG2 stanicama opaženo značajno smanjenje ekspresije MEK1/2 tek nakon 72 sata sa oba spoja (slika 9B). Radi se o podatku koji se može diskutirati u kontekstu signalizacije Ras/Raf/MEK/ERK. MAPK signalni put važan je za širenje, preživljenje i razvijanje rezistencije u humanim tumorima što čini sve komponente tog signalnog puta potencijalnim metama za protutumorske lijekove. Proteinu MEK1 nizvodna meta je najčešće ERK. ERK nizvodno ima brojne mete, što čini terapijsko ciljanje proteina MEK1 relativno specifičnim. Također je pokazano da inhibicija MEK1 u BRAF mutiranim tumorima dovodi do potpune inhibicije tumora. Ta činjenica se može iskoristiti da se ovi derivati fenantrena koriste se eksperimentalno u tretmanu raka s BRAF mutacijom (25). Prekomjerno aktiviranje Raf, MEK i ERK u ERK signalizaciji dovodi do pojačane proliferacije u nekim tumorskim stanicama, primjerice stanicama adenokarcinoma hipofize (42,43). Ciljanjem ovih molekula, mogla bi se inhibirati proliferacija tumorskih stanica. Tako su primjerice, analozi somatostatina pokazali antitumorsko djelovanje inaktiviranjem ERK signalnog puta (44). Još je jedna studija pokazala kako okreotid i SOM230 (analozi somatostatina) smanjuju proliferaciju stanica inhibicijom ERK

signalizacije, u somatotropnoj staničnoj liniji štakora GH3 (45). Nadalje, Raf kinaza-inhibirajući protein (RKIP) cilja MAPK signalizaciju tako što inhibira Ras/Raf/MEK/ERK signalni put. Studije su pokazale da je smanjena ekspresija RKIP u adenomu hipofize koji luči hormon rasta, povezana s slabijim djelovanjem analoga somatostatina što ukazuje na važnost inhibicije Ras/Raf/MEK/ERK signalnog puta u liječenju adenoma hipofize (46). Rezultati dobiveni u ovom radu, što je u skladu s literaturom, ukazuju na to da je smanjenje ekspresije aktivnog MEK1/2 važno u strategiji inhibiranja proliferacije tumorskih stanica, što je pokazano i na tetsiranim staničnim linijama u ovom radu.



## 6. ZAKLJUČAK

Prirodni spojevi su dobra početna osnova za sintezu novih derivata odnosno budućih potencijalnih pro-lijekova. Fenantreni su klasa prirodnih, aromatskih metabolita pronađenih u brojnim biljkama, a koji imaju veliki broj bioloških aktivnosti (20). U ovom radu se stoga temeljem probira biološke aktivnosti novih derivata fenantrena može zaključiti sljedeće:

1. Najjača antiproliferativna aktivnost utvrđena je za dicijano supstituirane akrilonitrile 8 i 11 i njihove cikličke analoge 15 i 17.
2. Dicijano supstituirani akrilonitrili 8 i 11 su pokazali najjači inhibirajući učinak i selektivnost prema HeLa i HepG2 staničnim linijama u submikromolarnom rasponu testiranih koncentracija.
3. Analiza predviđanja meta metodama *in silico* je pokazala kako su protein kinaze i signalni putevi, poput signalnog puta moduliranog proteinom HIF-1 $\alpha$ , najveća grupa potencijalnih meta za testirane derivate.
4. Proteini HIF-1 $\alpha$  i MEK 1/2 uspješno su validirani metodom Western blot u stanicama HeLa i HepG2 tretiranim derivatima 8 i 11. razina ubikvitinirane forme HIF-1 $\alpha$  statistički se povećala u stanicama HeLa tretiranim derivatima 8 i 11 nakon 48 i 72 sata tretmana te stanicama HepG2 nakon 72 sata tretmana. Protein MEK 1/2 imao je značajno smanjenu ekspresiju u HeLa stanicama nakon 48 i 72 sati tretmana spojem 8. Tretman spojem 11 je u HepG2 stanicama inducirao značajno smanjenje ekspresije proteina MEK 1/2 nakon 72 sata tretmana.

