Utjecaj novih kinolinsko arilamidnih hibrida na rast stanica leukemija i limfoma in vitro

Petrinović, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:774489

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

Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Karla Petrinović

UTJECAJ NOVIH KINOLINSKO ARILAMIDNIH HIBRIDA NA RAST STANICA LEUKEMIJA I LIMFOMA *IN VITRO*

Završni rad

Osijek, 2018. godina

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Karla Petrinović

UTJECAJ NOVIH KINOLINSKO ARILAMIDNIH HIBRIDA NA RAST STANICA LEUKEMIJA I LIMFOMA *IN VITRO*

Završni rad

Osijek, 2018. godine

Rad je izrađen u Laboratoriju za kulturu stanica pri Medicinskom fakultetu u Osijeku.

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

Rad sadrži: 24 stranice, 8 slika i 4 grafa.

ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici prof. dr.sc. Ljubici Glavaš – Obrovac i njenoj asistentici dr.sc. Marijani Jukić na dostupnosti, savjetima i pomoći pri izradi ovog završnog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na beskrajoj pomoći, ljubavi i ohrabrivanju tijekom godina studiranja.

Zahvlaljujem se svojim prijateljima na savjetima i beskrajnoj podršci.

SADRŽAJ

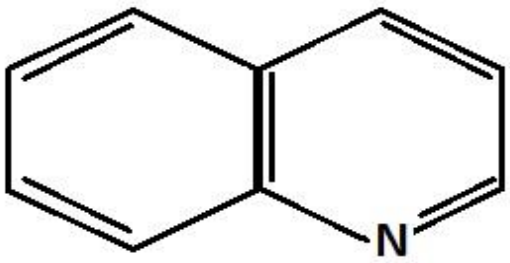
1. UVOD 1
1.1. Kinolin 1
1.2. Kinolinsko arilamidni hibridi 2
1.3. Leukemije, limfomi i stanične linije 2
1.3.1. Nastanak tumora 3
1.3.2. Leukemije 3
1.3.3. Limfomi 4
1.3.4. Kultura stanica 4
2. CILJEVI 6
3. HIPOTEZA 7
4. MATERIJALI I METODE 8
4.1. Materijali 8
4.1.1. Ispitivani hibridni derivati 8
4.1.2. Kemikalije 8
4.1.3. Stanične linije 8
4.2. Metode 9
4.2.1. Uzgoj stanica *in vitro* 9
4.2.2. Brojenje i vijabilnost stanica 9
4.2.3. MTT test 9
4.2.4. Statistika 11
5. REZULTATI 12
5.1. Stanična linija K562 12
5.2. Stanična linija CCRF – CEM 13
5.3. Stanična linija Raji 14
5.4. Stanična linija HuT 78 15
6. RASPRAVA 17
7. ZAKLJUČAK 19
9. SUMMARY 21
11. ŽIVOTOPIS 24

1. UVOD

Tumorska oboljenja jedna su od najvećih zdravstvenih problema u suvremenom svijetu(1). Premda se različite vrste lijekova, sa različitim ciljnim mjestima, koriste u liječenju, sve je veća potreba za sigurnim i učinkovitim antitumorskim lijekovima. Mnogi se heterociklični spojevi intenzivno istražuju u svrhu otkrivanja novih molekula sa potencijalnim antitumorskim djelovanjem. Jedna od klasa molekula sa potencijalnim antitumorskim djelovanjem su molekule kinolina, tj. derivati kinolina koji pokazuju vrlo širok spektar biološke aktivnosti (2).

1.1. Kinolin

Kinolin je heterociklična aromatska organska molekula kemijske formule C_9H_7N koja se sastoji od fuzioniranog benzenskog i pirimidinskog prstena (3). Makroskopski, to je bezbojna higroskopna tekućina snažnog mirisa koja stajanjem, pogotovo ako je izložena svjetlosti, postaje žuta, a kasnije i smeđa. Molekule kinolina vrlo su slabo topljive u hladnoj vodi, ali to se mijenja u vrućoj vodi u kojoj postaju vrlo dobro topljive, kao i u većini organskih otapala(3). Temperatura vrelišta mu je pri 237,1°C, gustoća 1,09 g/cm^3, molarna masa 129, 16 g/mol i pH vrijednost 4,85 (4).



Slika 1. Struktura kinolinske molekule koja se sastoji od fuzioniranog benzenskog (lijevo) i primidinskog (desno) prstena.

Kinolin, sam po sebi, ima vrlo malo primjene, ali njegovi derivati smatraju se jednom od najvažnijih skupina heterocikličnih molekula u medicinskoj kemiji zbog svojih bioloških svojstava koja im omogućuju antibakterijsko, antikonvulzijsko, protuupalno i analgezijsko

djelovanje, a sve više se istražuje i njihovo antitumorsko djelovanje jer je otkriveno kako imaju citotoksično djelovanje na stanice tumora (5).

Mehanizmi koji im omogućuju citotoksično djelovanje su: inhibicija enzima za popravak DNA (poglavito topoizomeraze II), inhibicija EGFR (stanična transmembranska tirozin-kinaza koja je prekomjerno eksprimirana u velikom broju različitih ljudskih tumora), inhibicijski efekta na tubulin-polimerazu (stanica gubi sposobnost pravilnog odvijanja M-faze staničnog ciklusa) i inhibicija timidilat sintaze (sprječava normalnu replikaciju DNA) (6). Derivati kinolina sposobni su se vezati za više veznih mjesta visokim afinitetom, što pridonosi bržem otkrivanju medicinski značajnih aktivnih derivata, a novosintetizirani derivati pokazuju širok spektar antitumorskog djelovanja na brojne stanične linije različitih vrsta karcinoma.

Primjerice, na osnovi kinazolina, koji je nastao zamjenom ugljikovog atoma kinolina dušikovim, i njegovim supstituiranim derivatima razvijeno nekoliko antitumorskih lijekova, od kojih su najpoznatiji gefitinib, lapatinib, erlotinib i afatinib (7), koji djeluju na principu vezanja njihovih molekula na vezna mjesta za EGFR (*eng. epidermal growth factor receptor*) i HER2 (*eng. human epidermal growth factor receptor 2*) te tako inhibiraju stvaranje signalnih kaskada koje potiču rast stanica karcinoma. Spomenuti lijekovi najčešće se koriste u terapiji karcinoma pluća i uznapredovalog ili metastatskog raka dojke.

1.2. Kinolinsko arilamidni hibridi

Sinteza hibridnih spojeva omogućava ekonomičniju uporabu lijekova i smanjuje rizik interakcije dvaju lijekova, a koji bi mogli utjecati na međusobnu aktivnost kombinacijom dvaju ili više lijekova ili farmakološki aktivnih tvari koji su povezani u jednu hibridnu molekulu sa višestrukom aktivnošću. Lijekovi proizvedeni od hibridnih spojeva distribuiraju se, metaboliziraju i izlučuju skupno, djeluju na više ciljnih mjesta, poboljšavaju učinkovitost i sigurnost lijekova u liječenju složenih bolesti te tako ne dolazi do kompeticije za vezanje na proteine plazme što bi moglo dovesti do interakcije lijekova (8).

