Određivanje promjene u ekspresiji gena CAIX i katalitičke aktivnosti ugljične anhidraze u stanicama izloženim derivatima N-9 sulfonilurea

Užanicky, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:518781

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Anja Užanicky

ODREĐIVANJE PROMJENE U EKSPRESIJI GENA *CA IX* I KATALITIČKE AKTIVNOSTI UGLJIČNE ANHIDRAZE U STANICAMA IZLOŽENIM DERIVATIMA *N*-9 SULFNILUREA

Diplomski rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Anja Užanicky

ODREĐIVANJE PROMJENE U EKSPRESIJI GENA *CA IX* I KATALITIČKE AKTIVNOSTI UGLJIČNE ANHIDRAZE U STANICAMA IZLOŽENIM DERIVATIMA *N*-9 SULFNILUREA

Diplomski rad

Osijek, 2017.

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

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

Rad ima 34 lista, 5 tablica i 5 slika.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Hipoksija tumora 2

1.2. Ugljična anhidraza IX 2

1.3. Uloga CA IX 3

1.4. Mehanizam regulacije CA IX u hipoksiji 4

1.5. Inhibitori CA IX u terapiji tumora 5

1.6. Liječenje tumora 6

1.6.1. Analozi nukleobaza kao antitumorski lijekovi 7

2. HIPOTEZA 9

3. CILJ ISTRAŽIVANJA 10

4. MATERIJALI I METODE 11

4.1. Materijali 11

4.1.1. Stanične linije 11

4.1.2. Laboratorijski pribor i oprema 11

4.1.3. Derivati N-9-sulfnilurea 11

4.1.4. Kemikalije 12

4.2. METODE 13

4.2.1. Uzgoj stanica in vitro 13

4.2.2. Određivanje aktivnosti enzima CAIX 14

4.2.3. Izolacija RNA 16

4.2.4. Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja 16

4.2.5. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR) 17

4.3. Statistička analiza rezultata 18

5. MATERIJALI I METODE 19

5.1. Promjene u katalitičkoj aktivnost enzima CA IX ELISA testom 19

5.2. Promjene u ekspresiji gena CA IX RT PCR reakcijom 21

6. RASPRAVA 26

7. ZAKLJUČAK 28

8. SAŽETAK 29

9. SUMMARY 30

10. LITERATURA 31
11. ŽIVOTOPIS 33

POPIS KRATICA

- CA (engl. *carbonic anhydrase*) ugljična anhidraza
- CA IX (engl. *carbonic anhydrase 9*) ugljična anhidraza 9
- CAI (engl. *carbonic anhydrase inhibitors*) inhibitori ugljične anhidraze
- MN (engl. *membrane antigen*) membranski antigen
- HIF-1 (engl. *hypoxia-inducible factor*) faktor transkripcije koji inducira hipoksiju
- PHD (engl. *prolyl-4-hydroxylase domain*) prolil-4-hidroksilaze ovisni o kisiku
- pVHL (engl. *von Hippel–Lindau tumor suppressor protein*) von Hippel-Lindauovom tumorskom supresorskom proteinu
- GLUT-1 (engl. *glucose transporter type 1*) transporter glukoze tip 1
- GLUT-3 (engl. *glucose transporter type 3*) transporter glukoze tip 3
- cDNA (engl. *complementary DNA*) komplementarna DNA
- DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) medij
- DMSO (engl. *dimethyl-sulfoxide*) dimetil-sulfoksid
- DNA (engl. *deoxyribonucleic acid)* deoksiribonukleinska kiselina
- dNTP (engl. *deoxyribonucleotid triphosphate*) deoksiribonukleotid trifosfat
- hENT (engl. *human equlibritive nucleoside transporter*) humani ekvilibracijski nukleozidni transporter
- hCNT (engl. *human concentrative nucleoside transporter*) humani koncentracijski nukleozidni transporter
- FBS *(*engl. *fetal bovine serum)* fetalni goveđi serum
- GLUT4 (engl. *glucose transporter type 4*) transporter glukoze tip 4
- HEPES 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina
- PBS *(*engl. *phosphate buffered saline*) fosfatni pufer
- ATP (engl. *adenosine triphosphate)* adenozin trifosfat
- MDR1 gena koji kodira transportni glikoprotein na površini stanice
- ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay)* imunoenzimski test
- TMB reagens (engl. *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)*
- RNA (engl. *ribonucleic acid*) ribonukleinska kiselina
- RPMI (eng. *Roswell Park Memorial Institute*) medij

- RT-PCR (engl. *reverse transciption-polymerase chain reacition*) lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja
- qRT-PCR (engl. *quantitative RT-PCR*, qRT-PCR) kvantitativni RT-PCR

1. UVOD

Međunarodna agencija za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer, IARC) je tijelo Svjetske zdravstvene organizacije (World Health Organization WHO) koje je specijalizirano za područje malignih bolesti. Prema njihovim istraživanjima, rak uzrokuje 20 % smrti u europskoj regiji. S više od 3 milijuna novih slučajeva i 1,7 milijuna smrti svake godine, rak je najvažniji uzrok smrti i morbiditeta u Europi nakon kardiovaskularnih bolesti. Svjetska stopa incidencije, prema spolu, pokazuje da je pojavnost raka 205 novih slučajeva na svakih 100000 muškaraca širom svijeta, te 165 novih slučajeva na 100000 žena. Zloćudni tumori, maligne neoplazije ili novotvorine obuhvaćaju skupinu bolesti koje karakterizira nekontrolirana dioba stanica, prodor u okolna tkiva, širenje putem limfe i krvi u druge dijelove organizma te formiranje sekundarnog tumora ili metastaze. Ako se širenje ne kontrolira, može dovesti do smrti. Rak može biti uzrokovan vanjskim čimbenicima poput duhana, nezdrave prehrane i infektivnih organizama te unutarnjim čimbenicima kao što su genetičke promjene onkogena, tumorsupresorskih gena i gena uključenih u nadzor staničnog ciklusa. U zemljama s niskim i srednjim dohotkom, koje imaju malo ili nimalo sredstava za prevenciju, dijagnozu i liječenje raka, bilježi se 70 % svih smrtnih slučajeva od raka. Bez obzira na razinu resursa, sve zemlje mogu implementirati četiri osnovne komponente kontrole raka - prevenciju, rano otkrivanje, dijagnozu i liječenje, te palijativnu skrb - i tako izbjeći i liječiti oboljele od tumorskih bolesti (1, 2). Tumorski mikrookoliš značajno utječe na proces tumorigeneze. U mnogim čvrstim tumorima, neravnoteža između zahtjeva za brzo proliferirajućim stanicama raka i sposobnosti vaskularnog sustava stvara područja s nedovoljnom količinom kisika. Kao odgovor na hipoksiju, stanice raka prilagođavaju se stvarajući svoj uzorak ekspresije gena kako bi odgovarale zahtjevima izmijenjenog mikrookoliša. Jedna od najznačajnijih prilagodbi ovom okolišu je pomak prema anaerobnoj glikolizi kako bi se održalo snabdjevanje energijom neophodno za metabolizam brzoproliferirajućih tkiva. Produkt anaerobnog metabolizma jest mliječna kiselina koja se akumulira s ugljičnim dioksidom, što dovodi do zakiseljavanja izvanstaničnog okoliša. Gen za ugljičnu anhidrazu IX (*CA IX*) najčešće je eksprimirani gen u odgovoru stanice na hipoksiju. Njegova ključna uloga u održavanju unutarstanične pH vrijednosti predstavlja način na koji se stanice raka prilagođavaju toksičnim uvjetima izvanstaničnog okruženja. Nadalje, aktivnost *CA IX* stimulira migracijske puteve stanica karcinoma i povezana je s povećanjem agresivnog i invazivnog tumorskog fenotipa. Budući da je

promijenjena ekspresija gena *CA IX* u mnogim vrstama tumora, određivanje njegove ekspresije je značajno i smatra se biljegom tumorske hipoksije. Štoviše, njegov izražaj je usko povezan s prognozom kliničkog ishoda u u različitim tipovima tumora (3).

1.1. Hipoksija tumora

Čvrsti tumori karakterizirani su brojnim promjenama u genotipu i fenotipu koje dovode do promjena u funkciji njihovih stanica. Nekontrolirani rast stanica i proliferacija potaknuta mutacijama potiču prostornu reorganizaciju i uključuju brzo povećanje tumorske mase. Kako rast tumora napreduje dok se ne počnu lučiti vaskularni faktori rasta, sve je veća masa tumora izložena nedostatku kisika odnosno hipoksiji. Hipoksija tumora, stanje određeno s manje od 5 % kisika u okolnom tkivu, dovodi do promjene u ponašanju stanica raka, uključujući promjene u ekspresiji gena, metabolizmu i proliferaciji. Stanice raka mijenjaju energetski metabolizam od oksidativne fosforilacije do anaerobne glikolize. Anaerobnom glikolizom dolazi do stvaranja velikih količina mliječne kiseline i ugljičnog dioksida koji pridonose smanjenju izvanstaničnog pH, a što dovodi do razvoja kiselog okoliša unutar tumorskog mikrookoliša. Budući da je održavanje vitalnih bioloških funkcija stanica iznimno osjetljivo na unutarstanični pH, opstanak stanica karcinoma ovisi o njihovoj sposobnosti prilagodbe tim ograničavajućim uvjetima. Jedan od ključnih proteina koji su uključeni u proces prilagodbe je ugljična anhidraza IX - CA IX (3, 4, 5).

