Ispitivanje citotoksičnosti derivata itakonske kiseline kao potencijalnih citostatika na HepG2 staničnoj liniji

Horvat, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:819739

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ivana Horvat

Ispitivanje citotoksičnosti derivata itakonske kiseline kao potencijalnih citostatika na HepG2 staničnoj liniji

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj je diplomski rad prijavljen na kolegiju Biokemija, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko–biokemijskog fakulteta, a izrađen u Centru za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić i suvoditeljstvom dr. sc. Marija Matijašića.

ZAHVALA

Ponajprije se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Karmeli Barišić, na brojnim stručnim savjetima i potpori tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem i suvoditelju dr. sc. Mariju Matijašiću na velikodušnoj pomoći, stručnim savjetima i strpljenju pri provođenju eksperimentalnog dijela rada.

Također zahvaljujem prof. dr. sc. Branki Zorc te suradnicama Ivani Perković i Maji Beus koje su nam ustupile sintetizirane spojeve.

Najviše se zahvaljujem obitelji i prijateljima jer bez njih ništa od ovog ne bi bilo moguće. Hvala im na strpljenju, podršci i razumijevanju koje mi pružaju sve ove godine.

SADRŽAJ

1. UVOD..... 1
1.1. Razvoj lijeka..... 1
1.1.1. *in silico* ispitivanja..... 1
1.1.2. *in vitro* ispitivanja..... 3
1.1.3. *in vivo* ispitivanja..... 4
1.1.4. klinička ispitivanja..... 6
1.2. Citotoksičnost..... 8
1.3. Tumori..... 12
1.4. Kemoterapija..... 12

2. OBRAZLOŽENJE TEME..... 14

3. MATERIJALI I METODE..... 15
3.1. HepG2 stanična linija..... 18
3.2. Uzgoj i presađivanje stanica..... 19
3.3. Brojanje stanica..... 19
3.4. Test citotoksične aktivnosti..... 21

4. REZULTATI..... 22

5. RASPRAVA..... 32

6. ZAKLJUČCI..... 34

7. LITERATURA..... 35

8. SAŽETAK/SUMMARY..... 41

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

POPIS KRATICA

2D dvodimenzijsko

3D trodimenzijsko

AMP adenozin-monofosfat

ATP adenozin-trifosfat

CQ klorokin-difosfat

DAPI 4',6-diamino-2-fenilindol

DMEM (engl. Dulbecco's Modifield Eagle Medium) medij

DMF dimetilformamid

DMSO dimetil-sulfoksid

DNA deoksiribonukleinska kiselina

dUTP deoksiuridin-trifosfat

EDTA etilendiaminetetraoctena kiselina

ELISA (engl. Enzyme-Linked Immunosorbrnt Assay) enzimski povezani imunosorpcijski test

FBS (engl. Fetal Bovine Serum) fetalni goveđi serum

FDA fluorescein diacetat

HALMED Agencija za lijekove i medicinske proizvode

HTS (engl. high-throughput screening) visokoprotočna pretraživanja

HZJZ Hrvatski zavod za javno zdravstvo

LDH laktat-dehidrogenaza

M mol/dm^3

MIC (engl. minimal inhibitory concentration) minimalna inhibitorna koncentracija

MQ meflokin-hidroklorid

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid)

NADH nikotinamid adenin dinukleotid

NADPH nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

PBS (engl. phosphate-buffered saline) fosfatni pufer

PI propidijev jodid

PPi pirofosfat

RNA ribonukleinska kiselina

SCGE (engl. single cell gel electrophoresis) gel elektroforeza jedne stanice

SYBR Synergy Brands

TdT terminalna deoksinukleotidil-transferaza

TEA trietilamin

TRIS tris-(hidroksimetil)-aminometan

TUNEL (engl. terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling)

1. UVOD

1.1. Razvoj lijeka

Prvi korak u razvoju novoga lijeka jest odabir bolesti. Najviše se razvijaju lijekovi za kronične bolesti poput migrene, depresije, čira na želucu, debljine, raka i kardiovaskularnih bolesti. Sam proces je dugotrajan, može trajati dulje od 15 godina, što ovisi o raznim čimbenicima koje treba imati na umu kod ispitivanja funkcionalnosti lijeka. Nakon odabira bolesti, bitno je identificirati prikladne mete lijeka (Katzung, 2018.). To su najčešće geni, RNA, različiti funkcionalni proteini npr. receptori, enzimi, transportni proteini. Da bi se mogla odabrati idealna meta, potrebno je poznavati patologiju i patofiziologiju odabrane bolesti, odnosno molekularne mehanizme procesa koji se zbivaju u pozadini. Poznavanjem toga lakše se može zaključiti je li bolje npr. razvijati agoniste ili antagoniste određenog receptora ili primjerice inhibitore određenih enzima. Razvojem genomike i proteomike povećao se broj poznatih meta što znanstvenicima predstavlja izazov za otkrivanje spojeva koji stupaju u interakciju s njima kako bi se odredila njihova funkcija i mogućnost da postanu nove potencijalne mete lijekova (Patrick, 2013.).

1.1.1. *In silico* ispitivanja

Razvojem znanosti unaprijeđena je i tehnologija kojom se pretražuju nove molekule kao potencijalni lijekovi. Samim time, povećava se broj molekula s obećavajućom aktivnošću te se ubrzava sam proces razvoja novog lijeka. Velik broj farmaceutskih tvrtki značajno ulaže u razvoj kombinatorne kemije i visokoprotočnih pretraživanja (high-throughput screening, HTS) (Verbanac i sur., 2005.). Kombinatorna kemija nova je tehnologija razvijena kako bi se smanjili troškovi i skratilo trajanje razvoja novoga lijeka. Koristi se za ispitivanje velikog broja novih molekula. HTS je omogućio brzo i učinkovito testiranje djelovanja novih molekula na velik broj potencijalnih meta (Seneci i Miertus, 2000.). Automatizacijom HTS-a omogućeno je testiranje stotine pa čak i tisuće spojeva dnevno. Iako je porastao broj sintetiziranih i testiranih molekula, broj molekula s kojima bi se nastavio daljnji razvoj i dalje je ostao mali. Poboljšanje učinkovitosti HTS-a može se postići koristeći različite *in silico* metode. *In silico*, odnosno računalnim stimulacijama, mogu se otkriti potencijalne interakcije između molekula i izabranih meta. Metoda je relativno jeftina, što je dodatna prednost (Leach

i Hann, 2000.). Olakšava i ubrzava razvoj lijeka te omogućuje odabir samo molekula s visokim potencijalom iskoristivosti u daljnjem istraživanju. Prije bilo kakvog eksperimentalnog istraživanja, reprezentativni skup spojeva pretražuje se *in silico* kako bi se ograničio samo na molekule koje potencijalno djeluju na ciljane makromolekule na željeni način i željenim afinitetom. Takvim pretraživanjem, ograničen broj molekula odabire se za biološka ispitivanja (Kubinyi, 2003.).

Uspješnost *in silico* pretraživanja može se izraziti kao istinito pozitivan omjer, lažno pozitivan omjer te kao faktor obogaćivanja (Waszkowycz i sur., 2001.). Način na koji će se *in silico* pretraživanje provoditi ovisi o broju struktura, ali i o saznanjima o metama i ligandima. *In silico* metode mogu se ugrubo podijeliti na dvodimenzijsko (2D) i trodimenzijsko (3D) pretraživanje strukturne sličnosti, odnosno molekularno i podatkovno modeliranje, grupiranje farmakofora ovisno o ligandu ili meti i molekularno „docking and scoring" (Verbanac i sur., 2005.) što podrazumijeva ubacivanje malih molekula u strukturu makromolekularnih meta i ocjenjivanje njihove potencijalne komplementarnosti (Kitchen i sur., 2004.). Navedene metode često se kombiniraju s ciljem povećanja učinkovitost *in silico* pretraživanja. Učinkovitost većine metoda ovisi o pripremi spojeva. U reprezentativnom setu svaka je molekula zapisana u jedinstvenom, standardiziranom 2D obliku (www.mol-net.de/software/tautomer).