1.3. Leukemije, limfomi i stanične linije

U ovom istraživanju odlučili smo ispitati citotoksični utjecaj različitih derivata kinazolinona na četiri stanične linije koje su izolirane iz stanica leukemija i limfoma. Za istraživanje učinka na leukemijske stanice korištene su stanične linije izolirane iz akutne limfocitne leukemije (ALL) i kronične mijelocitne leukemije (KML), dok su za istraživanje

učinka na limfome korištene stanične linije izolirane iz Burkittovog limfoma i limfoma T-stanica kože (podtip Sezary sindrom).

1.3.1. Nastanak tumora

Osnovni poremećaj koji dovodi do nastanka tumora je trajno poremećena proliferacija, diferencijacija i preživljenje transformiranih stanica, za koje se smatraju kako mogu biti uzrokovani genetskim čimbenicima, radijacijom, izloženosti kancerogenim kemikalijama ili virusima. Bitno je razlikovati benigne (dobroćudne) tumore, tumore koji su ograničeni na mjesto nastanka i maligne (zloćudne) tumore koji se lako šire u okolna zdrava tkiva, a mogu se putem limfnog i krvožilnog sustava raširiti po cijelom organizmu (9).

Nastanak tumora je proces koji uključuje četiri koraka – inicijaciju, promociju, progresiju i metastaziranje, a mogu nastati zbog mutacije u bilo kojoj vrsti stanice u tijelu. Nastanak je povezan sa tvarima koje se nazivaju karcinogeni, a otkrivene su istraživanjima na pokusnim životinjama i epidemiološkim istraživanjima učestalosti pojedinih vrsta tumora u određenim populacijama (9). Karcinogeni koji pridonose pojavi tumora u ljudi jer oštećuju DNA i induciraju mutacije su ultraljubičasto zračenje, kemikalije iz duhanskog dima, aflatoksin itd.

Druga skupina karcinogena ne uzrokuje mutacije, ali pridonosi nastanku tumora stimulirajući proliferaciju stanica. Ti karcinogeni nazvani su promotori tumora, a jedni od najvažnijih promotora su hormoni jer, primjerice, pretjerano korištenje estrogena znatno povećava vjerojatnost nastanka raka dojke ili maternice (9).

1.3.2. Leukemije

Leukemija je zloćudna bolest hematopoetskih organa, najčešće koštane srži, a očituje se povećanjem broja nezrelih leukocita u krvi, što dovodi do smanjene sposobnosti obrane organizma od različitih bolesti (10).

Kronična mijelocitna leukemija (KML) je vrsta leukemije koja najčešće pogađa starije osobe. To je bolest koju karakterizira maligna pretvorba pluripotentne matične stanice, a čije je glavno obilježje bolesti nakupljanje zrelih i nezrelih granulocita u perifernoj krvi, koštanoj srži, jetri i slezeni. Promijenjene stanice kod takvog oblika leukemije izgledom su obično zrele, ali ne funkcioniraju pravilno. Također, nastanak kronične mijelocitne leukemije povezan je sa kromosomskom mutacijom, tzv. Philadelphia kromosomom, kojeg karakterizira recipročna translokacija između kromosoma 9 i 22,a nađena je u više od 90% oboljelih.

Bolest karakteriziraju tri stadija u kojem se prvi stadij očituje kao sporo umnožavanje mutiranih stanica (kronična faza).
Drugi stadij predstavlja progresiju bolesti prema akutnoj leukemiji (akcelerirana faza), no ne ispunjava sve uvjete da bi se klasificirala kao akutna i s vremenom prelazi u treću fazu, tzv. blastnu krizu koja predstavlja zvršni stadij razvoja bolesti (10).

Akutna limfocitna leukemija (ALL) najčešća je bolest dječje dobi, ali joj učestalost u odrasloj populaciji raste sa starenjem. Karakterizira ju maligna pretvorba i nekontrolirano bujanje abnormalno diferenciranih dugoživućih matičnih hematopoetskih stanica, što dovodi do pojave velikog broja blasta u krvi (>20%). Stanice koje su pogođene u ovom obliku leukemije su nezreli limfociti, tj. limfoblasti koji ne sazrijevaju do svog finalnog stadija – limfocita te tako gube svoju primarnu funkciju, a to je zaštita organizma od infekcija (10).

1.3.3. Limfomi

Limfom je naziv za primarni tumor stanica limfocita, tumora koji najčešće nastaje u limfnim čvorovima i glavno obilježje mu je njihovo povećanje. Postoje različite vrste limfoma jer tumor može potjecati od limfocita različitog stupnja diferencijacije (10).

Burkittov limfom je limfom kojeg karakterizira monoklonsko bujanje B-limfocita i koji se većinom javlja u djece, a postoje različiti oblici – endemski (afrički), sporadični (ne-afrički) i limfomi vezani za imunodeficijencije. Obilježava ga kromosomska translokacija između c-myc gena na kromosomu 8 i gena za laki lanac imunoglobulina na kromosomu 14 (11). Slučajevi endemske pojave bolesti povezuju se sa Eppstein – Barr virusom, čija etiološka uloga još nije do kraja razjašnjena, a bolest se često javlja i uz AIDS. To je novotvorina najbržeg rasta u čovjeka, stoga je potreban što brži početak liječenja.

Limfom T-stanica (podtip Sezary sindrom) kože je vrlo rijedak tip non-Hodgkin limfoma koji započinje u limfocitima i napada kožu te može uzrokovati crvenilo nalik osipu i tumore kože. Može se razviti u osoba bilo koje dobi, ali najčešće je dijagnosticiran u osoba koje imaju više od 60 godina te više pogađa muškarce. Bolest se očituje kožnim lezijama koje ne zacjeljuju nakon tretiranja uobičajenim lijekovima, a na staničnoj razini pogođeni su periferni CD4 limfociti (12).

1.3.4. Kultura stanica

Pojam stanična kultura označava uzgajanje stanica (ljudskih, životinjskih) u laboratoriju pod strogo kontroliranim uvjetima, izvan njihovog prirodnog okoliša.

Kako bi se uspostavila stanična kultura, prvo je potrebno stanice od interesa izolirati iz živog tkiva primjenom mehaničkih, kemijskih ili enzimatskih postupaka razdvajanja kako bi ih se potom moglo prenijeti na podlogu sa medijem koji će ih održavati na životu.

Vrsta medija u kojemu će stanice rasti razlikuje se s obzirom na vrstu stanica koje želimo uzgojiti, ali se ti mediji općenito sastoje od pufera i seruma koji sadrži aminokiseline, ugljikohidrate, vitamine, minerale, faktore rasta, hormone itd. te se humane stanične linije uzgajaju u inkubatoru pri temperaturi od 37°C sa 95% atmosferskog zraka i 5% ugljikova (IV) dioksida (13).