1.2. Ugljična anhidraza IX

Ugljične anhidraze (CA) su velika obitelj cinkovih metaloenzima, koji kataliziraju brzu pretvorbu ugljičnog dioksida i vode u bikarbonat i protone i obratno. Ugljične anhidraze sudjeluju u raznim biološkim procesima, uključujući disanje, kalcifikaciju, acido-baznu ravnotežu, resorpciju kostiju, stvaranje cerebrospinalne tekućine, sline i želučane kiseline. Aktivno mjesto većine ugljičnih anhidraza sadrži cinkov ion. Postoji najmanje pet različitih obitelji CA (α-, β-, γ-, δ- i ε). CA IX je transmembranski protein, također je poznat i kao membranski antigen MN, antigen G250 povezan s karcinomom bubrega koji pripada obitelji α-ugljične anhidraze. Izražava se u svim karcinomima bubrežnih stanica, ali se ne može odrediti u normalnom bubrežnom ili većini drugih normalnih

tkiva. CA IX ima optimalnu aktivnost pri pH 6,49, reverzibilno hidratizira ugljični dioksid, sudjeluje u regulaciji pH, može biti uključen u kontrolu stanične proliferacije i transformacije te se čini da CA IX predstavlja novi specifični biomarker za neoplaziju vrata maternice. Gen *CA IX* mapiran je na 17q21.2 fluorescentnom *in situ* hibridizacijom, međutim, hibridnim zračenjem lokaliziran je na 9p13-p12 (4, 5).

1.3. Uloga CA IX

Stvaranje ugljične anhidraze IX kao odgovor na hipoksiju opaženo je u mnogim vrstama tumora, uključujući maligni tumor mozga, glave i vrata, dojke, pluća, mokraćnog mjehura, cerviksa, debelog crijeva i bubrega te se smatra lošim prognostičkim znakom. Ugljična anhidraza IX je ključna komponenta tumora koja aktivno pridonosi regulaciji pH olakšavajući ionski transport preko plazmatske membrane i time štiti tumorske stanice od acidoze suprotstavljajući unutarstaničnu akumulaciju kiselih metaboličkih proizvoda (4). Negativni učinci CA IX-a su višestruki, uglavnom zbog jake transkripcijske aktivacije uzrokovane hipoksijom putem faktora transkripcije koji inducira hipoksiju (HIF-1) (6). Aktivacija gena *CA IX* u prvim fazama hipoksije omogućuje tumorskim stanicama preživljavanje u hipoksičnijm uvjetima. CA IX snižava izvanstanični pH tumora proizvodnjom protona. Za normalne stanice, zakiseljavanje mikrookoliša može biti smrtonosno zaustavljanjem vitalnih unutarstaničnih procesa kao što je stanično disanje. CA IX tumorskih stanica sprječava smrt stanica raka proizvodnjom bikarbonata, koji alkalizira unutarstanični pH. Stoga, CA IX daje tumorskim stanicama prednost u preživljavanju protiv normalnih stanica. Izvanstanično zakiseljavanje dovodi do rezistencije na antitumorske lijekove koji uništavaju ili kontroliraju rast zloćudnih stanica protiv raka. Osim toga, liječenje zračenjem također je manje djelotvorno zbog nedostatka kisika jer se ne mogu proizvesti slobodni radikali koji uzrokuju stanično oštećenje tumora. Stoga, stanice tumora uz pomoć CA IX stječu daljnju otpornost na liječenje zračenjem. Taj se metaloprotein smatra integralnim proteinom u fiziologiji raka, koji djeluje kao faktor preživljavanja i omogućava napredovanje tumora. Na taj način, temeljeno na inhibiciji njegove katalitičke aktivnosti, CA IX je validiran kao meta u u dijagnostici i liječenju hipoksičnih tumora i metastaza hipoksičnih tumora. Tri su glavna smjera u terapiji tumora pomoću ugljične anhidraze IX monoklonlana antitijela, inhibitori malih molekula i nanočestice na kojima se nalaze inhibitori ugljične anhidraze (CAI). Korištenje CA IX

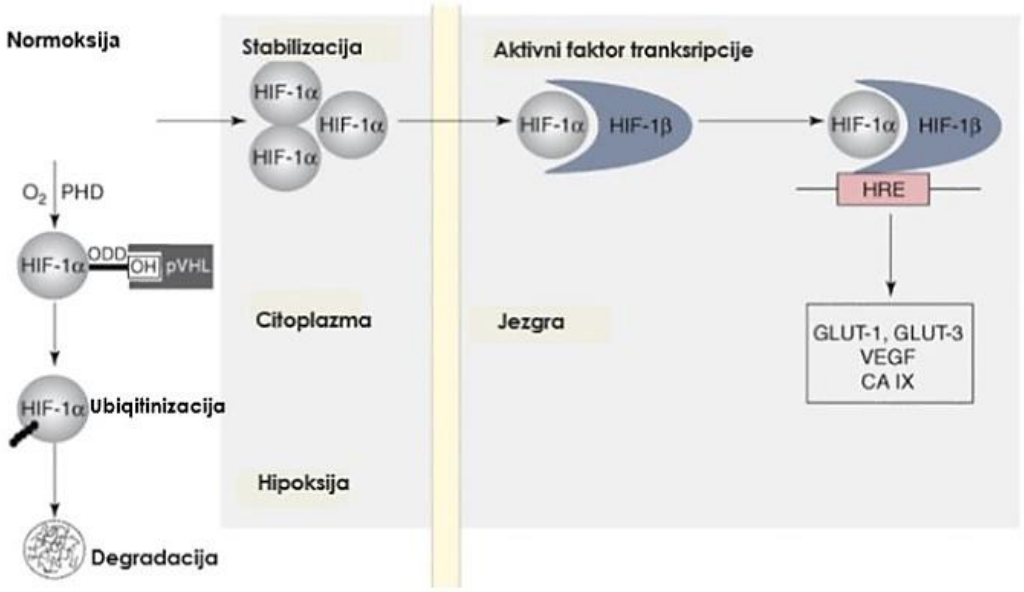
posredovane imunoterapije sa specifičnim protutijelima koja inducira citotoksičnost nudi brojne mogućnosti za selektivnu terapiju i kliničku primjenu CA IX, budući da je njena ekspresija vrlo rijetka u normalnim tkivima. Drugi se pristup temelji na činjenici da je katalitička aktivnost CA IX kritična za preživljavanje i invazivnost tumorskih stanica. Tijekom proteklih godina dizajnirano je nekoliko CA IX inhibitora, te je identificirano nekoliko CA IX selektivnih spojeva, od kojih su neki pokazali obećavajuće učinke u prekliničkim studijama. Treća strategija je dovela do pripreme nanočestica koje su pokazale učinkovito *in vitro* i *in vivo* inhibicijsko djelovanje protiv stanica koje prekomjerno eksprimiraju CA IX (4, 5, 6, 7).

1.4. Mehanizam regulacije CA IX u hipoksiji

Hipoksijom inducirani trasnkripcijski faktor HIF-1 je heterodimer koji se sastoji od inducibilne podjedinice (HIF-1a) i konstitutivno eksprimirane podjedinice (HIFlb). U skladu s njegovim imenom, HIF-1 postaje aktivan pod uvjetima hipoksije stabilizacijom i/ili ekspresijom podjedinice HIF-1a, što je nestabilno i gotovo se ne može detektirati u normalnim uvjetima. Proteini s domene prolil-4-hidroksilaze ovisni o kisiku (*eng. prolyl-4-hydroxylase domain* - PHD) kovalentno modificiraju područje u HIF-1a, poznato kao "domena degradacije ovisna o kisiku", hidroksiliranjem prolinskih ostataka. Hidroksilirani HIF-1a naknadno stvara vodikove veze s bočnim lancima na von Hippel-Lindauovom tumorskom supresorskom proteinu (pVHL), što zauzvrat potiče HIF-la, nakon čega slijedi razgradnja u 26S proteasomu.

U hipoksičnim uvjetima, vezanje pVHL na HIF-la je inhibirano, što rezultira nakupljanjem HIF-la i njegovom dimerizacijom s konstitutivnom HIF-lb podjedinicom. Prema tome, hipoksija smanjuje hidroksilaciju prolina zbog neaktivnosti PHD-a u odsustvu kisika, što rezultira stabilizacijom HIF-la i njegovom neprepoznavanju pomoću pVHL-a. Udruženje HIF-1a s podskupinom HIF-1b dovodi do stvaranja HIF-1, što rezultira izražavanjem ciljeva koji sadrže lokacije odgovorne na hipoksiju. Ciljani geni uključuju, između ostalog, prijenosnike glukoze (GLUT-1 i GLUT-3) koji doprinose metabolizmu glukoze; vaskularni endotelni faktor rasta, koji aktivira neoangiogenezu; i posljednja, ali ne i najmanje važna, CA IX, koja je uključena u pH regulaciju i staničnu adheziju (Slika 1.). U nekim stanicama raka, gen koji kodira pVHL je mutiran, što dovodi do snažne regulacije CA IX (do 150 puta) kao posljedicu konstitutivne HIF aktivacije.

U stanici karcinoma bubrega, CA IX je također regulirana metiliranjem promotora - epigenetičkim mehanizmom koji je uključen u kontrolu mnogih gena povezanih s rakom (6).