Različite ionske vrste, tautomerni oblici te stereoizomeri jedne molekule mogu imati različiti afinitet vezanja prema istoj ciljnoj molekuli. Stoga prije *in silico* metoda, spojevi moraju biti prebačeni u ispravno ionizacijsko stanje, sve moguće tautomerne oblike (ili barem energetski najprihvatljivije) te sve topološki i sterički moguće ili samo najstabilnije stereoizomere. Za svaku molekulu treba biti kreirana pouzdana 3D struktura. Rezultati dobiveni metodom „docking and scoring" ovise uvelike o kvaliteti 3D strukture ciljanih molekula (Chen i sur., 2002.).

Da bi makromolekula bila izabrana kao terapijska meta treba biti prepoznata kao terapijski cilj te predstavljena u specijaliziranoj bazi podataka. Također, moraju biti dostupne strukture makromolekula dobivene pomoću rendgenskih zraka, a metabolički poremećaji vezani uz proteinsku funkciju isto tako trebaju biti opisani. Ovisno o tipu tzv. *docking* algoritma koji će se koristiti, ovisi i sama priprema ciljne molekule. Osobita se pozornost obraća na položaj vodikovih atoma, izbjegavanje sudaranja atoma i ispravljanje orijentacije aktivnih mjesta hidroksilnih grupa. Ponekad molekule vode koje se nalaze u aktivnom mjestu utječu na vezanje liganda pa treba obratiti pažnju i na njih. Također, ioni metala mogu biti od

presudne važnosti za funkcioniranje ciljanih molekula, stoga se i oni moraju uzeti u obzir prilikom formiranja kompleksa između ciljane molekule i liganda (Jones i sur., 1997.).

Učinkovitost 3D virtualnog pretraživanja ovisi o fleksibilnosti same strukture. Iako je vrlo bitna, fleksibilnost ciljane molekule je izrazito kompleksan problem i ne uzima se izričito u obzir te se protein promatra kao rigidan. Koristi se njegova kristalna struktura (Verbanac i sur., 2005.).

1.1.2. *In vitro* ispitivanja

In vitro ispitivanjima mogu se dobiti određeni podaci koji bi se inače dobili testovima na živim organizmima. Provode se na specifičnim tkivima, stanicama ili enzimima.

Kada su u pitanju mikrobiološka ispitivanja, mete su bakterijski mikroorganizmi kao što su *Staphylococcus auresu*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* itd. te gljivice poput *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida species* i dr. Početno pretraživanje novih spojeva provodi se na određenom skupu mikroorganizama. Time je omogućeno otkrivanje osnovne aktivnosti te djelovanje na rezistentnim organizmima koji nose različite gene ze rezistenciju i ispoljavaju rezistenciju različitim mehanizmima. Sojevi se uzgajaju na Miller-Hintonovom agaru. Izuzetak su sojevi *Streptococus* i *Haemophilus* koji se uzgajaju na krvnom i čokoladnom agaru (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.). Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) određuje se metodom razrjeđenja na mikrotitarskoj pločici osim za *Streptococus*. Rezultati se očitavaju vizualno, a minimalna se inhibitorna koncentracija izražava kao najniža koncentracija koja pokazuje 90 % inhibicije rasta (Wiegand i sur., 2008.).

Citotoksičnost se također ispituje na stanicama. Ispitivanje citotoksičnosti omogućuje otkrivanje potencionalne toksičnosti novih spojeva. Upravo je toksičnost potencijalnih novih lijekova glavni razlog napuštanja daljnjih istraživanja tih molekula. Provodi se na staničnim linijama kao što su npr. THP-1, COS, Hep G-2, CHO, A549, COR-L23, itd (Slater, 2001.). Ispitivanje se provodi na način da se stanice u fazi rasta tretiraju lijekom. Stanicama je omogućeno razmnožavanje kako bi se mogle razlikovati održive stanice sposobne proliferirati i održive stanice koje nemaju tu sposobnost. Broj održivih stanica može se odrediti pomoću 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijevog bromida (MTT) koji mjeri mitohondrijsku aktivnost sukcinat-dehidrogenaze živih stanica. Sukcinat-dehidrogenaza kida tetrazolinski

prsten i prevodi MTT u smeđu boju. Količina nastalog MTT-formazan mjeri se spektrofotometrijski na 490 nm (Mosmann, 1983.).

Spojevi mogu utjecati i na enzime kao što su npr. kinaze, peptidaze, transferaze, ligaze. Taj se utjecaj također može mjeriti u HTS-u, a način detekcije ovisi o vrsti ispitivanja namijenjenog za pojedini enzim. Mjerenjem apsorbancije, fluorescencije, luminiscencije i fluorescentne polarizacije može se otkriti aktivnost enzima (Seethala, 2000.). Često korištena metoda jest enzimski povezani imunosorpcijski test, ELISA metoda (engl. Enzyme-Linked Immunosorbrnt Assay; ELISA). Test se provodi na mikrotitarskoj pločici pri čemu se jažice oblažu supstratom. Dodatkom određenog spoja dolazi do kompeticijske reakcije između supstrata i spoja za aktivno mjesto enzima. Tijekom te reakcije može se odrediti specifična aktivnost enzima (Aydin, 2015.).

Razvoj genetičkog inženjerstva omogućio je dizajniranje mnogih *in vitro* testova. Transkripcijsko profiliranje DNA predstavlja relativno novu tehniku analize ekspresije gena (Walsh i Henderson, 2004.). Omogućuje pretraživanje i pohranjivanje cijelog genoma na jednom čipu. Znanstvenici tako mogu dobiti bitne informacije o interakcijama ispitivanog lijeka i velikog broja gena važnih kod određene bolesti. Tehnika također ima i veliku važnost u medicini omogućujući molekularnu karakterizaciju bolesti, razvoj lijekova i procjenu rezultata liječenja (Verbanac i sur., 2005.).

U ranoj fazi razvoja lijeka provodi se Amesov test. Amesov test jest test za otkrivanje potencijalne mutagenosti i karcinogenosti. Provodi se na mutiranoj bakteriji *Sallmonela typhimurium* koja ne može sintetizirati aminokiselinu histidin. Za njen rast histidin treba biti dodan u medij. Zbog male količine dodanog histidina, bakterija ubrzo prestaje s rastom i razmnožavanjem. Ukoliko kolonije bakterija nastave s rastom i razmnožavanjem, to znači da je došlo do mutacije u divlji tip. To ukazuje na mutagenost ispitivanog spoja (Barbezan i sur., 2017.).

1.1.3. *In vivo* ispitivanja

Upotreba životinjskih modela u istraživanjima rezultirala je novim saznanjima o tome kako potencijalni novi lijekovi utječu na životinje i ljude. To je još uvijek jedini način da se u potpunosti procijeni učinkovitost, farmakologija, farmakokinetika i sigurnost potencijalnog lijeka prije početka kliničkih ispitivanja na ljudima. Postoji velik broj životinjskih modela kao što su miševi, štakori, zečevi, mačke, psi, ribe koji se koriste u razvoju lijekova. Na njima se

ispituje sigurnost, podnošljivost te farmakokinetička svojstva (Gowder, 2013.).

Akutna toksičnost najčešće se ispituje na ženkama štakora. Postupno se primjenjuju doze od 5, 50, 300 i 2000 mg/kg. Početna doza odabire se na temelju prijašnjih opažanja. Ne smije izazvati smrt ili jaki toksični učinak, ali uzrokuje pojavu nekih znakova toksičnosti. Sljedeća skupina životinja može biti tretirana nižom, odnosno višom dozom. Za svaku dozu koja se ispituje obično se koristi pet životinja istog spola. Postupak se nastavlja dok se ne utvrdi letalna doza, odnosno doza koja izaziva smrt ili doza koja uzrokuje evidentnu toksičnost. Također, utvrđuje se najviša doza kod koje nema toksičnih učinaka te najniža doza koja uzrokuje smrt.

Subkronična toksičnost može se odrediti metodom ponavljanih doza nakon što je proveden test akutne toksičnosti i nakon što su dobivene početne informacije o toksičnosti. Ispitivanje traje 90 dana. Dobivaju se informacije o potencijalnim opasnostima koje se javljaju pri ponovljenoj dugotrajnoj primjeni lijeka, informacije o ciljnim organima, mogućnosti akumulacije te se procjenjuje stupanj izloženosti kod kojeg nema vidljivih štetnih učinaka. Istraživanje omogućuje prepoznavanje spojeva koji pokazuju učinak na reproduktivne organe, neurotoksikološki i imunološki učinak. Najčešće se koristi štakor, ali mogu i druge vrste glodavaca. Svaka visina doze mora se ispitati na najmanje 20 životinja.