Većina staničnih linija koje se koriste u istraživanju malignih tumora izolirane su iz njih samih, a kako raznolikost tumora zahtjeva i raznolikost staničnih linija za istraživanje, u današnje vrijeme postoji više od 1000 staničnih linija malignih tumora (14).

Laboratorij koji se bavi istraživanjem i uzgojem staničnih kultura mora održavati sterilne uvjete rada, a osoblje mora slijediti definirane upute i pravila za rad u takvom laboratoriju. Sterilni uvjeti rada u laboratoriju za stanične kulture održavaju se svakodnevnim čišćenjem i sterilizacijom, čime se sprječava kontaminacija stanica mikroorganizmima. Što se tiče zaštite pri radu, ona se postiže nošenjem odgovarajuće zaštitne laboratorijske odjeće, a rad sa kulturama obavlja se u kabinetu („hood-u“) sa sterilnom opremom (13).



Slika 2. Prikaz kabineta za sterilni rad sa staničnim kulturama

2. CILJEVI

1. Ispitati učinak kinolinsko arilamidnih hibrida na smanjeni rast stanica leukemija i lifoma u *in vitro* uvjetima.

2. Ustanoviti povezanost između strukture i koncentracije novih spojeva sa inhibicijom staničnog rasta.

3. Definirati kinolinsko arilamidni hibrid koji ima najveću učinkovitost na inhibicijski rast testiranih stanica.

3. HIPOTEZA

Skupina kinolinsko arilamidnih hibrida u određenim koncentracijama pokazuje citotoksično djelovanje na stanice leukemija i limfoma koje rastu *in vitro*.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Ispitivani hibridni derivati

Kinolinsko arilamidni hibridi sintetizirani su na Zavodu za primjenjenu kemiju i ekologiju pri Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku. Za potrebe *in vitro* eksperimenata kinolinsko arilamidni hibridi otopljeni su u DMSO-u kao koncentrirane $1 \cdot 10^{-2}$ mol / dm^3 (M) otopine. Razrjeđenja hibridnih derivata pripremljena su u mediju za uzgoj stanica neposredno prije aplikacije na stanice te su nanesena na stanice u koncentracijama od $1 \cdot 10^{-4}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M i $1 \cdot 10^{-6}$ M.

4.1.2. Kemikalije

U ovom istraživanju, od kemikalija su korišteni:

- kinazolinsko arilamidni hibridi
- RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medij)
- FBS (fetalni goveđi serum)
- glutamin
- natrijev piruvat
- HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonskakiselina)
- MTT (3,(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5 difeniltetrazolium bromid)
- DMSO (dimetil sulfoksid)
- SDS (natrij dodecil sulfat)
- HCl (klorovodična kisleina)
- Tripan plavilo.4%, sterilno filtriran, Lonza (Basel, Švicarska)

4.1.3. Stanične linije

Za izradu završnog rada korištene su komercijalno dostupne humane stanične linije za koje nije bilo potrebno ishoditi dozvolu Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku, a stanične linije koje su korištene u radu su četiri stanične linije leukemija i limfoma humanog podrijetla:

- K562 (kronična mijeloidna leukemija)
- CCRF – CEM (akutna limfoblastična leukemija)
- Raji (Burkittov limfom)

- HuT 78 (T-limfom)

4.2. Metode

4.2.1. Uzgoj stanica *in vitro*

Stanične linije leukemija i limfoma kultivirane su u RPMI 1640 mediju sa 10% FBS-om, 2mM glutamina, 1mM natrijevog piruvata i 10 mM HEPES-om, te su inkubirane u CO_2 inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, ThermoFisher Scientific, Walthan, MA, USA) pri temperaturi od 37^{0}C i 5% CO_2 uz visoku vlažnost.

4.2.2. Brojenje i vijabilnost stanica

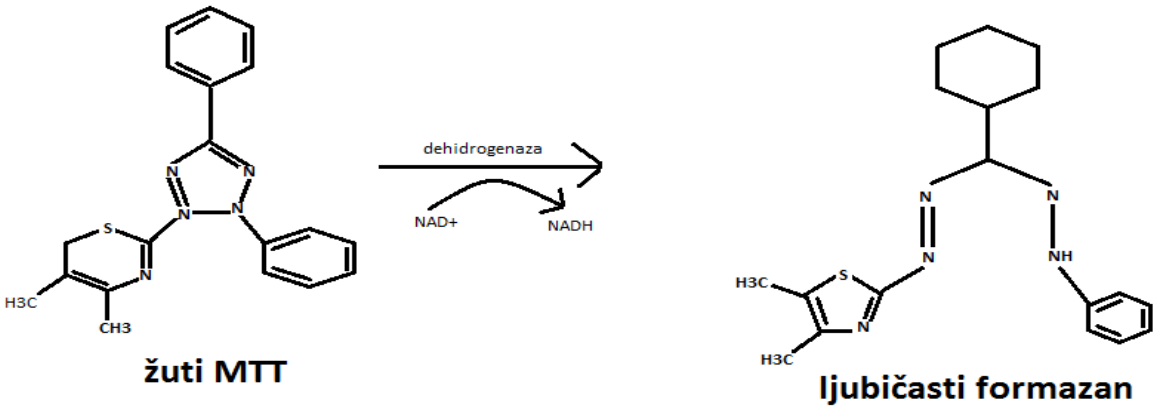
Kako bi se odredio broj stanica korištena je Bürker – Türkova komorica, a proces je započet oduzimanjem 50 μL stanične suspenzije i prenošenjem u jažice. Potom je u jažice dodano 100 μL tripan plavila te je broj stanica određen brojanjem u komorici pod mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka). Mrtve stanice vide se kao plavo obojene jer im je membrana uništena pa boja lako ulazi u njih.

Broj vijabilnih stanica određen je formulom $N/4 \cdot 3 = x \cdot 10^4$ stanica/cm^3, gdje je:

- N = broj stanica
- 4 = broj polja u komorici
- 3 = faktor razrijeđena.

4.2.3. MTT test

Citotoksičnost kinolinsko arilamidnih derivata na stanične linije leukemije i limfoma ispitana je korištenjem MTT testa. MTT (3,(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5 difeniltetrazolijev bromid) test je kolorimetrijska metoda kojom se mjeri aktivnost dehidrogenaza u živim stanicama. Test se temelji na sposobnosti pretvorbe tetrazolnog prstena u crveno-ljubičasto obojani formazan djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza u živim stanicama. Formazanski precipitati otapaju se u 10%-tnom SDS-u s HCL-u. Intenzitet obojenja proporcionalan je postotku preživjelih tumorskih stanica (15, 16).