Slika 1. Regulacija hipoksije inducirane genske ekspresije posredovane HIF-1 transkripcijskim faktorom (Preuzeto i prilagođeno prema shematskom prikazu iz reference 6.)

1.5. Inhibitori CA IX u terapiji tumora

Otkriće aktivnosti vezanih uz tumorigenezu dovelo je do opsežnog istraživanja selektivnih inhibitora CA IX. Postignut je dizajn selektivnih inhibitora CA koji sadrže različite zanimljive fizikalno-kemijske osobine. Novi sulfonamidi su sintetizirani s nekim od tih snažno selektivnih inhibiranih CA. Prema tome, mnogi biokemijski, fiziološki i farmakološki novi podatci pokazuju na upotrebu CA inhibicije u upravljanju hipoksičnim tumorima, koji ne reagiraju na klasičnu kemoterapiju i radioterapiju. Postoje mogućnosti razvijanja dijagnostičkih alata za neinvazivno označavanje tih tumora i terapeutskih agensa koji vjerojatno ometaju izvanstanično tumorsko zakiseljavanje u koje je uključena CA IX. Dosta je farmakoloških istraživanja u svrhu shvaćanja može li se razviti uspješna nova klasa antitumorskih lijekova počevši od tih preliminarnih, ali vrlo ohrabrujućih opažanja (8). Acetazolamid je jedan od najboljih inhibitora CA aktivnosti, s

dokazanim doprinosom smanjenju invazivnosti staničnih linija dobivenih iz karcinoma bubrežnih stanica. Tijekom posljednjih nekoliko godina pronađeni su mnogi CA IX selektivni spojevi s različitim mehanizmima djelovanja, od kojih su najznačajniji sulfonamidi čiji se mehanizam temelji na vezanju sulfonamidnog aniona u cinkov ion unutar aktivnog mjesta enizma (3, 5).
Sulfonamidi su najčešća klasa inhibitora CA IX razvijeni tijekom posljednjih 15 godina. Mnogi od njih pokazuju snažnu inhibitorsku aktivnost, ali smanjenu selektivnost CA IX povezanu s tumorom u odnosu na sveprisutnu izoformu hCA II. Da bi se povećala selektivnost za membranu CA IX, modulacija fizikalnih i kemijskih svojstava inhibitora može se uspješno postići vezivanjem različitih bočnih lanaca. S obzirom na njegovu veličinu ili površinsku topologiju, ti bočni lanci mogu se vezati na ulaz aktivnog mjesta CA IX, regije koja sadrži najveću varijabilnost, a zatim sudjeluju u njihovoj selektivnosti prema specifičnim izoformama CA. Štoviše, priroda bočnih lanaca može uvesti ili poboljšati membransku nepropusnost tako da se inhibitor može vezati samo ili pretežno izvanstaničnim izoformama (9).

1.6. Liječenje tumora

Metode liječenja tumora u kliničkoj su praksi kirurške metode, radioterapija, hormonska terapija, imunoterapija, inhibicija angiogeneze i terapija citostaticima. Postoji veliki znanstveni interes za ugljičnu anhidrazu IX kao biomarker, usmjeren na dijagnostiku i liječenje hipoksičnih tumora. Zbog nedostatka prikladnih CA IX pozitivnih modela istraživanja i složenosti koje su uključene u sintezu inhibitora malih molekula selektivnih za izoenzim ugljične anhidraze IX, suočeni smo s izazovima u istraživanju. Međutim, nedavno je postignut napredak u razvoju inhibitora malih molekula koji pokazuju učinkovitost in vivo sa selektivnošću za izvanstaničnu ugljičnu anhidrazu IX. Prvo su korišteni inhibitori bazirani na acetazolamidu čije su vezne skupine vezale albumine i nabijene fluorofore i time ograničavale vezanje acetazolamida na izvanstaničnu ugljičnu anhidrazu IX. Nedavne studije pokazale su da CA IX selektivni inhibitori sulfonamida mogu izravno i specifično inhibirati rast hipoksičnih, CA IX pozitivnih tumora u pretkliničkim životinjskim modelima. Liječenje hipoksičnih, metastatskih 4T1 mišjih tumora dojke u ortotoksičnom okruženju s uspostavljenim fluorescentnim sulfonamidnim inhibitorom CA IX rezultiralo je značajnom inhibicijom rasta tumora, dok slična obrada primarnih tumora izvedenih iz

nemetastatskih 67NR stanica nije imala učinak na rast tumora (10). U kliničkoj praksi koristi se kombinirani pristup liječenja tumora koji ostvaruje bolji ishod liječenja. Kombinirana terapija omogućava potpuno uništenje tumorske stanice uz klinički podnošljivu toksičnost lijekova. Primjenom kombinirane terapije nastoji se isključiti faktor rezistencije tumorske stanice na kemoterapiju povezan s genskom nestabilnošću tumorske stanice. Primarna rezistencija pri prvoj primjeni terapije povezana je s mutacijom p53 tumor supresorskog gena i mutacijama enzima povezanih s popravkom DNA. Rezistencija na citostatik očituje se pojačanom aktivnošću ATP-ovisne grupe ABC membranskih transportnih proteina i pojačanom ekspresijom gena MDR1 koji kodira transportni glikoprotein na površini stanice koji aktivnim prijenosom održava koncentraciju citostatika unutar stanice ispod granice djelotvornosti, pojačanim mehanizmima popravka DNA i akumulacijom ciljanih mutacija gena koji kodiraju gene za enzime zadužene za inaktivaciju lijekova (11, 12).

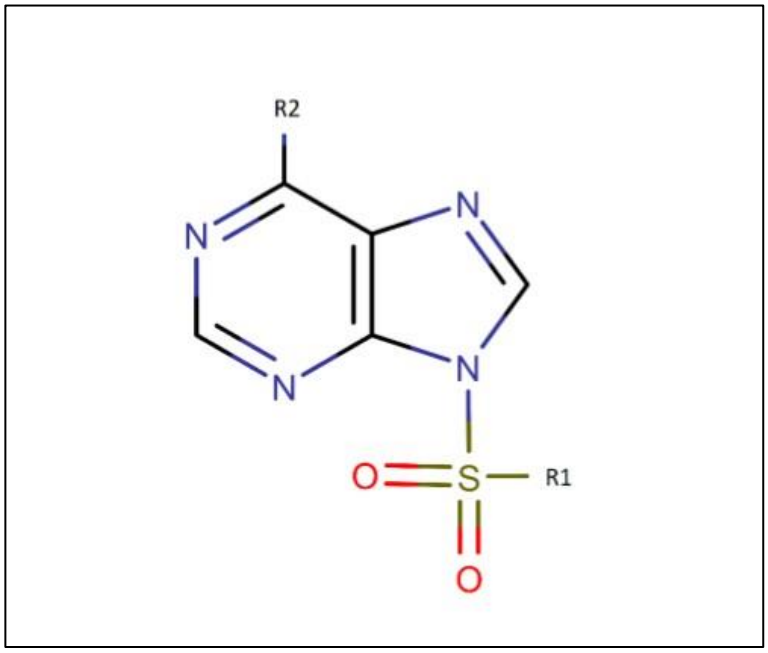
1.6.1. Analozi nukleobaza kao antitumorski lijekovi

Derivati *N*-9 sulfniluree su derivati dviju biološki aktivnih komponenti: sulfonilciklouree i purinske baze te je poznato da derivati sulfonilciklouree pokazuju antitumorsko djelovanje. Nukleozidi su organske molekule čija se struktura sastoji od heterocikličke dušične baze koja je preko N-glikozidne veze vezana na šećer ribozu ili deoksiribozu. Postoje purinske (adenin, gvanin) i pirimidinske (timin, citozin, uracil) baze. Nukleozidi su važne molekule koje sudjeluju u različitim biološkim procesima te njihovom fosforilacijom na primarnoj hidroksilnoj skupini šećera nastaju nukleotidi – osnovne strukturne jedinice nukleinskih kiselina.

Derivati sulfonilurea modificirane su nukleobaze (Slika 2.) koje su postale predmetom brojnih istraživanja, a sve sa svrhom liječenja malignih bolesti. Endogeni purinski nukleozidi uključeni su u esencijalne stanične procese poput sinteze DNA i RNA, stanične signalizacije i enzimske reakcije. Njihovi sintetički, kemijski modificirani analozi razvijeni su s namjerom oponašanja fizioloških molekula i iskorištavanja staničnog metabolizma. Takvi analozi mogu se ugraditi u DNA ili RNA inhibirajući umnožavanje malignih stanica te virusa. Osim njihove ugradnje u nukleinske kiseline, purinski nukleozidni analozi mogu ulaziti u interakcije i inhibirati esencijalne enzime kao što su DNA i RNA polimeraza, kinaza, ribonukleotid reduktaza, DNA metiltransferaza

i purin nukleozid fosforilaza. Ekstracelularno dobivene nukleobaze i nukleozidi moraju proći kroz plazmatsku membranu kako bi se iskoristili (11). Budući da se radi o hidrofilnim spojevima, postupak prolaska jednostavnom difuzijom otežan je te se smatra da su u prolazak uključeni specifični transporteri. Pretpostavlja se da se transportni sustavi nukleobaza pojavljuju u različitim stanicama i tkivima koji se mogu klasificirati u sekundarne aktivne transportere koji su povezani s natrijem i moderiranim transporterima.