Ovaj diplomski rad pokazuje potencijal testiranih derivata fenantrena 8 i 11 kao potencijalnih kandidata za daljnju optimizaciju u procesu razvoja lijekova.

## 7. LITERATURA

1. Mintas M, Raić-Malić S. Medicinska kemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
2. Kraljević Pavelić S, Marjanović M, Poznić M, Kralj M. Adenovirally mediated p53 overexpression diversely influence the cell cycle of HEp-2 and CAL 27 cell lines upon cisplatin and methotrexate treatment. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009 Dec;135(12):1747–61.
3. Lipstick J. A History of Cancer Research: Tumor Suppressor Genes. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2020 Feb;
4. Lim JKM, Leprivier G. The impact of oncogenic RAS on redox balance and implications for cancer development. *Cell Death & Disease*. 2019 Dec;10(12):955.
5. Xie H, Simon MC. Oxygen availability and metabolic reprogramming in cancer. *J Biol Chem*. 2017 Oct 13;292(41).
6. Mintas M. Medicinska kemija protutumorskih lijekova. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
7. Mohs RC, Greig NH. Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. 2017 Nov;3(4):651–7.
8. Yildirim O, Gottwald M, Schüler P, Michel MC. Opportunities and Challenges for Drug Development: Public–Private Partnerships, Adaptive Designs and Big Data. *Front Pharmacol*. 2016 Dec 6;7.
9. Lage O, Ramos M, Calisto R, Almeida E, Vasconcelos V, Vicente F. Current Screening Methodologies in Drug Discovery for Selected Human Diseases. *Marine Drugs*. 2018 Aug 14;16(8):279.
10. Wan H, Williams R, Doherty P, Williams DF. A study of the reproducibility of the MTT test. *J Mater Sci: Mater Med*. 1994 Mar;5(3):154–9.
11. Bleicher KH, Böhm H-J, Müller K, Alanine AI. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 May;2(5):369–78.
12. Colquitt RB, Colquhoun DA, Thiele RH. In silico modelling of physiologic systems. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 2011 Dec;25(4):499–510.
13. Chung TDY, Terry DB, Smith LH. In Vitro and In Vivo Assessment of ADME and PK Properties During Lead Selection and Lead Optimization – Guidelines, Benchmarks and Rules of Thumb. *In Vitro*. :14.

14. Hughes J, Rees S, Kalindjian S, Philpott K. Principles of early drug discovery: Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*. 2011 Mar;162(6):1239–49.
15. NMR approaches in structure-based lead discovery: Recent developments and new frontiers for targeting multi-protein complexes | Elsevier Enhanced Reader.
16. Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein LV, Venditti JM, Schepartz S, et al. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br J Cancer*. 2001 May 15;84(10):1424–31.
17. MagHelix™ Drug Discovery - Creative Biostructure.
18. Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Frontiers in Pharmacology*. 2018 Nov 13;9:1300.
19. Corrie PG. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*. 2011 Dec;39(12):717–22.
20. Kovács A, Vasas A, Hohmann J. Natural phenanthrenes and their biological activity. *Phytochemistry*. 2008 Mar;69(5):1084–110.
21. Tóth B, Hohmann J, Vasas A. Phenanthrenes: A Promising Group of Plant Secondary Metabolites. *J Nat Prod*. 2018 Mar 23;81(3):661–78.
22. Lee Y, Park J, Beak N, Kim S, Ahn B. *In Vitro* and *In Vivo* Antitumoral Phenanthrenes from the Aerial Parts of *Dendrobium nobile*. *Planta Med*. 1995 Apr;61(02):178–80.
23. Lin Y, Wang F, Yang L, Chun Z, Bao J, Zhang G. Anti-inflammatory phenanthrene derivatives from stems of *Dendrobium denneanum*. *Phytochemistry*. 2013 Nov;95:242–51.
24. Lee C-L, Lin Y-T, Chang F-R, Chen G-Y, Backlund A, Yang J-C, et al. Synthesis and Biological Evaluation of Phenanthrenes as Cytotoxic Agents with Pharmacophore Modeling and ChemGPS-NP Prediction as Topo II Inhibitors. *Afarinkia K*, editor. *PLoS ONE*. 2012 May 29;7(5):e37897.
25. Wang D, Boerner SA, Winkler JD, LoRusso PM. Clinical experience of MEK inhibitors in cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2007 Aug;1773(8):1248–55.
26. Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death & Disease*. 2016 Jun;7(6):e2253–e2253.