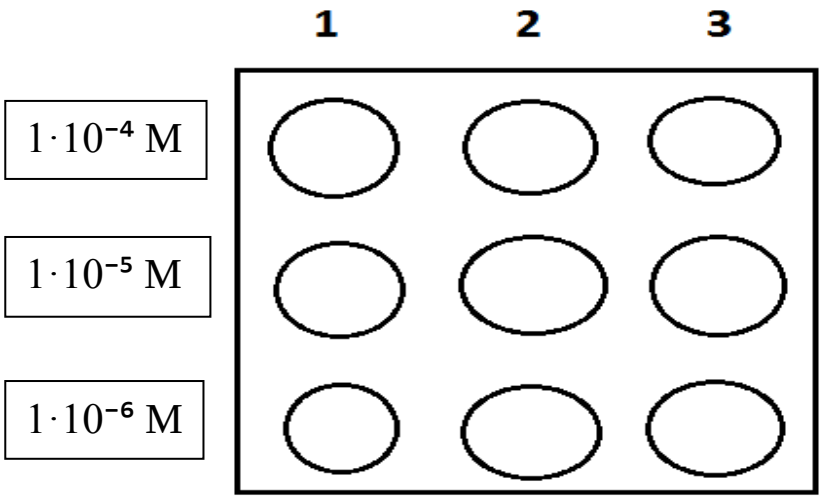


Slika 3. Kemijski princip citotoksičnosti MTT testa

Sam postupak provođenja MTT testa započet je nasađivanjem prije navedenih staničnih linija u mikrotitarsku ploču sa 96 jažica te je svaka jažica sadržavala 90 µL stanične suspenzije sa 10 µL kinolinsko arilamidnih hibrida, a stanice su bile nasađene u koncentraciji od $1x10^5$ st/mL. Stanice su isti dan tretirane s derivatima u koncentraciji od $1 \cdot 10^{-4}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$M i $1 \cdot 10^{-6}$M. Potom su mikrotitarske pločice s tretiranim stanicama pohranjene u inkubator (37℃, 5 % CO_2) na 72 h. Po završetku vremena inkubacije na stanice je dodan MTT u koncentraciji od 5 mg/ml, te su ploče vraćene u inkubator kroz slijedeća 4 h.

Formirani kristalići otopljeni su dodatkom 10 % -tnog SDS-a u 0,01 M HCl-u preko noći u inkubatoru. Rezultati apsorbancija, kontrola i blanka očitani su na čitaču mikroploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) pri valnoj duljini od 595 nm.

Računskom formulom $\% = \frac{(A_{tretman} - A_{blank})}{(A_{kontrola} - A_{blank})} \times 100$ određen je udio preživljenja stanica koji je prikazan grafovima za svaku pojedinu staničnu liniju.



Slika 4. Princip izvođenja MTT testa u trplikatu za tri različite koncentracije

4.2.4. Statistika

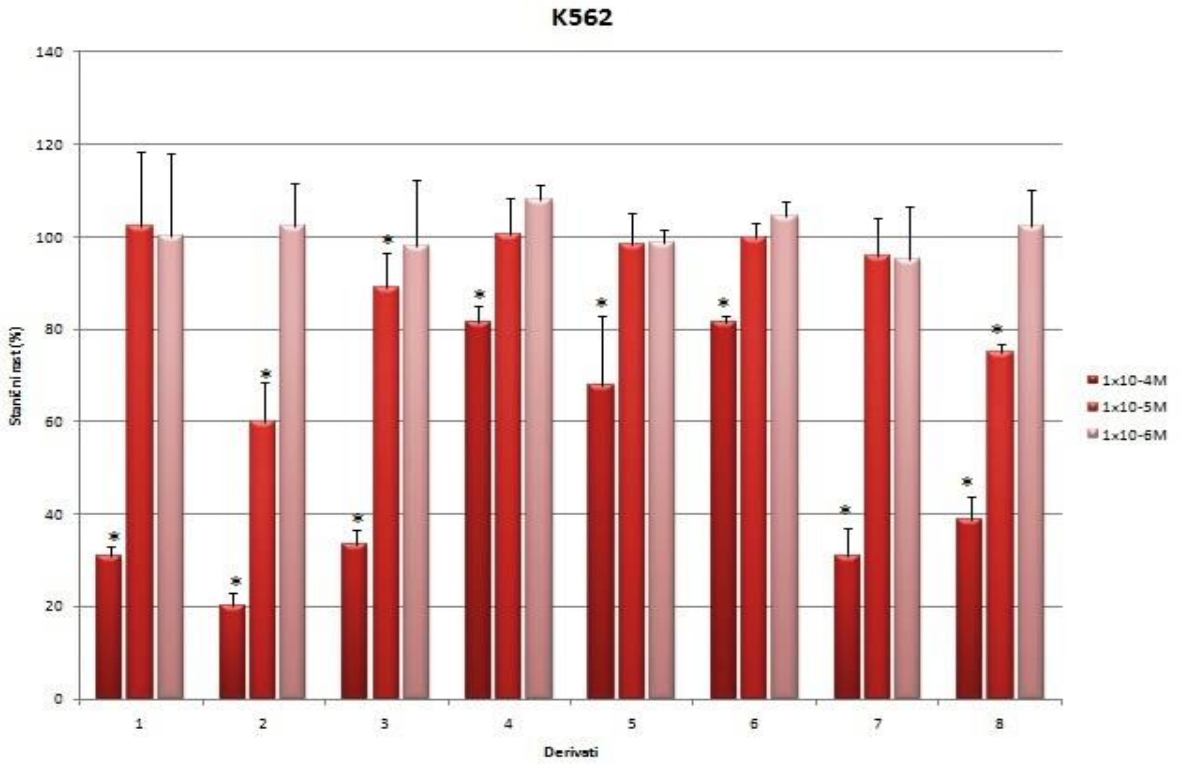
Dobiveni podaci su prikazani kao aritmetička sredina (X) i standardna devijacija(±SD) za tri neovisna mjerenja. Normalnost raspodjele podataka dobivenih testovima citotoksičnosti određena je Kolmogorov – Smirnov testom te je primjenjen neparametrijski Mann – Whitney test uz statističku značajnost $p < 0.05$, a analiza podataka obavljena je pomoću statističkog programa STATISTICA 11.0 za Windows operativne sustave.

5. REZULTATI

Korištenjem MTT testa ispitana je citotoksičnost osam kinazolinsko arilamidnih derivata (u daljnjem tekstu derivata) u tri različite koncentracije ($1 \cdot 10^{-4}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M i $1 \cdot 10^{-6}$ M) u triplikatu na četiri stanične linije leukemija i limfoma - K562 (kronična mijeloidna leukemija), CCRF – CEM (akutna limfoblastična leukemija), Raji (Burkittov limfom) i HuT 78 (T-limfom). Rezultati su prikazani kao postotak staničnog rasta navedenih staničnih linija u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

5.1. Stanična linija K562

Djelovanje derivata 2 na K562 stanice odražava se inhibicijski na stanični rast od 80% pri koncentraciji od $1 \cdot 10^{-4}$ M, što je ujedno i najjače djelovanje u odnosu na ostale testirane derivate. Pri istoj koncentraciji derivati 1, 3, 7 i 8 inhibiraju stanični rast za više od 50%. Inhibicija staničnog rasta za 20% ostvarena je djelovanjem derivata 4, 5 i 6 pri najvišoj apliciranoj koncentraciji. Aktivnost pri koncentraciji od $1 \cdot 10^{-5}$ M derivat 2 ostvaruje inhibicijom staničnog rasta od oko 40%, kao i derivat 8 sa inhibicijom rasta višom od 20%. Ostali testirani derivati ne pokazuju inhibicijsko djelovanje na rast K562 stanica pri istoj koncentraciji. K562 stanice pokazale su se neosjetljive prema najniže apliciranoj koncentraciji od $1 \cdot 10^{-6}$ M derivata gdje je stanični rast viši od 100% (slika 1).