Nukleozidni transporteri posreduju propusnost stanične membrane za endogene nukleozide i većinu nukleozidnih analoga kao hidrofilnih molekula. Važna je uloga nukleozidnih transportera u ostvarenju citotoksičnosti, kao i razvoju otpornosti tumorskih stanica na antitumorsku terapiju. Poznate su dvije skupine humanih nukleozidnih transportera: ekvilibracijski (hENT) i koncentracijski (hCNT). ENT subtipovi hENT1, hENT2, hENT3 i hENT4 posreduju u pasivnom, dvosmjernom transportu olakšanom difuzijom kroz staničnu membranu (12).



Slika 2. Osnovna kemijska struktura korištenih novosintetiziranih *N*-9-sulfonilurea

2. HIPOTEZA

Djelovanjem derivata *N*-9 sulfonilurea mijenja se ekspresija gena ključnih za proliferaciju stanice i njezin prolazak kroz stanični ciklus.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Odrediti ekspresiju gena *CA IX* i katalitičku aktivnost ugljične anhidraze u netretiranim (kontrolnim) i tumorskim stanicama izloženim djelovanju derivatima *N*-9-sulfonilurea.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Stanične linije

Učinci *N*-9-sulfonilpurinskih derivata ispitani su na panelu humanih tumorskih stanica:

- Adherentne stanične linije koje su korištene u radu:

HeLa (ATCC® CCL-2™) - adenokarcinom vrata maternice uzgajane kao 2D i 3D stanična kultura

- Stanične linije u suspenziji su:

K563 (ATCC® CCL-243™) - kronična mijeloična leukemija

4.1.2. Laboratorijski pribor i oprema

Stanične linije su uzgajane u bocama za kulturu stanica površine rasta 25 cm^2 proizvođača BD (Falcon, Njemačka) u CO_2 inkubatoru proizvedenom u IGO 150 CELLlifeTM, JOUAN, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SAD). Centrifugiranje je izvedeno na centrifugi Juan BR4i (Thermo electron corporation, Warwickshire, UK), a mikrocentrifugiranje na mikrocentrifugi Heraeus Fresco 2 (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, SAD). Svi postupci koji su zahtijevali sterilne uvjete izvedeni su u laminaru Klima oprema (Cleanroom technology, Hrvatska). Za potrebe mjerenja koncentracije i čistoće RNA, korišten je nanofotometar NanoPhotometar P-Class P-300 Implen (Njemačka).

4.1.3. Derivati *N*-9-sulfnilurea

Stanične linije tretirane su derivatima *N*-9-sulfnilurea koji su sintetizirani u Laboratoriju za supramolekularnu i nukleozidnu kemiju pri Zavoda za organsku kemiju i biokemiju na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Spojevi su otopljeni u dimetil sulfoksidu (DMSO) u koncentraciji od 1×10^{-2} mol/L (M) te pohranjeni na -20°C. Radne otopine pripremljene su otapanjem stock otopine (1×10^{-2} M) u sterilnoj destiliranoj vodi ili mediju u određenom volumenu.

4.1.4. Kemikalije

U eksperimentalnom dijelu rada korištene su kemikalije različitih proizvođača: Dulbecco modificirani Eagleov medij (DMEM) Lonza (Basel, Switzerland), fetalni goveđi serum (FBS) GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), L-glutamin 200 mM GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640) Lonza (Basel, Switzerland), 4-(2-hidroksietil)-1piperazinetansulfonska kiselina (HEPES) Sigma- Aldrich (St.Louis, SAD), fosfatni pufer (*eng. Phosphate Buffered Saline*, PBS), 0,25 % tripsin EDTA GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), Tripansko plavilo 0,4 % GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), dimetil sulfoksid (DMSO) Acros Organics (New Jersey, SAD), komplet za sintezu cDNA (PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit, TAKARA NIO INC.), komplet za određivanje aktivnosti enzima CAIX (Human Carbonic Anhydrase IX ELISA Kit, SIGMA-ALDRICH), komplet GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (PROMEGA).

4.2. METODE

4.2.1. Uzgoj stanica *in vitro*

Uzgoj stanica izvodi se u laboratoriju koji zahtjeva osigurane uvjete kao što su kabineti za rad koji omogućuju uvjete sterilnog rada uz laminarni protok zraka i sterilno posuđe, pribor, otopine, pufere i medije u cilju sprječavanja kontaminacije kulture stanica.
Stanice su uzgojene u bocama za kulturu stanica površine rasta 25 cm^2 (BD, Falcon, Njemačka) u CO_2 inkubatoru (IGO 150 CELLlifeTM, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u uvjetima 5 % CO_2 na 37°C u atmosferi zasićenoj vlagom.

Adherentne stanične linije HeLa uzgajane su u DMEM mediju uz dodatak 10 % FBS-a, 2 mM glutamina i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomicina. Stanične linije koje rastu u suspenziji K562, kultiviramo u RPMI 1640 mediju obogaćenom s 10 % FBS-a, 2 mM L-glutamina, 1 mM natrijeva piruvata, 10 mM HEPES-a i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomicin antibiotika. Održavanje staničnih linija u suspenziji provedeno je oduzimanjem određenog volumena stanica koji je nadoknađen svježim medijem RPMI 1640.

U svakom eksperimentu broj stanica definiran je kako bi rezultati bili kvalitetni i reproducibilni, stoga je prije postavljanja pokusa potrebno utvrditi broj stanica u staničnoj suspenziji. Broj i vijabilnost stanica određena je bojenjem stanične suspenzije s tripan-plavilom. Otopina tripanskog plavila nakuplja se u stanicama s oštećenom membranom, pri čemu se stanice boje u plavo. Žive stanice s intaktnom membranom aktivno izbacuju boju putem membranskih pumpi i ostaju neobojene. Pomiješano je 50 µl resuspendirane stanične suspenzije i 100 µl 0,4 % otopine tripanskog plavila, a zatim je mikropipetom nanesena ispod pokrovnog stakalca Bürker-Türk komorice za brojanje stanica. Pod invertnim mikroskopom prebrojane su žive stanice unutar 4 kvadratića i one koje padaju u gornji i lijevi brid kvadratića. Broj živih stanica preračunava se u broj stanica u 1 ml prema formuli:

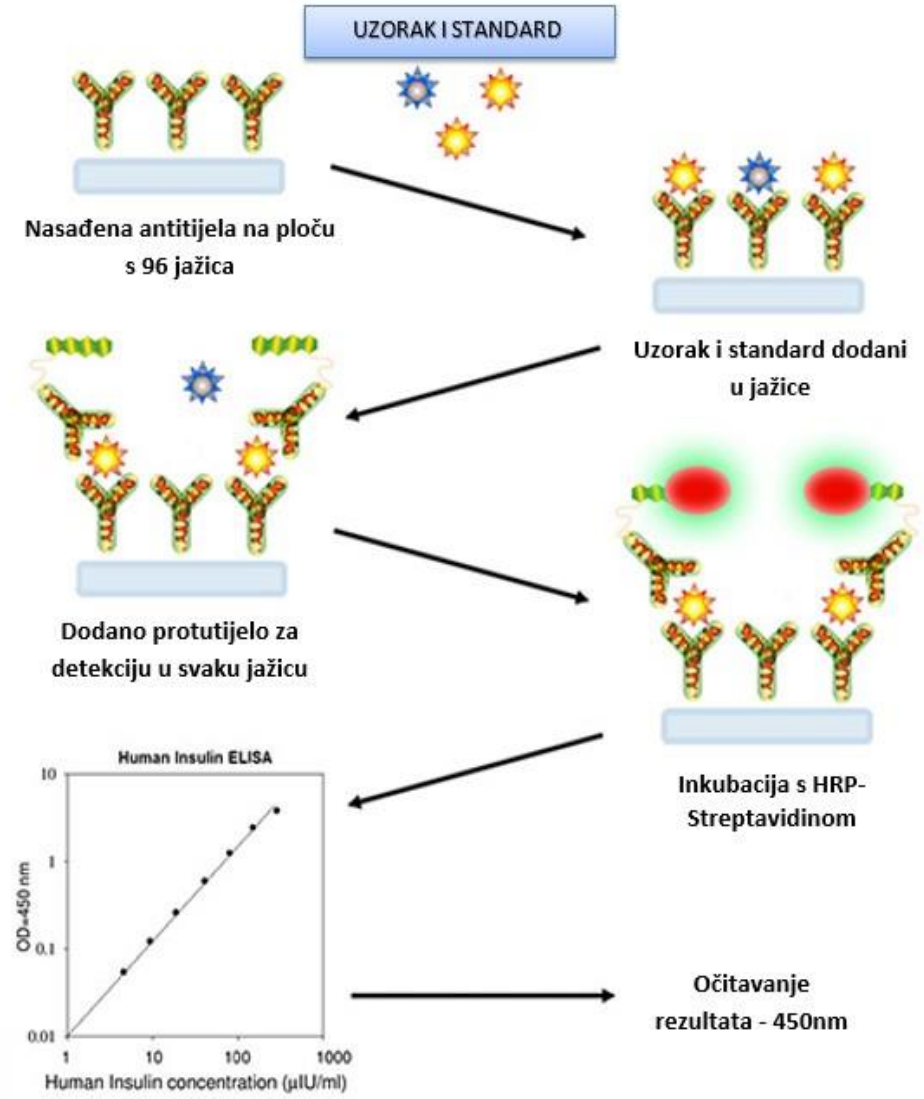
$$\textbf{broj stanica / 1ml} = \frac{N}{4} \times R \times 10^4$$

N predstavlja ukupan broj izbrojenih stanica u 4 kvadratića, R je razrjeđenje koje je u ovom slučaju 3 jer je 50 µl stanične suspenzije razrijeđeno sa 100 µl tripanskog plavila. Bürker-Türk komorica

podijeljena je na 9 manjih kvadrata površine 1 mm^2 i dubine 0,1 mm, odnosno 0,1 µl volumena koji se množi s 10^4 kako bi se dobio broj stanica u 1 ml.