Kronična se toksičnost ispituje na način da se ispitivani spoj primjenjuje svakodnevno kroz veći dio životnog vijeka pokusne životinje, a treba trajati najmanje 12 mjeseci. Životinje se svakodnevno promatraju kako bi se otkrili znakovi toksičnosti. Preporuka je da se ispitivanje vrši na štakorima, iako se mogu koristiti i druge životinjske vrste. Svaka doza mora se ispitati na najmanje 40 životinja, a ispituju se najmanje tri doze. Najniža doza ne bi trebala pokazivati znakove toksičnosti za razliku od najviše doze.

Ispituje se i učinak na reprodukciju. Paralelno se provode i kontrolna ispitivanja. Kontrolna skupina životinja je identična ispitivanoj skupini, osim što nije tretirana ispitivanim lijekom. Gravidne pokusne životinje tretiraju se ispitivanim lijekom te se promatra učinak lijeka na te životinje kao i na organizam koji se razvija u maternici. Procjenjuje se učinak na majku, potencijalna smrt, strukturne abnormalnosti ili promijenjeni rast fetusa. Gravidne životinje primaju lijek najmanje od implantacije do jednog dana prije dana planiranog usmrćivanja. Životinje se usmrte te se na njima vrši carski rez. Pregledava se sadržaj maternice. Na plodu se traže vanjske anomalije te promjene na mekim tkivima i kosturu. Ispitivanje se vrši na ženkama štakora ili kunića koje još nisu imale potomstvo, njih oko 20.

Test karcinogenosti provodi se na način da se ispitivane životinje tretiraju lijekom svaki dan veći dio njihovoga životnog vijeka. Životinje se svakodnevno promatraju, za vrijeme i

nakon što budu izložene ispitivanoj tvari, s ciljem otkrivanja znakova toksičnosti, prvenstveno karcinoma. Bilježi se vrijeme pojavljivanja karcinoma, lokalizacija, dimenzije, izgled i progresija tumora koji je može vidjeti okom ili opipati. Ispitivanje se provodi na glodavcima ili neglodavcima, njih najmanje 100 za svaku dozu. Na štakorima traje 24 mjeseca, a na miševima i hrčcima 18 mjeseci. Paralelno se provode i kontrolna ispitivanja. Kontrolna skupina životinja je identična ispitivanoj skupini, osim što nije tretirana ispitivanim lijekom.

Što se tiče farmakokinetike, ispituje se apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje. Brzina i stupanj apsorpcije mogu se odrediti s obzirom na količinu lijeka u tjelesnim izlučevinama kao što su mokraća, izmet, žuč, usporedbom količine lijeka koja se izluči putem bubrega kod ispitivane i kontrolne skupine ili određivanjem površine ispod krivulje ispitivanog lijeka uz usporedbu s referentnom skupinom. Do kvalitativnih podataka o raspodjeli dolazi se tehnikama autoradiografije, dok je za kvantitativne podatke životinje potrebno usmrtiti u različito vrijeme nakon izlaganja lijeku te odrediti koncentraciju i količinu lijeka u tkivima i organima. Intenzitet i način metabolizma određuju se analizom bioloških uzoraka. Kod istraživanja izlučivanja, skuplja se mokraća, izmet ili izdahnuti zrak. Količina lijeka u tim izlučevinama se mjeri dok se ne izluči 95 % primijenje doze (www.oecd-ilibrary.org).

1.1.4. Klinička ispitivanja

Ukoliko lijek ima željeni učinak na životinjskim testovima, bolji je od postojećih lijekova, ima prihvatljivu farmakokinetiku, malo metabolita, prihvatljivo $t_{1/2}$ i ukoliko nema ozbiljnih nuspojava (nakon *in silico*, *in vitro* i *in vivo* ispitivanja), slijede klinička ispitivanja. Provode se zbog značajnih razlika u djelovanju lijekova na životinje i čovjeka. Velika je i razlika u farmakokinetici lijeka u životinjskom organizmu i u ljudskom organizmu (Patrick, 2013.). Klinička ispitivanja prekidaju se ukoliko se pokaže da lijek nema željenu aktivnost ili nije siguran, odnosno izaziva ozbiljne nuspojave (Hughes i sur., 2011.).

U prvoj se fazi klinički pokusi provode na malim grupama, 100-300 zdravih dobrovoljaca. Svrha je provjeriti sigurnost lijeka, odnoso potencijalne nuspojave, farmakokinetička svojstva, podnošljivost, tj. utvrđuje se doza. Administracijama različitih doza lijeka ispitanicima, utvrđuje se raspon sigurnih i efikasnih doza lijeka. Početna doza iznosi jednu desetinu najveće sigurne doze (po kg) koja je korištena u životinjskim pokusima. Doza se postupno povećava dok se ne primijete blage nuspojave. Tako se određuje najviša

podnošljiva doza. Broj ispitanika može varirati. Za svaku dozu 6-12 ispitanika prima aktivnu supstanciju, a 2-4 placebo. Kako bi se izbjegle potencijalne interakcije, ispitanici ne smiju uzimati lijekove, kofein, alkohol ni cigarete. Ispituje se i utjecaj hrane na apsorpciju lijeka kako bi se utvrdilo kada uzimati lijek ovisno o hrani (natašte, uz jelo ili neovisno o obroku). Farmakokinetička ispitivanja prate apsorpciju, distribuciju i izlučivanje lijeka. U tu svrhu koristi se radioaktivno označen lijek primijenjen na 4-8 ispitanika. Tijekom prve faze kliničkih ispitivanja, sigurnost nije uvijek najbolje ispitana, a nuspojave mogu, ali i ne moraju biti posljedica uzimanja lijeka. Međutim, ukoliko se primjeti i dokaže da je neka ozbiljna nuspojava uzrokovana lijekom, klinička se ispitivanja prekidaju.

U drugoj fazi studije se provode na odabranoj skupini bolesnika i obično traje oko dvije godine. Ispituje se učinak na bolest, odnosno terapijska vrijednost lijeka, kratkoročna toksičnost, farmakokinetika, najbolji način doziranja te se utvrđuju dnevne i pojedinačne doze. Faza II dijeli se na inicijalnu fazu i kasnije studije. Inicijalna faza (IIa) provodi se na ograničenom broju pacijenata. Svrha joj je utvrditi ima li lijek terapijsku vrijednost te ima li nekih očitih nuspojava. Ukoliko je učinak vidljiv, a pojavnost nuspojava neznatna, klinički se pokusi nastavljaju. Kasnije studije (IIb) uključuju veći broj pacijenata. Provode se kao dvostruko slijepe randomizirane placebo kontrolirane studije. Pacijenti su podijeljeni u 2 skupine, od kojih jedna prima lijek, a druga placebo. U slijepoj studiji samo pacijent ne zna prima li lijek ili placebo, dok u duplo slijepoj studiji niti liječnik niti pacijent ne znaju primjenjuje li se lijek ili placebo. Krajnja točka (endpoint) koristi se za objektivno mjerenje učinka lijeka. Uobičajene krajnje točke uključuju jaku toksičnost, ublažavanje simptoma i poboljšanje kvalitete života.

Prije završetka faze II, može se započeti faza III kliničkih ispitivanja. Obično traje oko tri godine, a provode se jednaka ispitivanja kao i u fazi II samo na većoj grupi pacijenata. Pacijenti koji uzimaju lijek uspoređuju se s onima koji uzimaju placebo ili neki konvencionalni lijek. Konvencionalni lijek ili lijek-pomoć može se dati pacijentima koji uzimaju placebo jer bi kod određenih stanja bilo neetično pacijente liječiti samo placebom. Faza III također je podijeljena na fazu IIIa i IIIb. U fazi IIIa utvrđuje se je li lijek stvarno učinkovit ili su njegovi učinci posljedica placebo učinka te se provodi i konačno optimiranje doza. Lijek se može registrirati ukoliko uspješno prođe kroz fazu IIIa. U fazi IIIb lijek se uspoređuje s drugim lijekovima koji se koriste za istu indikaciju. Provodi se nakon uspješne registracije, ali prije odobrenja za stavljanje lijeka u promet.