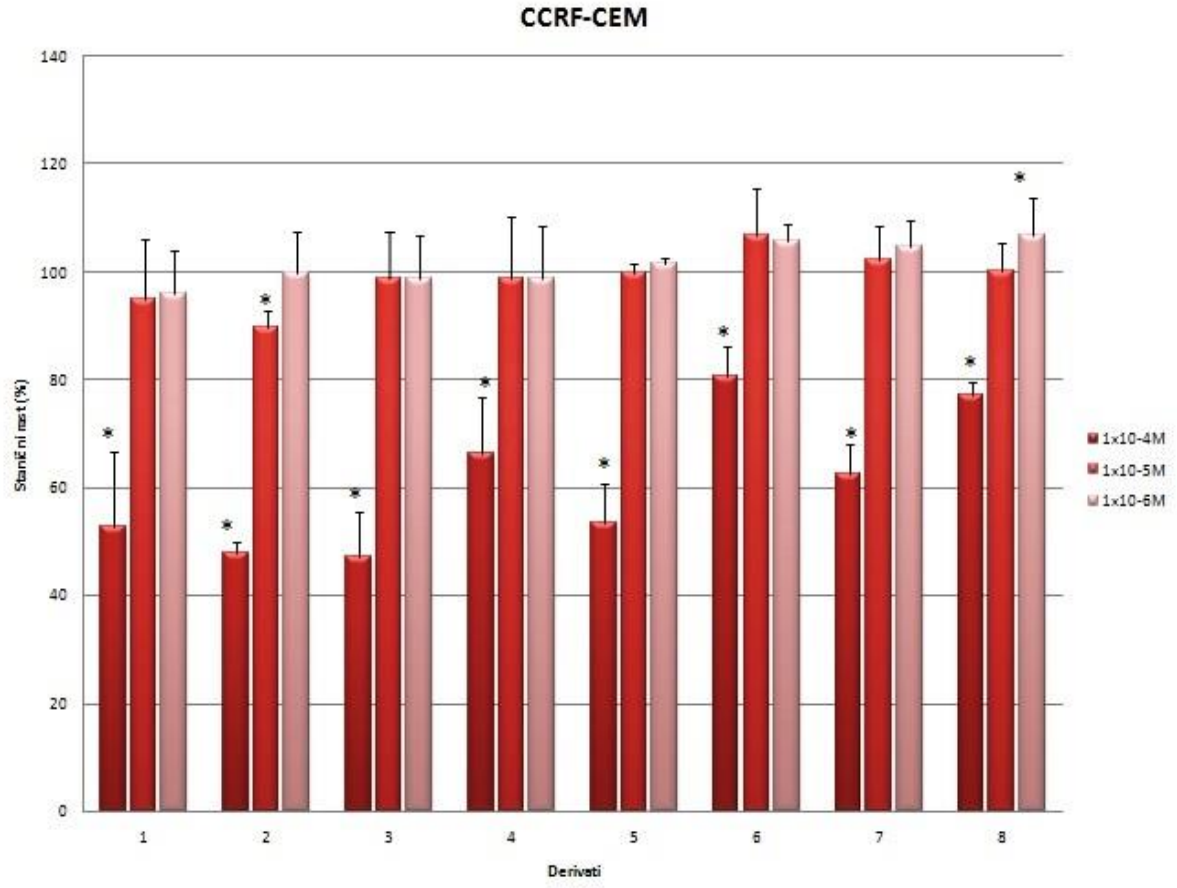


Slika 5. Citotoksičan učinak kinazolinsko arilamidnih derivata na K562 staničnu liniju. K562 stanice izložene su djelovanju derivata kroz 72h pri koncentraciji od 1x10 $^{-4}$ M, 1x10^{-5} M i 1x10^{-6} M. Citotoksičan učinak određen je MTT testom u tri nezavisna vremenska ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je p< 0,05(*) u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

5.2. Stanična linija CCRF – CEM

Derivati 2 i 3 pokazali su najjači inhibicijski učinak, od oko 50%, na CCRF – CEM stanice pri najvećoj apliciranoj koncentraciji od $1 \cdot 10^{-4}$ M, dok derivati 1 i 5 pokazuju manje inhibicijsko djelovanje – oko 40%, najslabije djelovanje pri najvećoj koncentraciji pokazuju derivati 6 i 8 sa inhibicijom staničnog rasta od 20%.

Pri koncentraciji od $1 \cdot 10^{-5}$ M derivat 2 pokazuje 11%-tni inhibicijski učinak. Derivati 1, 3, 4 i 5 pokazuju inhibicijski učinak na stanični rast manji od 5%, a derivati 6, 7 i 8 ne pokazuju inhibicijski učinak na rast stanica. CCRF – CEM stanice pokazale su se neosjetljive prema najniže apliciranoj koncentraciji od $1 \cdot 10^{-6}$ M gdje je stanični rast veći od 100% (slika 6).