27. Papa S, Choy PM, Bubici C. The ERK and JNK pathways in the regulation of metabolic reprogramming. *Oncogene*. 2019 Mar;38(13).
28. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 $\alpha$ . *Cell Death Differ*. 2008 Apr;15(4):621–7.
29. Wu D, Potluri N, Lu J, Kim Y, Rastinejad F. Structural integration in hypoxia-inducible factors. *Nature*. 2015 Aug;524(7565):303–8.
30. Greijer AE. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of Clinical Pathology*. 2004 Oct 1;57(10):1009–14.
31. Perin N, Rep V, Sović I, Juričić Š, Selgrad D, Klobučar M, et al. Antiproliferative activity and mode of action analysis of novel amino and amido substituted phenantrene and naphtho[2,1-b]thiophene derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020 Jan;185:111833.
32. Gazivoda T, Plevnik M, Plavec J, Kraljević S, Kralj M, Pavelić K, et al. The novel pyrimidine and purine derivatives of l-ascorbic acid: synthesis, one- and two-dimensional <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR study, cytostatic and antiviral evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2005 Jan;13(1).
33. Gamble AJ, Lynam JM, Walton PH. SYNTHESIS AND ANTICANCER ACTIVITY OF RUTHENIUM ( II) CIS-CIS- 1,3,5-TRIAMINOCYCLOHEXANE COMPLEXES. 2013.
34. Kraljević Pavelić S, Markova-Car E, Klobučar M, Sappe L, Spaventi R. Technological Advances in Preclinical Drug Evaluation: the Role of – Omics Methods. 2019 Jul 26;
35. Racané L, Tralić-Kulenović V, Kraljević Pavelić S, Ratkaj I, Peixoto P, Nhili R, et al. Novel Diamidino-Substituted Derivatives of Phenyl Benzothiazolyl and Dibenzothiazolyl Furans and Thiophenes: Synthesis, Antiproliferative and DNA Binding Properties. *J Med Chem*. 2010 Mar 25;53(6):2418–32.
36. Roskoski R. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*. 2015 Oct;100:1–23.
37. Bhullar KS, Lagarón NO, McGowan EM, Parmar I, Jha A, Hubbard BP, et al. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Mol Cancer*. 2018 Dec;17(1):48.
38. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation. :10.

39. Samanta D, Gilkes DM, Chaturvedi P, Xiang L, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014 Dec 16;111(50):E5429–38.
40. Yu T, Tang B, Sun X. Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy. *Yonsei Med J*. 2017;58(3):489.
41. Kung AL, Zabludoff SD, France DS, Freedman SJ, Tanner EA, Vieira A, et al. Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. *Cancer Cell*. 2004 Jul;6(1).
42. M. Pombo C, Zalvide J, D. Gaylinn B, Dieguez C. Growth Hormone-Releasing Hormone Stimulates Mitogen-Activated Protein Kinase. *Endocrinology*. 2000 Jun;141(6).
43. Dworakowska D, Wlodek E, Leontiou CA, Igreja S, Cakir M, Teng M, et al. Activation of RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways in pituitary adenomas and their effects on downstream effectors. 2009;10.
44. Lu M, Wang Y, Zhan X. The MAPK Pathway-Based Drug Therapeutic Targets in Pituitary Adenomas. *Frontiers in Endocrinology*. 2019 May 22;10:330.
45. Hubina E, Nanzer AM, Hanson MR, Ciccarelli E, Losa M, Gaia D, et al. Somatostatin analogues stimulate p27 expression and inhibit the MAP kinase pathway in pituitary tumours. *European Journal of Endocrinology*. 2006 Aug;155(2).
46. Lyngvi Fougner S, Bollerslev J, Latif F, K. Hald J, Lund T. Low Levels of Raf Kinase Inhibitory Protein in Growth Hormone-Secreting Pituitary Adenomas Correlate with Poor Response to Octreotide Treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008 Apr;93(4).