Faza IV kliničkih ispitivanja provodi se nakon stavljanja lijeka na tržište. Ispituje se učinkovitost lijeka te se mogu otkriti rijetke ili neočekivane nuspojave tako da ova faza nikad

ne završava. Pojedine nuspojave mogu se javiti godinama nakon uvođenja lijeka na tržište (Patrick, 2013.).

Sve nuspojave na lijekove prijavljuju se u pisanom obliku odgovarajućem tijelu, u Republici Hrvatskoj to je Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED). Ukoliko se radi o cjepivima, u Republici Hrvatskoj nuspojave je potrebno prijaviti i Hrvatskom zavodu za javno zdrvstvo (HZJZ). Nuspojave, kao i svaku sumnju na nuspojavu, dužni su prijaviti zdravstveni djelatnici koji su u kontaktu s korisnikom lijeka, proizvođač lijeka, nositelj odobrenja za stavljanje lijeka u promet, nositelj odobrenja za paralelni uvoz, uvoznik i veleprodaja. Ukoliko se radi o ozbiljnim nuspojavama, zdravstveni djelatnik koji sudjeluje u kliničkom ispitivanju kao ispitivač, dužan je nuspojave prijaviti naručitelju kliničkog ispitivanja i HALMED-u (www.halmed.hr).

Za sudjelovanje u prve tri faze kliničkih ispitivanja nužan je pristanak pacijenta. Unatoč tome, pacijenti često nisu dovoljno informirani o samim ispitivanjima kako bi sami mogli prosuditi korist tih studija pa često može doći do etičkih problema. Problem su i djeca. Njihovo se sudjelovanje u kliničkim ispitivanjima izbjegava. Smatra ih se umanjenim odraslim osobama prilikom doziranja lijeka, iako to dakako nisu. Doza za odrasle preračunava se s obzirom na tjelesnu masu djeteta, no farmakokinetički i farmakodinamski profil lijeka značajno se razlikuje kod odraslih i djece (Patrick, 2013.).

1.2. Citotoksičnost

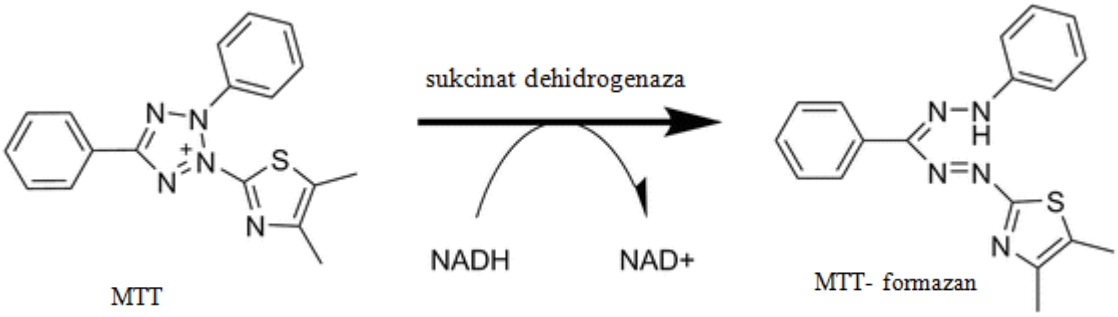
Citotoksičnost je mogućnost neke tvari da inducira staničnu smrt. Može se utvrditi promatranjem morfoloških promjena stanice, promjena u strukturi i integritetu stanične membrane, metaboličke aktivnosti stanice ili analizom DNA (Frey, 1995.; Riss i Moravec, 2004.).

Morfološke promjene mogu se promatrati svjetlosnim, fluorescentnim ili elektronskim mikroskopom. Jedna od najranijih metoda ispitivanja viabilnosti uključuje boju tripansko plavilo (trypan blue). Žive stanice imaju netaknutu staničnu membranu pa uz pomoć pumpi izbacuju boju natrag u međustanični prostor van. S druge strane, u mrtve stanice boja ulazi i boji ih plavo jer membrana više nije u mogućnosti kontrolirati prolaz makromolekula. U suspenziji stanica, stanice ne smiju biti u nakupinama kako bi se mogle promatrati pomoću svjetlosnog mikroskopa. Hoechst 33342 je boja koja ulazi u stanicu i preferirano se veže na andenin-timin područja u DNA. Pobuđena ultraljubičastom svjetlošću emitira plavu

fluorescenciju na 460-490 nm koja je može promatrati pod fluorescentnim mikroskopom. Hoechst 33342 koristi se za specifično bojanje jezgara žive stanice i tkiva. Metoda je relativno neosjetljiva na pH 5-10, ali je osjetljiva na promjenu temperature i ionske jakosti, gašenje fluorescencije dvovalentnim kationima ili kationima teških metala (Atale i sur., 2014.).

Pomoću FDA/PI mogu se uočiti promjene u strukturi i integritetu stanične membrane. Fluorescein diacetat (FDA) ulazi u stanice i prelazi u zeleni fluorescentni metabolit fluorescein. Stanicu boji zeleno. Suprotno tome, propidijev jodid (PI) ne prolazi kroz membranu živih stanica već samo mrtvih pri čemu se interkalira u dvostruku DNA uzvojnicu i boji ju crveno (Jones i Senft, 1984.). Fosfatidilserin, pokazatelj apoptoze, kod živih stanica nalazi se s unutarnje strane plazmatske membrane, a tijekom rane apoptoze prelazi na vanjsku stranu te se na njega može vezati stanični protein aneksin V (Vermes i sur., 2005.). Još jedna uobičajena metoda za određivanje citotoksičnosti temelji se na mjerenju aktivnosti citoplazmatskih enzima koji oslobađaju oštećene stanice. Laktat-dehidrogenaza (LDH) stabilan je citoplazmatski enzim koji se nalazi u svim stanicama. Brzo se oslobađa u supernatant stanične kulture kada je plazmatska membrana oštećena. Aktivnost LDH-a može se lako kvantificirati korištenjem NADH dobivenog tijekom pretvorbe laktata u piruvat. Npr. NADH može reducirati žutu tetrazolijevu sol u crveni formazan. Količina formazana izravno je proporcionalna količini LDH u kulturi, koja je izravno proporcionalna broju mrtvih ili oštećenih stanica (Kumar i sur., 2018.).

U staničnoj kulturi prva i najčešće korištena tetrazolijeva sol za mjerenje promjena u metaboličkoj aktivnosti je MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) (Stoddart, 2011.). Zbog svojih lipofilnih bočnih skupina i pozitivnog neto naboja MTT je u stanju proći staničnu membranu. Reduciran je u živim stanicama mitohondrijskim ili plazmatskim enzimima poput oksidoreduktaza, dehidrogenaza, oksidaza i peroksidaza koristeći NADH, NADPH, sukcinat ili piruvat kao donor elektrona pri čemu nastaje u vodi netopljiv formazan. Osim enzimskih reakcija postoje i različite neenzimske reakcije sa redukcijskim molekulama poput askorbinske kiseline, glutationa ili koenzima A koji mogu reagirati s MTT-om formirajući formazan. Količina formazana, koja je proporcionalna broju živih stanica, mjeri se spektrofotometrijski (Präbst i sur., 2017.).



Promjene u metaboličkoj aktivnosti mogu se mjeriti i detekcijom i određivanjem koncentracije adenozin-trifosfata (ATP) bioluminiscencijski. Pokazano je da je sadržaj unutarstaničnog ATP-a proporcionalan koncentraciji stanica u suspenziji. ATP je nukleotid, derivat adenina i riboze. Glavni je prijenosnik energije u stanicama svih živih organizama. Hidroliza ATP-a, kod koje dolazi do kidanja jedne ili dvije fosfatne skupine, praćena je oslobađanjem energije. Unutarstanični sadržaj ATP-a glavni je pokazatelj održivosti stanica. Nakon stanične smrti, prvo se zaustavlja sinteza ATP-a stoga sadržaj unutarstaničnog ATP-a naglo pada na nultu vrijednost (Lomakina i sur., 2015.). Koncentracija ATP-a može se odrediti pomoću ispitivanja bioluminiscentnim testom. ATP je potreban sastojak u reakciji kataliziranoj enzimom luciferazom:

$$\text{D-luciferin} + O_2 + \text{ATP} + Mg^{2+} \rightarrow \text{oksiluciferin} + \text{AMP} + \text{PPi} + h\nu$$

Prema ovoj shemi, organski supstrat (luciferin) brzo se oksidira kisikom u prisutnosti ATP-a i magnezijevih iona u oksiluciferin uz istovremeno stvaranje pirofosfata (PPi) i AMP-a. U početku je oksiluciferin u pobuđenom stanju. Prelaskom u osnovno stanje emitira energiju. Intenzitet emitirane energije proporcionalan je koncentraciji ATP-a i mjeri se luminimetrom (Shama i Malik, 2013.).