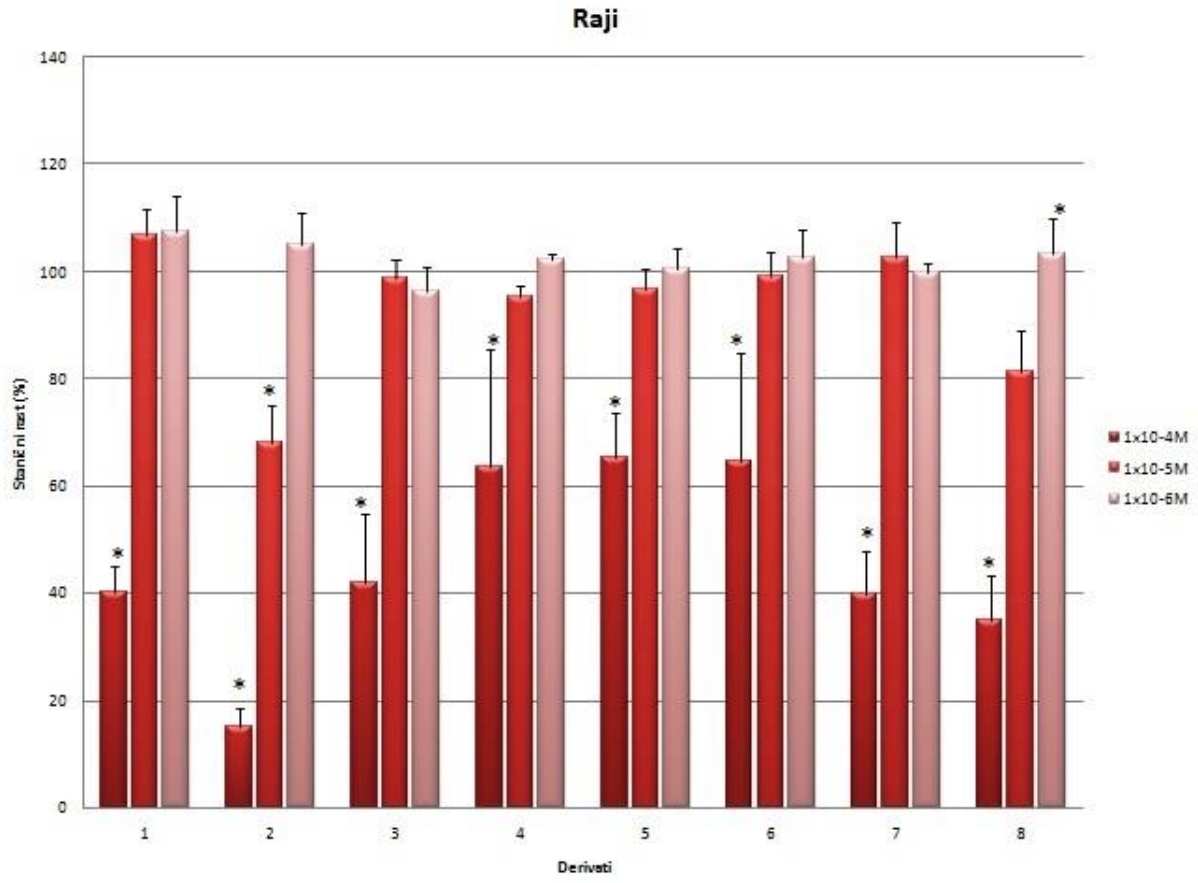
Slika 6. Citotoksičan učinak kinazolinsko arilamidnih derivata na CCRF – CEM staničnu liniju. CCRF – CEM stanice izložene su djelovanju derivata kroz 72h pri koncentraciji od $1 \cdot 10^{-4}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M i $1 \cdot 10^{-6}$ M. Citotoksičan učinak određen je MTT testom u tri nezavisna vremenska ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05$(*) u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

5.3. Stanična linija Raji

Derivat 2 pokazao je najjače inhibicijsko djelovanje na staničnu liniju Raji u koncentraciji od $1 \cdot 10^{-4}$ M gdje je inhibirao 85% staničnog rasta. Pri istoj koncentraciji derivati 1, 3, 7 i 8 pokazuju inhibicijsko djelovanje od 60% staničnog rasta, dok derivati 4, 5 i 6 pokazuju inhibiciju na 35% rasta.

Inhibicijsku aktivnost pri koncentraciji od $1 \cdot 10^{-5}$ M pokazao je derivat 2 sa 32% i derivat 8 sa 19% inhibicije, a ostali derivati nisu pokazali značajan inhibicijski učinak.

Spojevi aplicirani u koncentraciji od $1 \cdot 10^{-6}$ M nisu imali inhibicijski učinak i sve tretirane stanice pokazale su stanični rast veći od 100%.



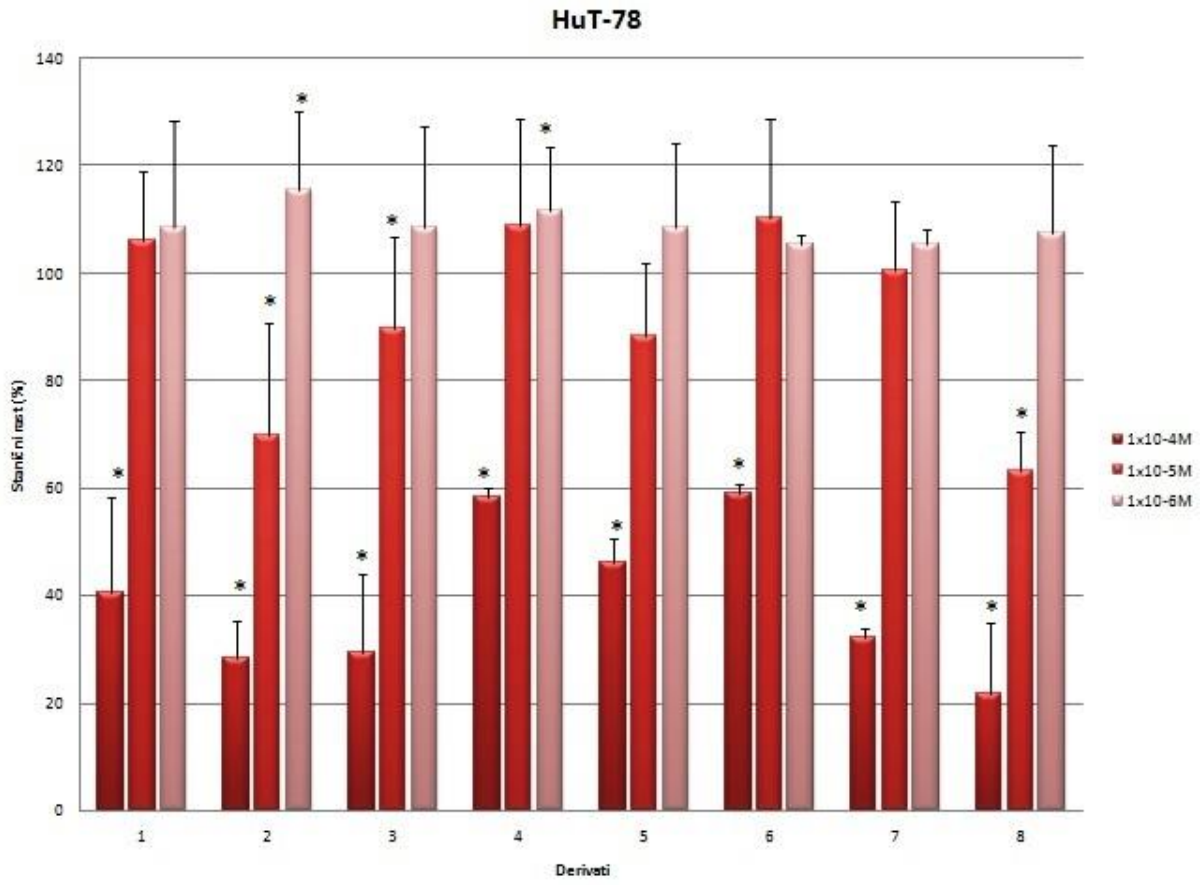
Slika 7. Citotoksičan učinak kinazolinsko arilamidnih derivata na Raji staničnu liniju. Raji stanice izložene su djelovanju derivata kroz 72h pri koncentraciji od $1 \cdot 10^{-4}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M i $1 \cdot 10^{-6}$ M. Citotoksičan učinak određen je MTT testom u tri nezavisna vremenska ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05$(*) u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

5.4. Stanična linija HuT 78

Najjače inhibicijsko djelovanje na rast stanične linije HuT 78 pri koncentraciji od $1 \cdot 10^{-4}$ M ostvario je derivat 8 sa 80%-tnom inhibicijom. Derivati 2, 3 i 7 pri istoj koncentraciji pokazali su inhibicijski učinak od 70% na stanični rast, a derivati 1, 4, 5 i 6 pokazali su inhibicijski učinak od 40%.