4.2.2. Određivanje aktivnosti enzima CAIX

Analiza je obavljena pomoću komercijano dostupnog kompleta za određivanje aktivnosti enzima CA IX (Human Carbonic Anhydrase IX ELISA Kit, SIGMA-ALDRICH) i prema protokolu proizvođača. Metoda se temelji na ELISA „Sendvič" određivanju. Prije određivanja svi reagensi i uzorci moraju biti na sobnoj temperaturi (18 - 25°C). HeLa stanice uzgojene u 2D kulturi nasađene su na ploču s 96 jažica u koncentraciji od 1×10^5 ml/st, HeLa stanice uzgojene u 3D kulturi nasađene su u koncentraciji od 1×10^4 ml/st i K562 stanice su nasađene u koncentraciji od 3×10^5 ml/st. Inkubirane su u CO_2 inkubatoru na 37° kroz 24 sata, a zatim izložene ispitivanim spojevima. Stanice su tretirane derivatima *N*-9 sulfoniluree R-191 i D7-23 kroz 24 sata u koncentraciji od $1{\times}10^{-5}$ M za HeLa stanice u 2D i 3D kulturi te 5×10^{-6} M za K562 stanice. Nakon inkubacije sa stanica je prikupljen medij te centrifugiran 6 min pri 1100 rpm. U odgovarajuće jažice dodano je 100 µl svakog standarda i uzorka – medij sa stanica. Nakon što su jažice pokrivene, inkubirane su 2,5 sata na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje. Otopina je odbačena te su uzorci oprani 4 puta otopinom za ispiranje. Nakon posljednjeg ispiranja otklonjena je otopina za ispiranje aspiracijom te je ploča preokrenuta i obrisana čistim papirnatim ručnicima. Zatim je dodano 100 µl pripremljenog protutijela za detekciju u svaku jažicu. Jažice su pokrivene i inkubirane 1 sat na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje. Nakon inkubacije, otopina je odbačena te je ponovljen postupak ispiranja. Dodano je 100 µl pripremljene otopine streptavidina u svaku jažicu. Jažice su pokrivene i inkubirane 45 minuta na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje. Nakon inkubacije, otopina je odbačena te je ponovljen postupak ispiranja. Zatim je dodano 100 µl TMB reagensa u svaku jažicu. Jažice su pokrivene i inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku uz lagano mućkanje. U zadnjem koraku svakoj je jažici dodano 50 µl stop-otopine. Rezultati se očitavaju odmah na 450 nm. Apsorbancija je izmjerena na optičkom čitaču mikroploča (Viktor 3V 1420, Perking Elmer) (Slika 3.).



Slika 3. Shematski prikaz ELISA „Sendvič“ određivanja (Preuzeto i prilagođeno prema shematskom prikazu iz protokola Human Carbonic Anhydrase IX ELISA Kit, SIGMA-ALDRICH)

4.2.3. Izolacija RNA

HeLa 2D stanična kultura nasađena je u koncentraciji od 1 x 10^6 stanica, a HeLa stanice uzgojene u 3D kulturi nasađene su u koncentraciji od 1 x 10^4 stanica/ml na ploču s 96 jažica slabo prijanjajućeg konusnog dna. K562 stanice nasađene su u bočice za uzgoj stanica u koncentraciji od 5 x 10^6 stanica. Ploča sa stanicama centrifugirana je 10 min na sobnoj temperaturi pri 1000 rpm. Stanični sferoidi formirani su u CO_2 inkubatoru tijekom 72 h pri 37 °C.
Stanice su tretirane s R-191 i D7-23 derivatima u koncentracijama od 5 x 10^{-6} M za HeLa stanice, odnosno 2 x 10^{-6} M za K562 stanice. Inkubacija s derivatima trajala je 24 sata. Nakon inkubacije, stanice su pokupljene zajedno s medijem u kojemu su uzgajane, centrifugirane na 600 x g 4 min pri 4 °C. Za izolaciju RNA iz stanične kulture prikupljeni su sferoidi iz 96 jažica.
Izolacija i analiza RNA usmjerena je na otkrivanje ekspresije gena čiji je cilj saznati koji su geni aktivni u pojedinom tkivu ili stanicama u fiziološkim uvjetima ili nakon prethodne manipulacije (3).
U ovome istraživanju za izolaciju RNA iz HeLa i K562 stanica korišten je Rneasy Mini Kit proizvođača Qiagen, Njemačka. Stanice su najprije lizirane dodatkom pufera za lizu dostupnog u kitu, a lizatu se zatim dodao etanol kako bi se postigli idealni uvjeti vezanja. Nakon toga lizat se nanosi na RNeasy silicijsku membranu (*RNeasy Mini spin column*). RNA se veže (do 100 µg kapaciteta), a svi se onečišćivači nekoliko puta učinkovito ispiru. Nakon provedene izolacije uslijedilo je mjerenje koncentracije, čistoće i integriteta RNA na nanofotometru (IMPLEN NanoPhotometer P 330).

4.2.4. Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja

Nakon izvedene izolacije RNA uslijedilo je prevođenje dobivene jednolančane RNA u dvolančanu cDNA u postupku lančane reakcije polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR). Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR) metoda je koja se vrlo često koristi u analizi ekspresije gena. Sastoji se od obrnutog prepisivanja (eng. *reverse transcription*, RT) RNA u komplementarnu DNA (cDNA) i umnažanja dobivene cDNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR). Zbog svoje osjetljivosti, ta metoda omogućuje analizu ekspresije gena neovisno o količini početnog materijala pa je pogodna i za slabije eksprimirane gene. PrimeScript First Strand cDNA

Synthesis Kit sadrži sve reagense potrebne za sintezu prvog lanca cDNA iz ukupnog ili poliA + RNA pomoću PrimeScript reverzne transkriptaze.

U mikrotubici je pripremljena smjesa 1 µl Oligo dT Primera, 1 µl dNTP smjesa (10 mM svaki), 7 µl ukupne RNA i dH_2O do 10 µl. Smjesa je inkubirana na 5 minuta pri 65°C, a zatim odmah ohlađena na ledu. Nakon toga pripremljena je reakcijska smjesa kombiniranjem sljedećih komponenata da se dobije 20 µl reakcije. 10 µl pripremljene smjese iz prvog koraka, 4 µl PrimeScript pufera, 0,5 µl inhibitora RNaze (20 jedinica), 1 µl PrimeScript reverzna transkriptaza (200 jedinica) te do 20 µl dH_2O. Dobivenu reakcijsku smjesu bilo je potrebno inkubirati 10 minuta na 30°C, zatim 60 minuta na 42 °C. Inaktivacija enzima izvršena je inkubiranjem na 5 minuta pri 95°C, nakon čega je uslijedilo hlađenje na 4 °C.

Reakcija RT-PCR-a izvedena je na Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler proizvođača Thermo Fisher Scientific, SAD. Cijeli proces odvijao se u četiri faze od kojih je svaka trajala određeno vrijeme.

4.2.5. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR)

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu RT-PCR metoda je koja je korištena za kvantifikaciju ekspresije gena *CA IX*. Reakcija je izvedena prema kitu GoTaq G2 Flexi DNA Polimerase proivođača Promega, SAD. Korišteni dNTP-ovi proizvođača Matabion, Njemačka. Korišteni sljedovi početnica prikazani su u Tablici 1. Reakcijska smjesa za qRT-PCR reakciju pripremljena je od sljedećih komponenti: 1 x PCR pufer, 3 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP, 0,525 µM početnice, DNA kalup, 1,25 U Taq polimeraza, 1 x Syber Green, ultračista voda. Reakcijska smjesa rađena je u triplikatu.

Reakcija je izvedena na aparatu Applied Biosystems QuantStudio 5, proizvođača Thermo Fisher Scientific, SAD. Reakcija se odvijala u dvije faze. Prva faza trajala je 2,30 minuta, a izvodila se na temperaturi od 95 °C. U drugoj fazi uslijedio je postupak denaturacije, vezanja početnica i elongacije. Denaturacija se odvijala na 95 °C tijekom 30 sekundi. Vezanje početnica trajalo je 1,30 minuta pri temperaturama kako slijedi: 57°C za *CA IX* i 68 °C za *GAPDH* (kontrolni gen). Elongacija lanca trajala je 1 minutu pri 72 °C. Druga faza ponovljena je 40 puta, odnosno izvedeno

je 40 ciklusa amplifikacije. Količina fluorescencije razmjerna je količini nastalog PCR produkta, a u svakom trenutku može se provjeriti kako *real-time* PCR reakcija napreduje.