TUNEL (engl. terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling), DNA ljestve i komet test koriste se za otkrivanje apoptotskih stanica kod kojih dolazi do razgradnje DNA (Suman i sur., 2011.). Jedno od biokemijskih obilježja apoptoze jest stvaranje slobodnih 3-hidroksilnih terminalnih skupina DNA kidanjem kromatina u pojedinačne oligonukleosome ili u više fragmenata oligonuleosoma. TUNEL test koristi to svojstvo označavajući izložene terminale skupine DNA te omogućavajući tako vizualizaciju jezgara koje sadrže fragmentiranu DNA. TUNEL bojenje koristi sposobnost terminalne deoksinukleotidil-transferaze (TdT) da ugradi označeni dUTP na slobodnu 3-hidroksilni terminalnu skupinu genomske DNA (Darzynkiewicz, 2008.). Vizualizacija se može provesti

pomoću imunohistokemijskih tehnika. Kinetika obojenja TUNEL testa ovisi o koncentraciji reagensa, fiksacija tkiva, opsegu proteolize i pristupačnosti pukotina DNA koje se razlikuju ovisno o vrsti tkiva. Tehniku je važno standardizirati koristeći presjeke tkiva tretirane s DNA kao pozitivnu kontrolu i bez tretiranja TdT-om kao negativna kontrola kako bi se izbjegli lažno pozitivni ili negativni rezultati (Kyrylkova i sur., 2012.). Komet test ili gel elektroforeza jedne stanice (engl. single cell gel electrophoresis, SCGE) jest brza metoda koja se koristi za otkrivanje oštećenja DNA. Nakon razdvajanja DNA na agaroznom gel baze nalikuju na komet. Komet test koristi se za analizu jednolančane i dvolančane DNA (Olive i Banath, 2006.). Alkalni uvjeti pri pH 10 ili višem omogućuju otkrivanje jednolančanih DNA lomova. Alkalni pH prekida neskladne interakcije između dušičnih baza u DNA tako da DNA lanci postanu odvojeni. Neutralni pH (~7) prikladan je za otkrivanje lomova dvolančane DNA jer se odvajanje DNA lanaca ne događa kod neutralnog pH (Olive i sur., 1993.). Postupak analize kometa sastoji se od fiksacije stanice koja se analizira na predmetno stakalce, lize stanice i elektroforeze na agaroznom gelu. Na kraju se DNA oboji i vizualizira (Majtnerová i Roušar, 2018.). Za bojenje DNA može se koristiti etil-bromid, PI, 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), akridin narančasto (Rydberg i Johnson, 1978.) ili Synergy Brands (SYBR) (Kim i sur., 2012.). Ukoliko je došlo do prekida DNA, komet se opaža na gelu. Komet se sastoji od glave i repa koji predstavljaju različite strukture DNA. Glava sadrži jezgru s makromolekulama i nefragmentiranom DNA, a rep se pretežno sastoji od jednolančane DNA. Veličina rep proporcionalna je razini oštećenja DNA (Olive i sur., 1993.). Tijekom apoptoze DNA se može pokidati na fragmente koji na gelu daju sliku ljestava (Elmore, 2007.). Prvo se kultivirane stanice liziraju. Za lizu stanica koriste se puferi koji sadrže tris-(hidroksimetil)-aminometan (TRIS) i etilendiaminetetraoctenu kiselinu (EDTA) s natrijevim kloridom. Dimetil-sulfoksid (DMSO) se također može koristiti za lizu stanica. Zatim se izolira fragmentirana genomska DNA ekstrakcijom s fenolom i kloroform ili ekstrakcijom fenolom, kloroformom i izoamilnim alkoholom. Digestija kontaminirajuće RNA vrši se pomoću RNaze A. Nakon izolacije i pročišćavanja DNA slijedi elektroforeza. Negativno nabijeni fragmenti DNA odvajaju se na agaroznom gelu pod utjecajem elektičnog polja, pri čemu DNA migrira prema anodi. Na kraju se fragmenti DNA boje i vizualiziraju. Za vizualizaciju koriste se fluorescentne boje poput etidijevog bromida koji je jak mutagen, pa je sigurnija i ekološki prihvatljivija alternativa SYBR-Safe (Majtnerová i Roušar, 2018.).

1.3. Tumori

Karcinom je jedan od najvećih zdravstvenih problema današnjice. Najčešće se javlja karcinom dojke, prostate, kolonorektalni karcinom ili karcinom pluća koji je ujedno i najsmrtonosniji (Zugazagoitia i sur., 2016.). Tumori su patološke tvorevine koje nastaju uslijed prekomjerne proliferacije abnormalnih stanica. Rast tumora je nesvrhovit, autonoman, parazitarni, nepravilan i neorganiziran. Najčešća je podjela na dobroćudne i zloćudne. Dobroćudni ili benigni tumori ne ugrožajavu bitno zdravlje, rastu polagano, ograničeni su na organ u kojem je tumor nastao te im je klinički ishod uglavnom povoljan. Zloćudni ili maligni tumori rastu puno brže pri čemu razaraju tkivo organa u kojem nastaju šireći se u okolna tkiva. Maligne transformacije stanica povezane su s genskim promjenama, a uključuju onkogene, tumorske supresorske gene, gene koji sudjeluju u apoptozi i gene koji sudjeluju u popravku DNA (Damjanov i sur., 2018.). Geni koji upravljaju kontrolom rasta i diferencijacijom tumorskih stanica nazivaju se protoonkogeni, a prelaze u onkogene uslijed točkastih mutacija, prekomjernog izražavanja, translokacijom i insercijom virusnog gena. Delecijom ili prestankom normalnog funkcioniranja uslijed mutacije tumorskih supresorskih gena, od kojih su najvažniji RB-1 i TP53, također može doći do neoplastične pretvorbe stanica (Hanahan i Weinberg, 2011.). Apoptoza, poznata i kao programirana stanična smrt, glavni je mehanizam održavanja homeostaze između starih stanica i novostvorenih stanica. Složen je to proces u kojem sudjeluju brojni geni, a njihove mutacije mogu dovesti do nastanka tumora (Wong, 2011.). DNA je izložena djelovanju različitih toksičnih kemikalija, slobodnih radikala ili fizičkih utjecaja koji mogu dovesti do njenog oštećenja. Vrlo je bitno popraviti ta oštećenja prije diobe DNA kako se oštećena DNA ne bi prenijela na novostvorene stanice. Za to su zaduženi DNA popravljački enzimi koji također mogu mutirati i tako pridonijeti nastanku i razvoju tumora (Jeggo i sur., 2016.).

Glavne karakteristike malignih tumora su: stalan poticaj na staničnu proliferaciju, izbjegavanje apoptoze, gubitak ograničenja proliferacije, neoangiogeneza, invazija, metastaziranje i kolonizacija udaljenih organa, promjene u staničnom energetskom metabolizmu te izbjegavanje imunosnog nadzora (Damjanov i sur., 2018.).

1.4. Kemoterapija

Liječenje tumora vrlo je kompleksno. Najvažniji načini liječenja obuhvaćaju kirurško odstranjivanje, zračenje, kemoterapiju, imunoterapiju, hormonsku terapiju ili ciljanu terapiju. Kako bi se učinkovitost liječenja poboljšala, metode se često kombiniraju (Mršić-Krmpotić i sur., 2004.).