Pri koncentraciji od $1 \cdot 10^{-5}$ M, derivati 2 i 8 pokazali su inhibicijski učinak od 30%, dok su pri istoj koncentraciji derivati 3 i 5 pokazali 10%-tnu, a ostali derivati nisu pokazali inhibiciju na stanični rast, gdje on iznosi više od 100%.

Kao i kod ostalih staničnih linija, nije uočen inhibicijski učinak derivata pri koncentraciji od $1 \cdot 10^{-6}$ M i sve stanice pokazuju rast veći od 100%.



Slika 8. Citotoksičan učinak kinazolinsko arilamidnih derivata na HuT 78 staničnu liniju. HuT 78 stanice izložene su djelovanju derivata kroz 72h pri koncentraciji od $1 \cdot 10^{-4}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M i $1 \cdot 10^{-6}$ M. Citotoksičan učinak određen je MTT testom u tri nezavisna vremenska ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05$(*) u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

6. RASPRAVA

Tumorska oboljenja predstavljaju jedan od najvećih i najozbiljnijih problema suvremenog svijeta koja svojom brzom proliferacijom i otpornošću uzrokuju vrlo velike i ozbiljne zdravstvene probleme u vrlo kratkom vremenu od pojave u organizmu. Stanica raka posjeduju veliku mogućnost preživljavanja i mutacije što dovodi do postojanja raznih vrsta karcinoma i, premda su do danas razvijeni brojni tretmani raka (kirurško liječenje, kemoterapija i radioterapija), niti jedna od njih nije se pokazala dovoljno učinkovitom (17).

Liječenje kemoterapijom je najčešći oblik terapije tumorskih oboljenja, ali veliki problem predstavlja to što kemoterapeutici ne razlikuju normalne, zdrave stanice od onih zahvaćenih karcinomom. Takvi lijekovi, uz uništavanje stanica raka, uništavaju i zdrave stanice što dovodi do toga da cijeli organizam pati, stoga se posljednjih desetljeća intenzivno istražuju razni spojevi sa mogućim protutumorskim djelovanjem koji bi imali nisku toksičnost na zdrave stanice i minimalne nuspojave(17).

Kinolinsko arilamidni hibridi predstavljaju skupinu mogućih protutumorskih lijekova jer se benzenski i pirimidinski prsten koji čine kinolin lako modificiraju i daju veliki broj različitih spojeva (3). Istraživanja su pokazala kako kinolinski derivati imaju vrlo širok spektar bioloških aktivnosti, kao što su antikonvulzijsko, antibakterijsko, protuupalno te antitumorsko djelovanje kao jedno od najvažnijih.

U prijašnjim istraživanjima citotoksičnog učinka kinolinskih derivata također je korišten MTT test te su ispitivani dvostruko supstituirani derivati pokazali dobar inhibicijski učinak na tumorske stanične linije solidnih tumora (dojke, kolona, središnjeg živčanog sustava), ali i na leukemijsku staničnu liniju HL – 60 (akutna mijelocitna leukemija). CCRF-CEM stanična linija pokazuje najmanju osjetljivost sa staničnim rastom većim od 50% pri apliciranoj najvišoj koncentraciji testnih kinolinskoarilamidni hibrida. Dok su se K562 leukemijske stanice pokazale izuzetno osjetljive pri koncentraciji od $1x10^{-4}$ M za derivate 1,2,3,7 i 8.

Ispitano je i djelovanje raznih trostruko supstituiranih kinolinskih derivata na stanične linije HL – 60 i U937 (monocitna leukemija) te su pokazali citotoksičnost pri primjeni na stanice u koncentraciji 100 – 200 μg/mL (6).

Općenito, na tumorskim staničnim linijama solidnih tumora (npr. MCF7 – tumor dojke, PC-3 – tumor prostate, HTC-8 – tumor kolona itd.) izvršena su brojna istraživanja o djelovanju kinolinskih hibrida kao potencijalnih antitumorskih lijekova, gdje su pokazala obećavajuće rezultate, dok je vrlo malo istraživanja provedeno na leukemijskim stanicama, a još manje na limfomskim, tako da se o citotoksičnim učincima na njihove stanične linije ne zna mnogo.

Rezultati dobiveni ovimisraživanjem na Raji i HuT 78 stanice limfoma pokazuje inhibiciju staničnog rasta za više od 70% djelovanjem derivata 2.

Kinolinsko arilamidni hibridi koji su pokazali zadovoljavajuće citotoksično djelovanje mogli bi biti učinkoviti antitumorski lijekovi, ali su potrebna opsežna daljnja istraživanja kako bi se dodatno istražila i utvrdila njihova terapeutska svojstva. Istraživanje i razvijanje lijekova koji djeluju na specifične metaboličke, signalne i enzimatske putove moglo bi dovesti do pronalaska revolucionarne nove antitumorske terapije koja bi bila nisko toksična za zdrave stanice organizma i ne bi izazivala štetne nuspojave ionako bolesnom organizmu.

7. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog istraživanja možemo donijeti sljedeće zaključke:

- svi derivati su pokazali inhibicijski učinak na ispitivane stanične linije pri koncentraciji od $1 \cdot 10^{-4}$ M
- najjači inhibicijski učinak pokazali su derivati 2, 3 i 8
- najveću osjetljivost na derivate pokazala je stanična linija HuT 78
- najmanju inhibiciju pri svim koncentracijama pokazali su derivati 4, 5 i 6
- sve stanične linije pokazale su otpornost na korištene derivate kada su bili aplicirani u koncentraciji od $1 \cdot 10^{-6}$ M

8. SAŽETAK

Uvod: Kinolin je heterociklični organski spoj koji se sastoji od fuzioniranog benzenskog i pirimidinskog prstena koji imaju veliku sposobnost modifikacije. Upravo zbog te sposobnosti moguće je lako u laboratoriju sintetizirati različite vrste kinolinskih derivata koji su tijekom istraživanja pokazali korisna antitumorska svojstva. Derivati kinolina vrlo su atraktivni spojevi za istraživanja jer su pokazali širok spektar različitih bioloških aktivnosti, kako antitumorsku, tako i antibakterijsku, antikonvulzijsku, analgezijsku i protuupalnu.

Cilj: Ispitati citotoksičnost osam različitih kinolinsko arilamidnih hibrida na četirima humanim staničnim linijama leukemija i limfoma (K562, CCRF – CEM, Raji i HuT 78).