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

Naziv početnice	**Nukleotidni slijed**	**Referenca**
GAPDH (F)	5`-CCA TCA ATG ACC CCT TCA TTG ACC-3`	(13)
GAPDH (R)	5`-GAA GGC CAT GCC AGT GAG CTT CC-3`	(13)
CA IX (F)	5`-TGA GGA AGG CTC AGA GAC TCA-3`	NBCI/primer-BLAST
CA IX (R)	5`-TCA GCT GTA GCC GAG AGT CA-3`	NBCI/primer-BLAST

4.3. Statistička analiza rezultata

Rezultati su prikazani grafički na temelju srednjih vrijednosti i standardne devijacije dobivenih nakon metode ELISA i RT-PCR.

Provedeni su statistički testovi, Kruskal-Wallis i Mann-Whitney kako bi se usporedila djelotvornost genske ekspresije *CA IX* u odnosu na kontrolne stanice i stanice izložene derivatima R-191 i D7-23.

Prikupljeni podatci analizirani su uporabom programskih paketa SPSS 23.0 i MS Office Excela.

5. MATERIJALI I METODE

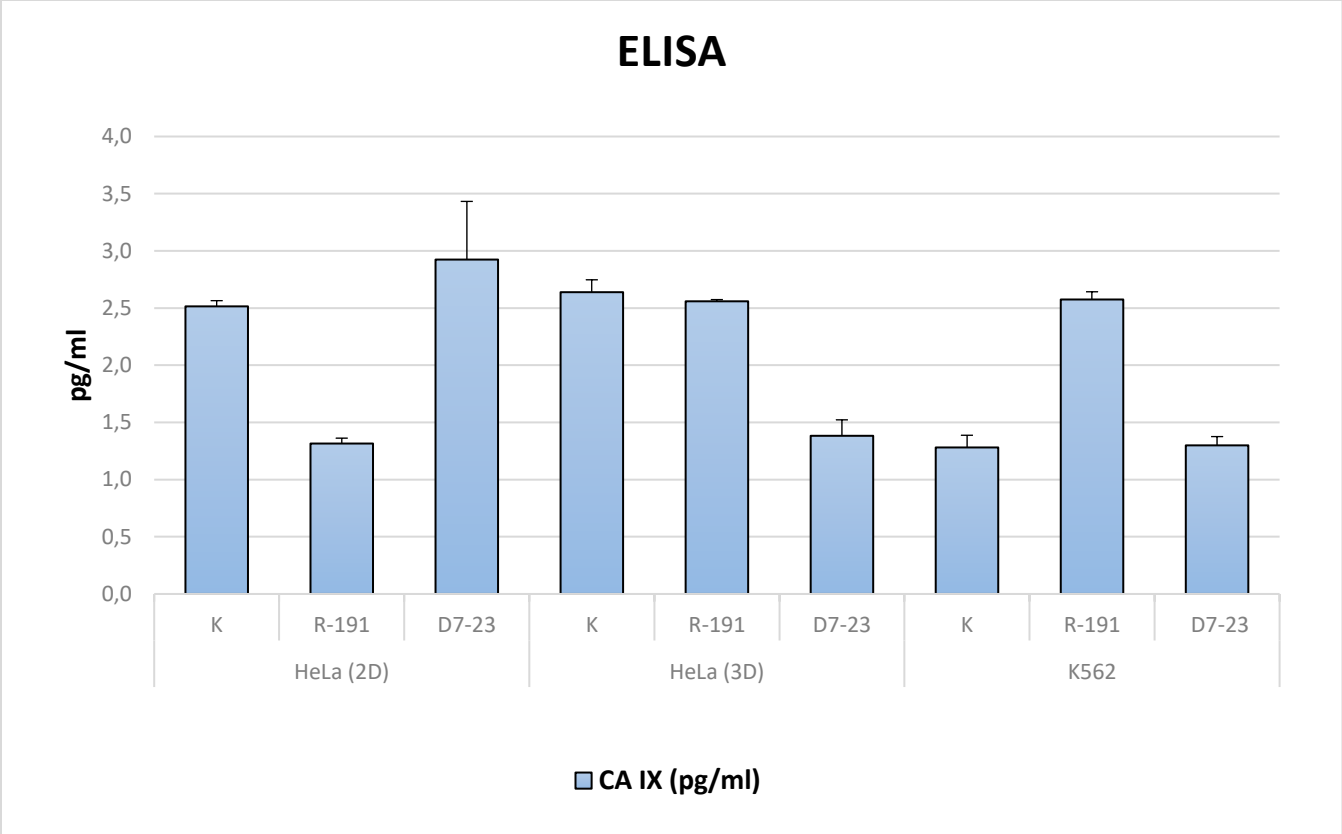
5.1. Promjene u katalitičkoj aktivnost enzima CA IX ELISA testom

ELISA testom mjerena je katalitička aktivnost CA IX enzima u 2D i 3D HeLa staničnoj liniji te u K562 staničnoj kulturi. Stanice su inkubirane 24 sata s derivatima R-191 i D7-23.

Izmjerena katalitička aktivnosti enzima CA IX različita je ovisno o staničnoj liniji. U netretiranim kontrolnim stanicama u HeLa 2D staničnoj kulturi aktivnost iznosi 2,5 pg/ml, u HeLa 3D staničnoj kulturi aktivnost iznosi 2,6 pg/ml za razliku od aktivnosti u K562 stanicama koja je niža i iznosi je 1,3 pg/ml.

U stanicama tretiranim s derivatom R-191 uočena je smanjena katalitička aktivnost u 2D HeLa staničnoj kulturi za 50 % , dok u 3D HeLa staničnoj kulturi nije vidljiva promjena u katalitičkoj aktivnosti enzima CA IX. U K562 staničnoj liniji uočava se povišena katalitička aktivnost enzima u odnosu na kontrolne stanice.

Učinak derivata D7-23 na HeLa 2D staničnu liniju rezultira blago povećanom katalitičkom aktivnosti CA IX enzima za razliku od HeLa 3D stanične linije gdje je katalitička aktivnost smanjena na 1,4 pg/ml. Kod K562 stanične linije nije vidljiva promjena u katalitičkoj aktivnosti enzima CA IX nakon tretmana stanica derivatom D7-23 (Slika 4.).



Slika 4. Grafički prikaz katalitičke aktivnosti enzima CA IX ELISA „Sendvič“ testom na HeLa 2 D i 3 D kulture i K562 staničnim linijama nakon tretmana s derivatima R-191 i D7-23.

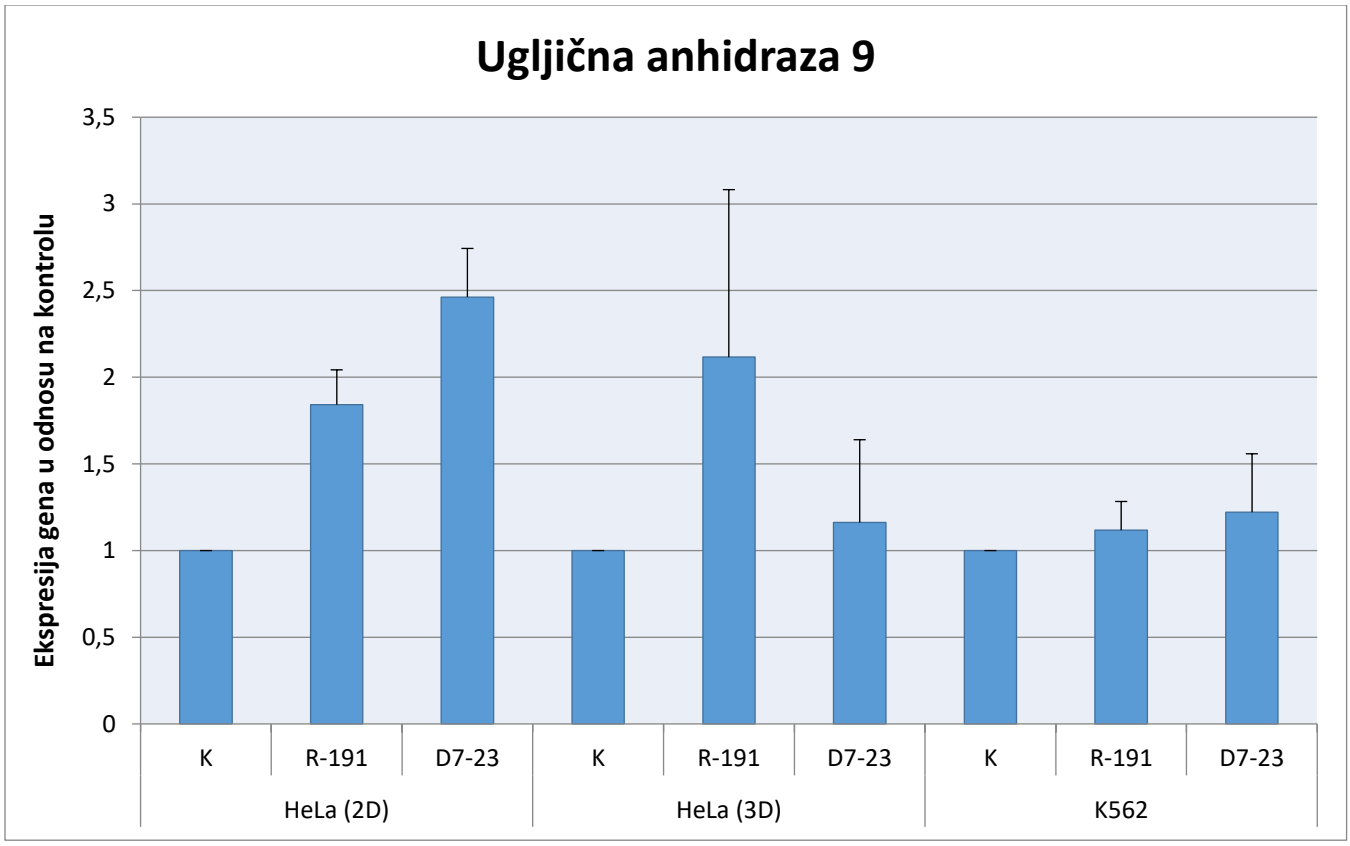
5.2. Promjene u ekspresiji gena *CA IX* RT PCR reakcijom

Rezultat djelovanja derivata R-131 i D7-23 na ekspresiju gena *CA IX* u stanicama 2 D i 3 D HeLa stanične linije i K562 stanične linije određen je RT-PCR reakcijom.