Kemoterapija predstavlja liječenje lijekovima koji se nazivaju citostatici. Ovisno o mehanizmu djelovanja razlikujemo alkilirajuća sredstva (ciklofosfamid, karmustin, spojevi platine), antimetabolite (5-fluorouracil, metotreksat), prirodne spojeve (vinblastin, taksani, irinotekan) i ostale spojeve (erlotinib, bevacizumab). Koriste se i antibiotici poput antraciklina, bleomicina, mitomicina (Mutschler i Derendorf, 1995.). Mete citostatika jesu brzo proliferirajuće stanice tumora, ali i zdrave stanice koje se intenzivno dijele. Zbog njihove neselektivnosti javljaju se nuspojave poput smanjene proizvodnje krvnih stanica, mučnina, povraćanje, mukozitis i alopecija. Kemoterapija se najčešće primjenjuje intravenski ili oralno. Lijekovi zbog takvog načina primjene djeluju sistemski. Uske su terapijske širine. Doze pojedinog kemoterapeutika koje bi značajno djelovale na tumor izazivaju jake nuspojave, stoga se često primijenjuje kombinirana kemoterapija. Kombinirana kemoterapija podrazumijeva primjenu više lijekova u različitim dozama tijekom razdoblja liječenja. Zbog jakih nuspojava, smanjene kvalitete života i ponavljajuće terapije sve češće primijenjuje se ciljana terapija (Katzung, 2018.).

Ciljana terapija prvenstveno djeluje na tumorske stanice na način da blokira specifične molekule unutar tumorske stanice te tako usporava ili zaustavlja rast raka. Uzrokuje manje nuspojava od konvencionalne kemoterapije (Saini i sur., 2012.). No ciljni lijekovi nisu pokazali značajan napredak u liječenju te je klasična kemoterapija i dalje najčešći oblik liječenja (Katzung, 2018.). S ciljem povećanja učinkovitosti, sintetiziraju se novi potencijalni citostatici među koje spadaju i derivati lipoične kiseline.

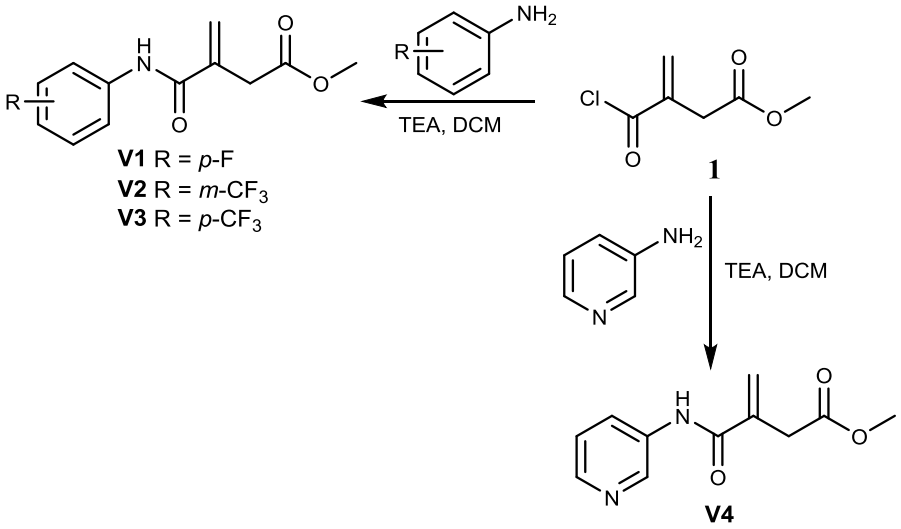
2. OBRAZLOŽENJE TEME

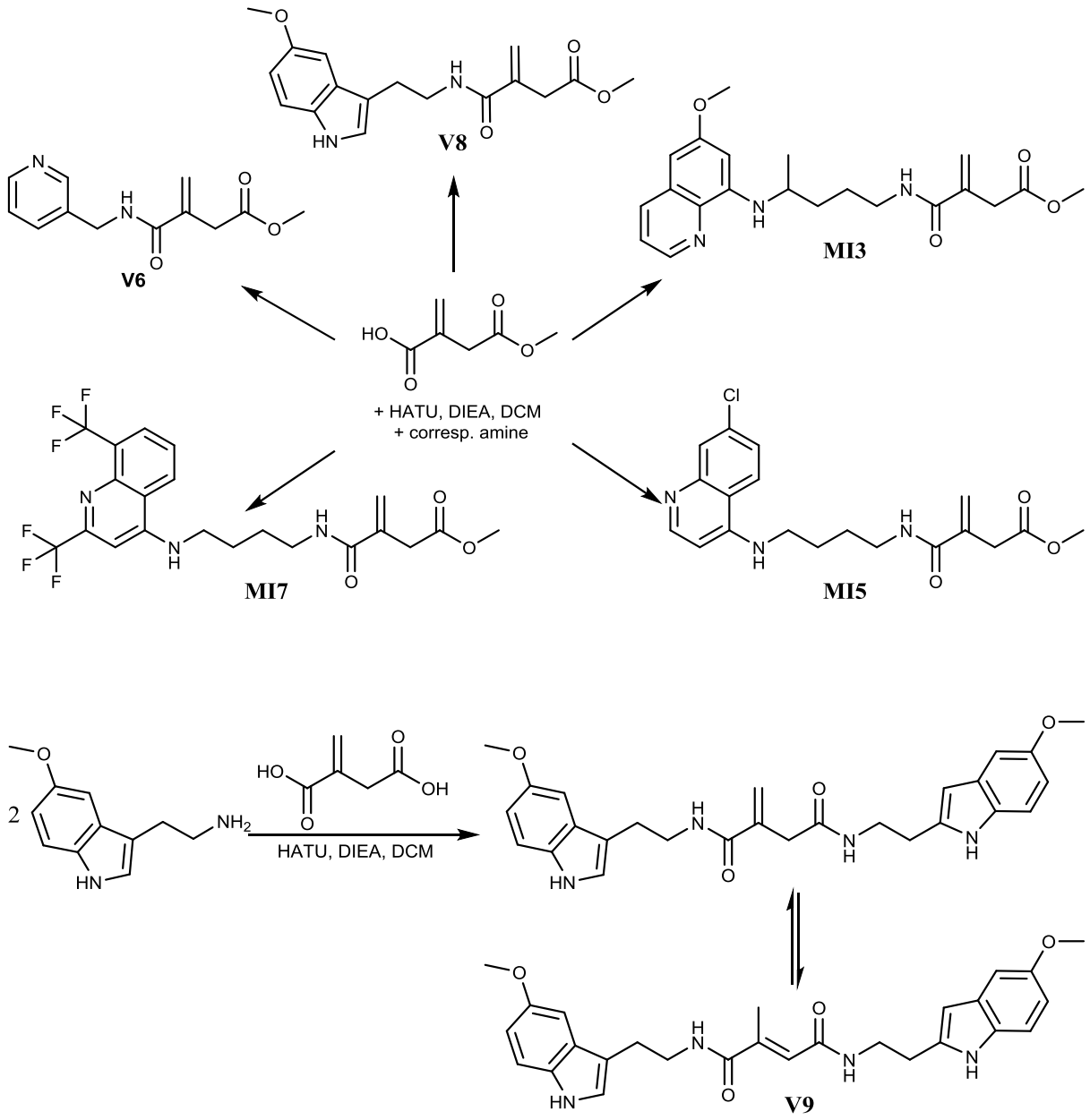
Razvoj lijeka dug je, složen i skup proces. *In silico* ispitivanjima svakodnevno se ispituje velik broj novih molekula s potencijalnim ljekovitim djelovanjem. Nakon probira prikladnih molekula slijedi optimizacija molekula u svrhu poboljšanja farmakokinetike i farmakodinamike. *In vitro* ispitivanjima, među koje ubrajamo i test citotoksičnosti, mogu se dobiti ključni podaci o kojima će ovisiti daljnji tijek ispitivanja, odnosno hoće li se nastaviti s ispitivanjima ili će ona biti prekinuta. Rak je nakon kardiovaskularnih bolesti drugi najčešći uzrok smrti u razvijenom svijetu. Postojeća terapija često nije dovoljno učinkovita ni selektivna pa se traže nove strategije liječenja, odnosno učinkovitiji protutumorski lijekovi. Glavni cilj korištenja citostatika je uništavanje isključivo zloćudnih stanica. Ukoliko se u ranim fazama razvoja lijeka, odnosno *in vitro* ispitivanjima citotoksičnosti, pokaže da lijek nije toksičan za tumorske stanice, ispitivanja se obustavljaju jer to znači da ne djeluje na željeni način.

Cilj ovog *in vitro* ispitivanja bio je ispitati citotoksičnost derivata itakonske kiseline, klorokin-difosfata i meflokin-hidroklorida kao potencijalnih citostatika na stanicama hepatocelularnog karcinoma HepG2.