## 8. ŽIVOTOPIS

### 9. OSOBNE INFORMACIJE

Selgrad Danijel



Vatrogasna 5, 44250 Petrinja (Hrvatska)



(+385) 996871642



d.selgrad.zus@gmail.com

### OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

---

- 01/10/2017–danas    Diplomski studij Biotehnologija u medicini, Diplomski rad na temu: In vitro probir novih derivata fenantrena na tumorskim staničnim linijama, Mentor: Sandra Kraljević Pavelić  
Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)
- 01/10/2014–  
15/07/2017    Prvostupnik Biotehnologije i istraživanja lijekova  
Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)
- 01/09/2009–  
15/06/2013    Srednja stručna sprema za farmaceutskog tehničara  
Srednja škola Viktorovac, Sisak (Hrvatska)

### RADNO ISKUSTVO

---

- 01/07/2018–danas    Rad u laboratoriju u sklopu diplomskog rada  
Sveučilište u Rijeci, Laboratorij za sistemsku biomedicinu i genomiku, Rijeka (Hrvatska)
- uzgoj staničnih linija
  - tretiranje staničnih linija sa kemijskim spojevima
  - MTT testovi

- Western blot
- Svjetlosna i fluorescentna mikroskopija

01/08/2013–  
01/08/2014      **Stručno usavršavanje za farmaceutskog tehničara**  
Ljekarne Crnković, Petrinja (Hrvatska)

- zaprimanje i skladištenje lijekova
- izrada galenskih lijekova po recepturi
- prodaja dodataka prehrani i bezreceptnih lijekova

## OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik      hrvatski

Strani jezici

engleski

|          | RAZUMIJEVANJE |         | GOVOR               |                    | PISANJE |
|----------|---------------|---------|---------------------|--------------------|---------|
|          | Slušanje      | Čitanje | Govorna interakcija | Govorna produkcija |         |
| engleski | B2            | B2      | B2                  | B2                 | B2      |

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik

[Zajednički europski referentni okvir za jezike](#)

Komunikacijske vještine

- komunikacijske vještine stečene tokom rada u ljekarni, na natjecanjima iz StartUp-a
- timski rad u startup projektu izrade Probiotika za pčele
- komuniciranje sa stranim timovima na natjecanjima

Digitalne vještine

| SAMOPROCJENA        |                     |                    |                     |                     |
|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Obrada informacija  | Komunikacija        | Stvaranje sadržaja | Sigurnost           | Rješavanje problema |
| Samostalni korisnik | Samostalni korisnik | Temeljni korisnik  | Samostalni korisnik | Temeljni korisnik   |

[Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu](#)

- program Adobe Illustrator, Adobe Photoshop

**Ostale vještine** - Grafički dizajn, samostalno učenje  
-3D modeliranje, samostalno učenje

**Vozačka dozvola** AM, B

## DODATNE INFORMACIJE

---

2. mjesto u programu poduzetničkog inkubatora (Grad Rijeka) i osvojena nagrada 50.000 kn - ZUS BeeOtics (2019. godina)  
2. mjesto na nacionalnom natjecanju sveučilišnih startup-ova (2018. godina)  
"Smartup" studentsko start-up natjecanje, finale, Zagreb 2018,  
Algebra boot camp" start-up natjecanje, finale, Zagreb 2018.  
Državna stipendija 2015. i 2016. godina

**Konferencije** Prezentiranje na studentskoj konferenciji odjela za biotehnologiju: Budućnost i perspektiva studija

**Projekti** Svjetsko sveučilišno StartUp natjecanje (USWC) u Danskoj sa projektom ZUS Beeotics-probiotik za pčele.  
Nacionalno sveučilišno StartUp natjecanje u Rijeci sa projektom ZUS BeeOtics- probiotik za pčele, osvojeno 2. mjesto.  
BootCamp StartUp natjecanje u Zagrebu sa projektom ZUS BeeOtics- probiotik za pčele  
SMARTUP StartUp natjecanje u Zagrebu sa projektom ZUS BeeOtics-probiotik za pčele.