Materijali i metode: Kinolinsko arilamidni derivati sintetizirani su na Zavodu za primijenjenu kemiju i ekologiju pri Prehrambeno – tehnološkom fakultetu u Osijeku, a stanične linije su komercijalno kupljene. Derivati su otopljeni u DMSO-u kao koncentrirane $1 \cdot 10^{-2}$ M otopine, dok su razrjeđenja pripremljena neposredno prije aplikacije na stanice te nanesena u koncentracijama od $1 \cdot 10^{-4}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M i $1 \cdot 10^{-6}$ M. Citotoksičnost primijenjenih spojeva utvrđena je korištenjem MTT testa te očitanjem apsorbancija na spektrofotometru.

Rezultati: Uočeno je kako koncentracije derivata od $1 \cdot 10^{-5}$ M te pogotovo od $1 \cdot 10^{-6}$ M kod svih staničnih linija ne uzrokuju značajan inhibicijski učinak. Značajan inhibicijski učinak pokazali su svi derivati aplicirani u koncentraciji od $1 \cdot 10^{-4}$ M, ali je učinak bio najbolji pri primjeni derivata 2 i 8. Najveću osjetljivost na primijenjene derivate pokazala je stanična linija HuT 78.

Zaključak: Kinolinsko arilamidni hibridi smanjuju rast tumorskih stanica leukemija i limfoma, ali postotak inhibicije ovisi o koncentraciji spoja i vrsti stanične linije.

Ključne riječi: kinolin, kinolisko arilamidni hibridi, citotoksičnost, inhibicija, stanične linije

9. SUMMARY

Introduction: Quinoline is a heterocyclic organic compound consisting of a fused benzene and pyrimidine ring which have a high modification ability. Precisely because of this ability it is possible to synthesize various types of quinoline derivatives which have shown useful anti-tumor properties during the study. Quinoline derivatives are very attractive compounds for research as they have shown a wide spectrum of various biological activities, both antitumor and antibacterial, anticonvulsant, analgesic and anti-inflammatory.

Objective: To investigate the cytotoxicity of eight different quinoline arylamidine hybrids in four human cell lines of leukemia and lymphoma (K562, CCRF - CEM, Raji and HuT - 78).

Materials and Methods: Quinoline arylamidine derivatives were synthesized at the Institute of Applied Chemistry and Ecology at the Faculty of Food Technology in Osijek, and the cell lines were commercially purchased. The derivatives were dissolved in DMSO as a concentrated $1 \cdot 10^{-2}$ M solution prior to use in the study, while the dilutions were prepared immediately prior to application to the cells and applied at concentrations of $1 \cdot 10^{-4}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M and $1 \cdot 10^{-6}$ M. Cell culture was carried out in an incubator at 5% of carbon (IV) dioxide, at a temperature of 37°C and with high humidity. The cytotoxicity of the applied compounds was determined using the MTT test and by reading the absorbance on the spectrophotometer.

Results: Concentrations of $1 \cdot 10^{-5}$ M and of $1 \cdot 10^{-6}$ M in all cell lines are observed to cause no significant inhibitory effect. Significant inhibitory effect on the investigated cell lines showed all derivatives applied at a concentration of $1 \cdot 10^{-4}$ M but the effect was the best when using derivatives 2 and 8. Generally, the highest susceptibility to the derivatized derivatives was demonstrated by the HuT-78 cell line.

Conclusion: Quinoline arylamidine hybrids reduce the growth of tumor cells of leukemia and lymphoma, but the percentage of inhibition depends on the concentration of the compound and the cell line type.

Keywords: quinoline, quinoline arylamidine hybrids, cytotoxicity, inhibition, cell lines

10. LITERATURA

(1) El-Azab A, Al-Omar M, Abdel-Aziz A, Abdel-Aziz N, El-Sayed M, Aleisa A, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel quinazoline derivatives as potential antitumor agents: Molecular docking study. Eur J Med Chem. 2010;45:4188–4198. [PubMed]

(2) Mhaske SB, Argade NP. The chemistry of recently isolated naturally occurring quinazolinone alkaloids. Tetrahedron. 2006;62:9787–9826.

(3) Kemijska svojstva kinolinske molekule: http://www.chemicalland21.com/industrialchem/organic/QUINOLINE.htm

(4) https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/quinoline#section=Computed-Properties

(5) Marella A., Prakash O., Saha R., Ali M.R., Quinoline: A versatile heterocyclic, Saudi Pharmaceutical Journal, Volume 21, Issue 1, January 2013, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Jamia Hamdard (Hamdard University), New Delhi 110 062, India, 1-12

(6) Jaina S., Chandra V., Jain PK, Pathak K., Pathak D., Vaidyab A., Comprehensive review on current developments of quinoline-based anticancer agents, Arabian journal of chemistry, Department of Pharmaceutical Sciences, Dr. H.S. Gour University, Sagar, M.P. 470002, India

(7) Xiao-Fei S,.Morris-Natschke SL,Ying-Qian L, Guo X ,Xiao-Shan X, Masuo G, Jun-Cai L, Guan-Zhou Y, Kuo-Hsiung L, Biologically active quinoline and quinazoline alkaloids, School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou, P.R.China, MedResRev2018;38:775–828

(8) Krstulović L., Stolić I., Jukić M., Opačak-Bernardi T., Starčević K., Bajić M., Glavaš – Obrovac Lj., New quinoline – arylamidine hybrids: Synthesis, DNA/RNA binding and antitumor activity, Europena Journal of Medicinal Chemistry 137 (2017), 196 – 210

(9) Cooper GM, Hausman RE, Stanica – molekularni pristup, 4. izdanje, Medicinska naklada Zagreb, 2004., 725 – 45

(10) Duletić – Načinković A., Valiković T., Dvornik Š., Hematologija za prvostupnike medicinsko- laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Rijeka, 1.izdanje, 2011., 72 - 73, 86, 112

(11) Molyneux E, Rochford R, Griffin B, Newton R, Jackson G, Menon G, Harrison C, Israels T, Bailey S (April 2012). "Burkitt's lymphoma". The Lancet. 379 (9822): 1234–1244

(12) Hoffman, Ronald (2009). Hematology: basic principles and practice, 5th edition, Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier. pp. 1304–1305

(13) Limfom T- stanica (podtip Sezary sindrom): https://www.lymphoma.org/aboutlymphoma/nhl/tcell/

(14) Hanahan, D. i Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, 144(5), 646–674.

(15) Freshny RI, 1987., Culture of animalia cells, a manual of basic tehnicque, New York, Liss Inc 796 pp

(16) Čvorišćec D, Čepelak I., Štrausova medicinska biokemija, 3. izdanje, Zagreb, 2009., 518 – 519

(17) Hiddemann W, MD, PhD, Handbook of acute leukemia, Department of Medicine III University of Munich Munich Germany, 2016, 72-74, 77-79

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Karla Petrinović

Datum i mjesto rođenja:

4. veljače 1996., Požega

Obrazovanje:

- 2014. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku
- 2010. – 2014. Opća gimnazija Požega
- 2002. – 2010. Osnovna škola „Ivan Goran Kovačić“ u Velikoj