3. MATERIJALI i METODE

Spojevi korišteni u radu derivati su itakonske kiseline. Itakonska kiselina je dikarboksilna kiselina kod koje je jedna karbonilna skupina konjugirana s egzometilenskom skupinom. Spojevi s itakonskom jezgrom su prirodni spojevi izolirani iz različitih vrsta lišajeva i gljivica. Tako je npr. cetomelična kiselina, metabolički produkt lišaja *Chaetomella,* poznata kao snažan inhibitor farnezil-transferaze te se može iskoristiti u razvoju lijekova protiv raka (Gibbs i sur., 1993.). Itakonska kiselina je prirodni spoj s Michael-akceptorskom skupinom koja je odgovorna za kovalentno vezanje lijeka na cisteinski ostatak specifičnog proteina, a to je ključno strukturno obilježje nekih protutumorskih i antivirusnih lijekova (Verbanac i sur., 2019.). Alfa-metilenska skupina itakonske kiseline je vrlo reaktivna te omogućuje povezivanje itakonskih jedinica u polimere (Zerkowski i Solaiman, 2014.). U sklopu istraživanja prof. dr. sc. Branke Zorc te suradnica Ivane Perković i Maje Beus sintetizirani su derivati itakonske kiseline **V1**, **V2**, **V3**, **V4**, **V6**, **V8**, **V9**, **MI3**, **MI5** i **MI7** u kojima je jedna karboksilna skupina itakonske kiseline esterificirana, a druga amidirana različitim aminima s benzenskim, kinolinskim ili indolskim prstenom (Shema 3.1.).

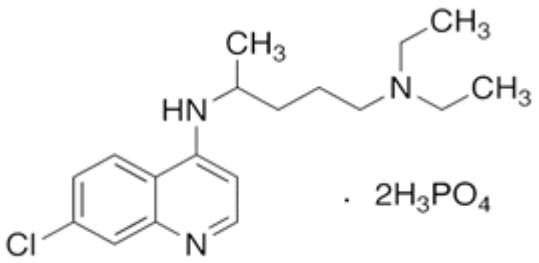




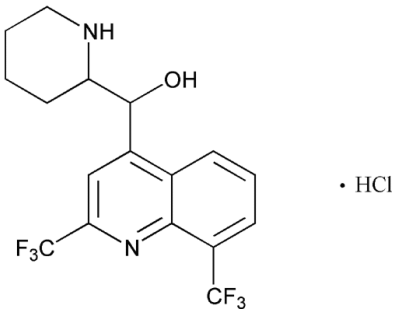
Shema 3.1. Sinteza konjugata itakonske kiseline

Za sintezu amido-esterskih konjugata **V1-V4** korišteni su kiselinski klorid monometil-itakonat i odgovarajući amin (Zorc i sur., 2019.). Za pripravu derivata **V1-V3** upotrebljeni su 4-fluoroanilin, 3-(trifluorometil)anilin odnosno 4-(trifluorometil)anilin, a za pripravu spoja **V4** 3-aminopiridin. Kao polazni spojevi za sintezu konjugata **V6**, **V8, MI3**, **MI5** i **MI7** korišteni su monometil-itakonat i odgovarajući amin, a njihova kondenzacija je provedena pomoću HATU/DIEA. Konjugat **V6** dobiven je iz 3-pikolilamina, a **V8** iz 5-metoksitriptamina. Konjugati **MI3**, **MI5** i **MI7** derivati su poznatih antimalarijskih lijekova s kinolinskom

strukturom primakina (**MI3**), klorokina (**MI5**) i meflokina (**MI7**). Naime, različiti antimalarici pokazuju izravnu ili posrednu aktivnost protiv tumorskih stanica te se kao takvi koriste u brojim kliničkim ispitivanjima protiv različitih vrsta karcinoma. Mogu se koristiti sami ili u kombinaciji s uobičajenim protutumorskim lijekovima (Zorc i sur., 2019.). Simetrični monodimer **V9** s dva amidoindolska ostatka pripremljen je iz itakonske kiseline i 2-(5-metoksi-1*H*-indol-3-il)etan-1-amina.



Slika 3.1. Strukturna formula klorokin-difosfata



Slika 3.2. Strukturna formula meflokin-hidroklorida

Tablica 3.1. Pregled spojeva korištenih u radu

Spoj	*kemijsko ime*	*molekulska formula*	*Mr*	*m (mg)*
V1	metil-3-[(4-fluorofenil) karbamonil)]but-3-enoat	$C_{12}H_{12}FNO_3$	237,23	2,6
V2	metil-3-{[3-trifluorometil)fenil] karbamonil}but-3-enoat	$C_{12}H_{12}F_3NO_3$	287,24	2,37
V3	metil-3-{[4-trifluorometil)fenil] karbamonil}but-3-enoat	$C_{12}H_{12}F_3NO_3$	287,24	2,38
V4	metil-3-[(piridin-3-il) karbamonil)]but-3-enoat	$C_{11}H_{12}N_2O_3$	220,23	4,6
V6	metil-3-{[(piridin-3-il) metil]karbamonil}but-3-enoat	$C_{12}H_{14}N_2O_3$	234,26	3,1
V8	metil-3-{[2-(5-metoksi-1*H*-indol-3-il)etil]karbamonil}but-3-enoat	$C_{17}H_{20}N_2O_4$	316,36	6,98
V9	(2*E*)-*N*'-[2-(5-metoksi-1*H*-indol-2-il)etil]-2-metilbut-2-endiamid	$C_{17}H_{30}N_4O_4$	474,56	4,98
MI3	metil-3-({4-[(6-metoksikinolin-8-il)amino]pentil}karbamoil)but-3-enoat	$C_{21}H_{27}N_3O_4$	385,46	3,45
MI5	etil-3-({4-[(7-klorokinolin-4-il) amino]butil}karbamoil)but-3-enoat	$C_{19}H_{22}ClN_3O_3$	375,85	4,56
MI7	metil-3-[(4-{[2,8-bis (trifluorometil)kinolin-4-il] amino}butil)karbamoil]but-3-enoat	$C_{21}H_{21}F_6N_3O_3$	477,40	5,09
CQ	(7-klor-4-(4-dietilamino-1-metilbutilamino)kinolin difosfat	$C_{18}H_{32}ClN_3O_8P_2$	515,86	8,64
MQ	[2,8-bis(trifluorometil)kinolin-4-il] -piperidin-2-il-metanol hidroklorid	$C_{17}H_{17}ClF_6N_2O$	414,77	1,14

3.1. HepG2 stanična linija

HepG2 stanična linija predstavlja *in vitro* model humanog hepatocelulanog karcinoma. Najčešće je korištena stanična linija u farmakotoksikološkim ispitivanjima. Stanice su adherentne, rastu prihvaćene za podlogu, i visokoproliferativne. Imaju sposobnost sinteze i