U HeLa 2 D staničnoj liniji djelovanjem derivata R-191 došlo je do povećanja ekspresije gena *CA IX* za 84 %, a učinak derivata D7-23 rezultirao je povećanom ekspresijom gena za gotovo 150 %.

Učinak derivata R-191 na 3 D HeLa staničnu liniju povećalo je ekspresiju gena za više od 100 %, dok je derivat D7-23 blago povećao ekspresiju gena *CA IX*.

Ekspresija gena *CA IX* u K562 staničnoj liniji neznatno je povišena djelovanjem derivata R-191 i D7-23 (Slika 5.).



Slika 5. Grafički prikaz ekspresije gena *CA IX* u HeLa 2 D i 3 D staničnim kulturama i K562 staničnoj liniji. Rezultati ekspresije *CA IX* gena normalizirani su prema *GAPDH* genu.

Primijenjen statistički Kruskal-Wallis test pokazuje kako između promatranih grupa uzoraka postoji statistički značajna razlika u ekspresiji gena *CA IX*. Rezultati testa prikazani su Tablicom 2.

Tablica 2. Rezultati obrađeni statističkim Kruskal-Wallis testom

Ispitivane kulture	***CA IX* srednja vrijednost**	**Aritmetička sredina**	**Kruskal-Wallis test**
HeLa (2D) K	30,443	6	**p = 0,013**
HeLa (2D) R-191	29,927	9	
HeLa (2D) D7-23	30,045	7	
HeLa (3D) K	31,027	1	
HeLa (3D) R-191	30,511	4	
HeLa (3D) D7-23	29,956	8	
K562 K	30,687	2	
K562 R-191	30,473	5	
K562 D7-23	30,578	3	

Nakon provedenog Kruskal-Wallis testa provedena je detaljnija statistička analiza između kontrolnih stanica i stanica izloženih derivatima R-191 i D7-23 kako bi se utvrdila statistički značajna razlika Mann-Whitney testom.

Usporedba uzorka HeLa (2D) kontrolnih stanica (K) s ostalim uzorcima provedena je Mann-Whitney testom koji je pokazao kako se HeLa (2D) K statistički značajno razlikuje od HeLa (2D) stanica tretiranim derivatima R-191 (HeLa (2D) R-191) i D7-23 (HeLa (2 D) D7-23) prema vrijednostima ekspresije gena *CA IX*. Rezultati su testa prikazani Tablicom 3.

Tablica 3. Usporedba stanične linije HeLa 2 D kulture između kontrolnih stanica i stanica tretiranih derivatima R-191 i D7-23 HeLa 2 D kulture

Uzorak	CA IX Srednja vrijednost	Ostali uzorci	CA IX Srednja vrijednost	Mann-Whitney test
HeLa (2D) K	30,443	HeLa (2D) R-191	29,927	**p = 0,050**
		HeLa (2D) D7-23	30,045	**p = 0,050**

Usporedba uzorka HeLa (3 D) kontrolnih stanica (K) s ostalim uzorcima provedena je Mann-Whitney testom koji je pokazao kako se HeLa (3 D) K statistički značajno razlikuje od HeLa (3 D) stanica tretiranih derivatom D7-23 (HeLa (3 D) D7-23) prema vrijednostima *CA IX*. Rezultati testa prikazani su Tablicom 4.

Tablica 4. Usporedba stanične linije HeLa 3 D kulture između kontrolnih stanica i stanica tretiranih derivatima R-191 i D7-23 HeLa 2 D kulture

Uzorak	CA IX Srednja vrijednost	Ostali uzorci	CA IX Srednja vrijednost	Mann-Whitney test
HeLa (3D) K	31,027	HeLa (3D) R-191	30,511	p = 0,275
		HeLa (3D) D7-23	29,956	**p = 0,050**

Usporedba uzorka leukemijskih stanica K562 kontrolnih stanica (K) s ostalim uzorcima provedena je Mann-Whitney testom koji je pokazao kako nema statistički značajne razlike između kontrolnih stanica i tretiranih stanica. Rezultati testa su prikazani Tablicom 5.

Tablica 5. Usporedba leukemijskih stanica K562 između kontrolnih stanica i stanica tretiranih derivatima R-191 i D7-23

Uzorak	CA IX Srednja vrijednost	Ostali uzorci	CA IX Srednja vrijednost	Mann-Whitney test
K562 K	30,687	K562 R-191	30,473	p = 0,275
		K562 D7-23	30,578	p = 0,513

6. RASPRAVA

Danas je poznato kako se stanice ponašaju strukturno i funkcionalno različito, ako se uzgajaju u 2 D kulturi u odnosu na funkciju stanica u *in vivo* sustavu. Slično nativnom tumorskom tkivu, stanice uzgojene kao tumorski sferoidi, odnosno 3 D kultura, pokazuju jaki proliferacijski gradijent koji se odražava na raspodjelu kisika, hranjivih tvari i energije, kao i nakupljanje metabolita od vanjske strane prema unutrašnjoj strani sferoida. Stanice koje rastu u 2 D kulturi nemaju prirodno 3 D okruženje stanica te kao rezultat toga, testovi ispitivanja biološke aktivnosti i učinkovitosti učinjeni na 2 D kulturi ponekad ne koreliraju s rezultatima *in vivo* istraživanja. Dodatno, volumen i raspodjela stanica u 3 D staničnim kulturama bitna je značajka koja dovodi do razlika u staničnim odgovorima, jer utječe na prostornu organizaciju receptora stanične površine koji se bave interakcijom s okolnim stanicama te također uzrokuje i fizička ograničenja stanica. Ti prostorni i fizički aspekti u 3 D kulturama utječu na prijenos okolišnih signala u unutrašnjost stanica, njihovu ekspresiju gena i stanično ponašanje (16). S obzirom na navedeno, u ovom je istraživanju stanična linija karcinoma vrata maternice (HeLa) uzgojena u 2 D i 3 D kulturi. Dobiveni su rezultati ispitivanja enzimske aktivnosti enzima ugljične anhidraze CA IX i ekspresije gena CA IX u 2 D i 3 D kulturi različiti u ovisnosti o načinu uzgoja HeLa stanične kulture. U stanicama tretiranim s derivatom **R-191** u 2 D HeLa staničnoj kulturi i u stanicama tretiranim s derivatom **D7-23** u 3 D HeLa staničnoj kulturi, uočena je smanjena aktivnost enzima CA IX. U HeLa 2 D staničnoj kulturi, usporedbom kontrolnih i tretiranih HeLa (2D) R-191 i HeLa (2D) D7-23, zabilježena je statistički značajna razlika u ekspresiji gena CA IX?. Također je usporedba HeLa 3D stanične linije, između kontrolnih stanica i tretiranih stanica, pokazala kako se ekspresija gena CA IX u kontrolnim stanicama statistički značajno razlikuje od stanica izloženih derivatom **D7-23**.

Dobiveni rezultati su u skladu s nedavno objavljenim studijama koje su pokazale kako djelovanje novih derivata sulfonilurea u humanim i mišjim modelima kortikoidnog, CA IX-pozitivnog karcinoma dojke utječe na značajnu inhibiciju rasta primarnog tumora. Također, tretman karcinoma debelog crijeva, s visoko afinitetnim inhibitorom ugljične anhidraze IX rezultira smanjenim rastom tumora i daljnjom regresijom što je primijećeno kada je inhibitor korišten u kombinaciji s radioterapijom (17). Nadalje, nedavni podatci upućuju na to da su inhibitori sulfonamida pod djelovanjem ugljične anhidraze IX smanjili metastaziranje u pretkliničkim

modelima raka. U dvjema odvojenim studijama, liječenje eksperimentalnih modela metastaza raka dojke s novim sulfonilureama rezultiralo je značajnim smanjenjem metastaza pluća što upućuje na to da nova generacija selektivnih inhibitora ugljične anhidraze IX ima sposobnost djelovati kao ciljana terapija za liječenje primarnih tumora i metastaza, barem u karcinomu dojke. Važno je da je inhibicija CAIX s inhibitorima sulfonamida učinkovita u smanjenju rasta tumora i inhibiranju metastaza u pretkliničkim modelima tumora bez kompromitantnih učinaka nespecifične toksičnosti. Dobiveni rezultati, ali i rezultati brojnih studija, ukazuju na značajan potencijal inhibitora ugljične anhidraze IX u liječenju hipoksičnih i agresivnih karcinoma. Takvi će inhibitori biti korisni klinički, posebno ako se daju u kombinaciji s uobičajenom kemoterapijom. Uporabom netoksičnih ciljnih terapija u kombinaciji s uobičajenim lijekovima protiv raka ili radioterapijom, moguć je trenutni klinički model, a inhibicija ugljične anhidaze IX u ovom kontekstu može dati još bolju učinkovitost (14).

7. ZAKLJUČAK

Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. novosintetizirani derivati *N*-9 sulfonilurea R-191 i D7-23 pokazuju različito djelovanje na enzimsku aktivnost CA IX kao i na gensku ekspresiju CA IX u ovisnosti o vrsti stanične kulture, načinu uzgoja stanica i apliciranom derivatu
2. statistički testovi pokazali su da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji gena *CA IX* između kontrolnih stanica u odnosu na stanice tretirane derivatima u HeLa 2 D i HeLa 3 D staničnoj liniji
3. derivati *N*-9 sulfonilurea mogu se smatrati dobrim kandidatima za daljnja istraživanja mehanizama protutumorskog djelovanja.

8. SAŽETAK

Uvod: Prema WHO istraživanjima rak uzrokuje 20 % smrti na europskom području. S više od 3 milijuna novih slučajeva i 1,7 milijuna smrti svake godine, rak je najvažniji uzrok smrti i morbiditeta u Europi nakon kardiovaskularnih bolesti. Velika je potreba za pronalaskom antitumorskih lijekova koji će pokazivati selektivnu inhibiciju rasta tumorskih stanica. Modificirani nukleozidi i baze nukleinskih kiselina predmet su mnogih istraživanja zbog njihove potencijalne, ali i dosada klinički dokazane antitumorske i antivirusne aktivnosti. N-sulfonilni purinski analozi su derivati dviju biološki aktivnih komponenti: sulfonilciklouree i purinske baze te je poznato da derivati sulfonilciklouree pokazuju antitumorsko djelovanje.

Cilj istraživanja: Odrediti ekspresiju gena *CAIX* i katalitičku aktivnost ugljične anhidraze u netretiranim (kontrolnim) tumorskim stanicama i tumorskim stanicama tretiranim s *N*-9-sulfonilureama.

Materijali i metode: Ispitan je učinak novosintetiziranih derivata *N*-9-sulfonilurea na komercijalno dostupnim panelima humanih tumorskih stanica HeLa i K562. Promjene ekspresije *CA IX* gena u tumorskim stanicama detektirane su metodom RT- PCR, a određivanje katalitičke aktivnosti enzima ELISA „Sendvič“ testom.

Rezultati: Istraživanje je pokazalo smanjenu aktivnost enzima CA IX u stanicama tretiranim derivatom R-191 u 2 D HeLa staničnoj kulturi i u stanicama tretiranim derivatom D7-23 u 3 D HeLa staničnoj kulturi. Rezultati ekspresije gena CA IX pokazuju njegovo povećanje nakon tretmana obaju derivata u HeLa staničnim linijama 2 D i 3 D kulture.

Zaključak: Novosintetizirani derivati *N*-9 sulfonilurea R-191 i D7-23 imaju različit učinak na ekspresiju gena CA IX. Mogu se smatrati dobrim kandidatima za daljnja istraživanja mehanizama protutumorskog djelovanja.

Ključne riječi: Ugljična anhidraza, CA IX, derivati N-9 sulfonilurea, ekspresija gena, hipoksija tumora

9. SUMMARY

Introduction: According to WHO research, cancer causes 20% of deaths in Europe. With more than 3 million new cases and 1.7 million deaths each year, cancer is the most important cause of death and morbidity in Europe after cardiovascular disease. There is a need for finding anti-tumour drugs that will show selective inhibition of tumour cell growth. Modified nucleosides and nucleic acid bases have been the subject of many studies due to their potential but also clinically proven anti-tumour and antiviral activity. *N*-sulfonyl purine analogues are derivatives of two biologically active components: sulfonylcyclourea and purine base. It has been shown that derivatives of sulfonylcyclourea exhibit anti-tumour activity.

Objectives: The aim of this study was to determine CA IX gene expression and catalytic activity of carbon anhydrase in untreated (control) and treated tumour cells with *N*-9-sulfonylureas.

Material and methods: The effect of newly synthesised N-9 sulfonylurea derivatives on commercially available panels of human tumour cells HeLa and K562 was researched. Changes in *CA IX* gene expression in tumour cells were detected by real-time PCR and the determination of the catalytic activity of the ELISA "sandwich" test.

Results: The study showed inhibition of CA IX enzyme in cells treated with R-191 derivative in 2D HeLa cell culture and in cells treated with D7-23 derivative in 3D HeLa cell culture. The results of gene expression *CA IX* show its increase after the treatment with both derivatives in 2D and 3D cultures of HeLa cell lines.

Conclusion: The *N*-9 sulfonylurea derivatives R-191 and D7-23 have different effect on the expression of *CA IX*. They can be considered as good options for further research of their anti-tumour mechanisms.

Key words: carbonic anhydrase, CA IX, *N*-9 sulfonylurea derivatives, gene expression, tumour hypoxia

10. LITERATURA

1. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
2. http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cancer
3. Frost S, McKenna R. Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications. Subcellular Biochemistry; 2014.
4. Naomi Robertson, Christian Potter and Adrian L. Harris. Role of Carbonic Anhydrase IX in Human Tumor Cell Growth, Survival, and Invasion. The American Association for Cancer Research; 2004.
5. Claudiu T Supuran1 & Jean-Yves. Carbonic anhydrase IX inhibitors in cancer therapy: an update. Future Med. Chem.; 2015.
6. Thiry A, Dogne JM, Masereel B, Supuran CT. Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. Science Direct; 2008.
7. Ambriović Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Ćetković H, Herak Bosnar M, Hranilović D, i sur. Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković. Zagreb; 2004.
8. Supuran CT. Inhibition of carbonic anhydrase IX as a novel anticancer mechanism. World J Clin Oncol 2012 July 10; 3(7): 98-103.
9. Vanna Hovanky, Keyur Mehta1. Carbonic Anhydrase IX Inhibitors: Finding Potential Therapeutic Cancer Agents Through Virtual Screening. Journal of Young Investigators; 2014.
10. Lou Y, McDonald PC, Oloumi A, Chia S, Ostlund C, Ahmadi A, Kyle A, Auf dem Keller U, Leung S, Huntsman D, Clarke B, Sutherland BW, Waterhouse D, Bally M, Roskelley C, Overall CM et al. Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. Cancer Res. 2011; 71: 3364-3376.
11. Savić D, Stanković T, Lavrnja I, Podolski-Renić A, Banković J, Peković S, i sur. Purine nucleoside analogs in the therapy of cancer and neuroinflammation. Molecular inhibitors in targeted therapy; 2015.
12. Zhang J, Visser ., King K, Baldwin SA, Young JD, Cass CE. The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. Cancer Metast Rev.2007.

13. Marczi S, Glavas-Obrovac L, Belovari T, Stojković R, Ivanković S, Serić V, i ostali. Biological properties of 4-methyl-2,7-diamino-5,10-diphenyl-4,9-diazapyrenium hydrogensulfate (ADAP). Cancer Chemother Pharmacol. 2008.;62(4):595–604.
14. McDonald C. P, Winum J-Y, Supuran C, Dedhar S. Recent Developments in Targeting Carbonic Anhydrase IX for Cancer Therapeutics. Oncotarget 2012; 3: 84 – 97.
15. Martin SK, Diamond P, Gronthos S, Peet DJ, Zannettino ACW. The emerging role of hypoxia, HIF-1 and HIF-2 in multiple myeloma. Leukemia. (2011) 25, 1533–1542
16. Edmondson R, Jenkins Broglie J, Adcock AF, L.Three-Dimensional. Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. Assay Drug Dev Technol. 2014 May 1; 12(4): 207–218.
17. Dubois L, Peeters S, Lieuwes NG, Geusens N, Thiry A, Wigfield S, Carta F, McIntyre A, Scozzafava A, Dogne JM, Supuran CT, Harris AL, Masereel B, Lambin P. Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation. Radiother Oncol. 2011; 99: 424-431

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE

Ime i prezime: Anja Užanicky

Adresa: Dragonjska 16, 31000 Osijek, Republika Hrvatska

Mobitel: (+385) 911306856

E-mail: anjauzanicky@gmail.com

LinkedIn: https://hr.linkedin.com/in/anja-užanicky-43877b10a

Spol: Ž | Datum rođenja: 18. 1.1994. | Državljanstvo: Hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

- Siječanj 2015. - svibanj 2015. - laboratorijski tehničar u „Medicinsko – biokemijski laboratorij Bojčić, Vlainić Osijek“

- Svibanj 2013. - svibanj 2014. - stručno osposobljavanje bez zasnivanja radnog odnosa u „Medicinsko – biokemijski laboratorij Bojčić, Vlainić Osijek“

OBRAZOVANJE

- Listopad 2015. do danas - Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet u Osijeku
  Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

- Listopad 2012. – rujan 2015. - Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet u Osijek
  Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

- Rujan 2008. - lipanj 2012. - Medicinska škola u Osijeku,
  smjer zdravstveno – laboratorijski tehničar

OSTALO:

Jezici: Engleski, stupanj A2

Računalne vještine: Ms office (Word, Excell, Power Point)

Vozačka dozvola: položen vozački ispit - B kategorija