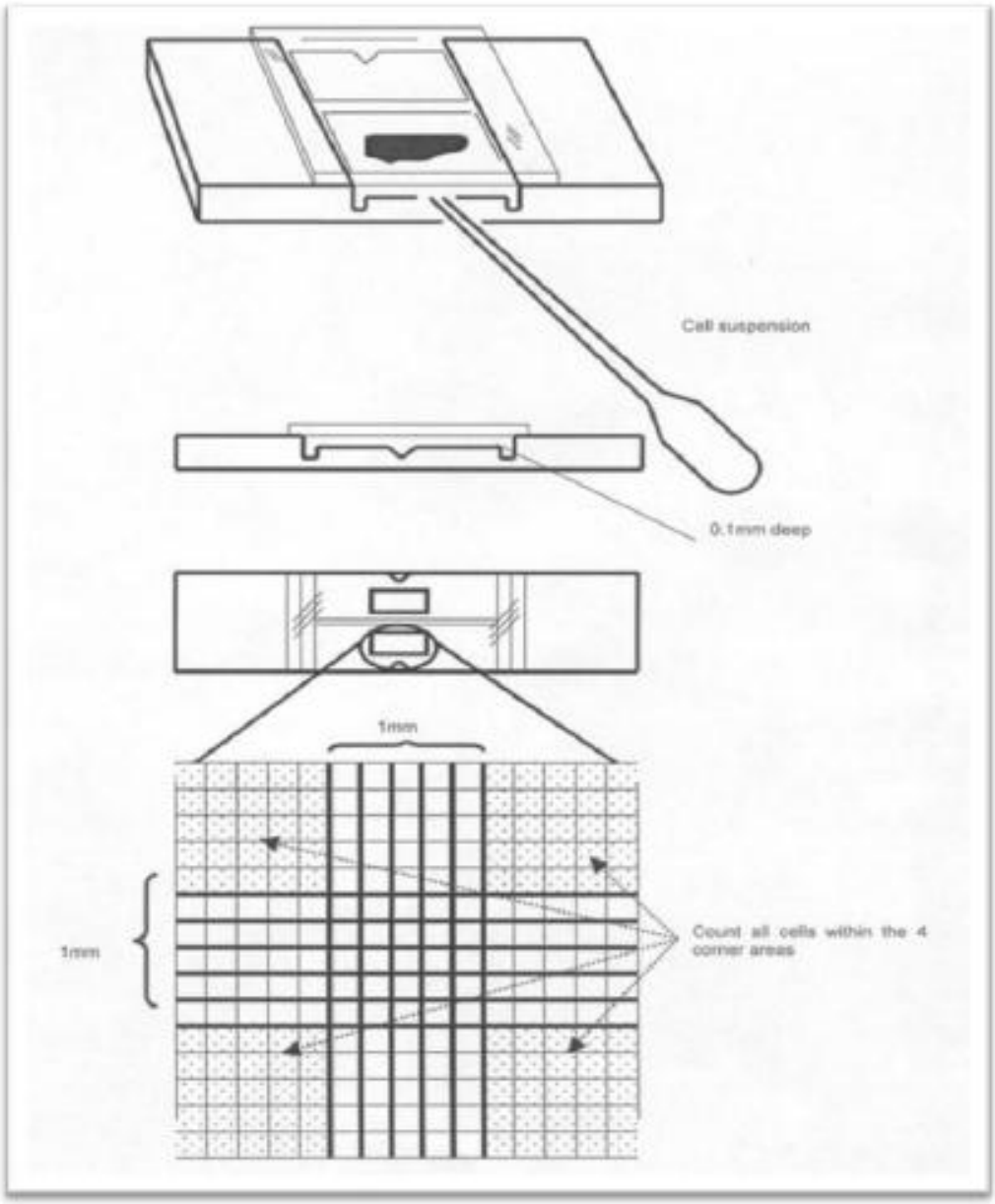
izlučivanja proteina plazme, razgradnje kolesterola i triglicerida, sinteze žučnih kiselina i glikogena. Stanice predstavljaju *in vitro* model ljudskih hepatocita, a najveći nedostatak im je njihova ograničena ekspresija enzima i transportera (Donato i sur., 2014.). Uzgojene su u DMEM mediju uz dodatak fetalnog goveđeg seruma (engl. Fetal Bovine Serum, FBS) 10 %-tne koncentracije u inkubatoru na 37 °C u atmosferi 5 % CO_2.

3.2. Uzgoj i presađivanje stanica

HepG2 stanice uzgajaju se u Dulbecco's Modifield Eagle Medium (DMEM)/F12 mediju, Sigma-Aldrich (D8437, RNBC9916) u inkubaturu IQ-650 na temperaturi 37 °C uz 5 % CO_2 i 90 % vlažnosti. Presađuju se u komori za sterilni rad, Thermo scientific, Msc-advantage, na način da se medij dekantira. Stanice se isperu sa 10 mL slane EDTA otopine (EDTA (1 mM), 0,3 g, NaCl (150 mM), 8,7 g) koja se izvuče pipetom van. Zatim se dodaju 2 mL tripsin-EDTA otopine, Sigma-Aldrich (T3924, SLBH5917). Tripsin zbog svoje proteazne aktivnosti omogućuje odvajanje stanica od stanica i odvajanje stanica od podloge na kojoj rastu. Uspješnost odvajanja stanica provjerava se pod svjetlosnim mikroskopom. Stanice se prenesu u epruveticu (falkonica). Boca se ispere s malo medija koji se također skuplja u epruvetu koji se stavlja u centrifugu, Centrifuge 5810 R, Eppendorf. Stanice se centrifugiraju 8 minuta na 300 *g*. Nakon toga se supernatant dekantira, a stanice se resuspendiraju u 10 mL medija. Željeni broj stanica resuspendiran u 10 mL medija se stavlja u bocu za uzgoj stanica, 175 cm^2, Greiner Bio-One GmbH, koja se inkubira. Za održavanje staničnih linija stanice se presađuju 2-3 puta na tjedan. Stanice korištene u pokusu presađivane su 7 puta.

3.3. Brojanje stanica

Kako bi odredio broj i vijabilnost stanica, stanice se prethodno oboje bojom triptan plavo, 0,4 % otopina u PBS, na način da se 10 µL stanica pomiješa s 90 µL boje koja oboji mrtve stanice i omogućava brojanje živih stanica koje nisu obojane jer pomoću membranskih pumpi aktivno izbacuju boju iz citoplazme. 10 µL te suspenzije se nanese na Neubauerovu komoricu za brojanje stanica, ImProved Neubauer MillScience.



Slika 3.3. Shematski prikaz Neunebauerove komorice i princip brojanja stanica

Stanice se broje pomoću mikroskopa, Zeiss, Axiovert S100, u 3 kvadranta površine 1 mm^2 pazeći pritom da su uključene stanice koje se nalaze na lijevom i gornjem rubu dok isključujemo stanice koje se nalaze na desnom i donjem rubu. Broj stanica računa se prema formuli:

$$\frac{\text{ukupan broj stanica u 3 velika kvadrata}}{3} \times 10 \times 10\,000 = \text{broj stanica/mL}$$

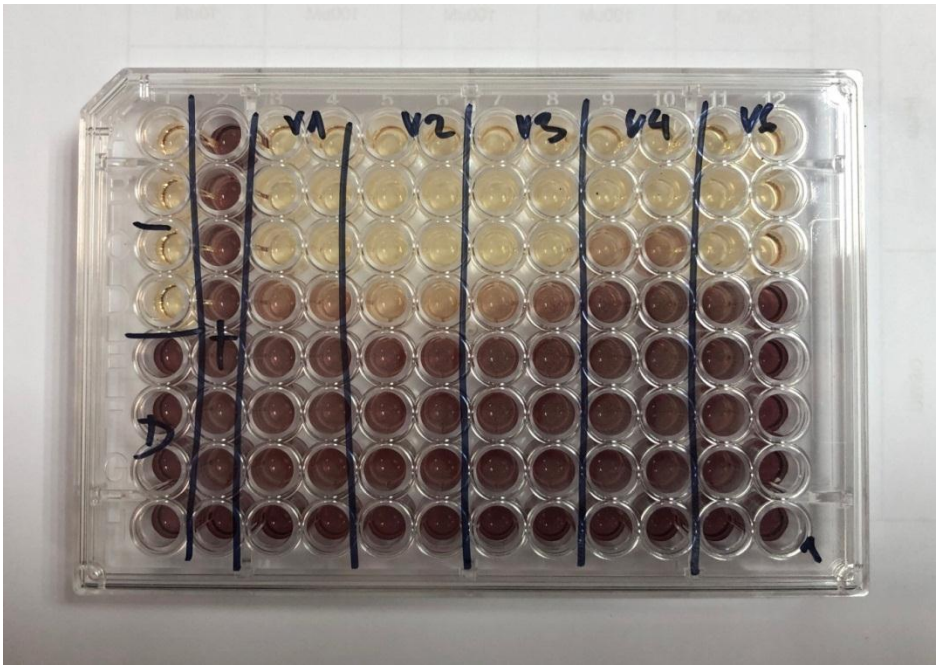
HepG2 stanice nasađene su na pločice s 96 jažica, Sigma-Aldrich, Cell Culture Plate with Lid, SIAL0596. Za tretiranje korišteno je 35 000 stanica po jažici. Stanice karcinoma se tretiraju sa prethodno pripremljenim otopinama sintetskih spojeva u koncentracijama 100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM, 6 μM, 3 μM, 1,5 μM i 0,8 μM. Kao negativna kontrola koristi se medij (DMEM), a kao pozitivna kontrola suspenzija stanica. Kao kontrola koristi se i DMSO, otapalo u kojem su otopljeni spojevi, budući da je u visokim koncentracijama i sam toksičan. Radi se u duplikatu. Ploče se inkubiraju preko noći na 37 °C u atmosferi 5 % CO_2.

3.4. Test citotoksične aktivnosti

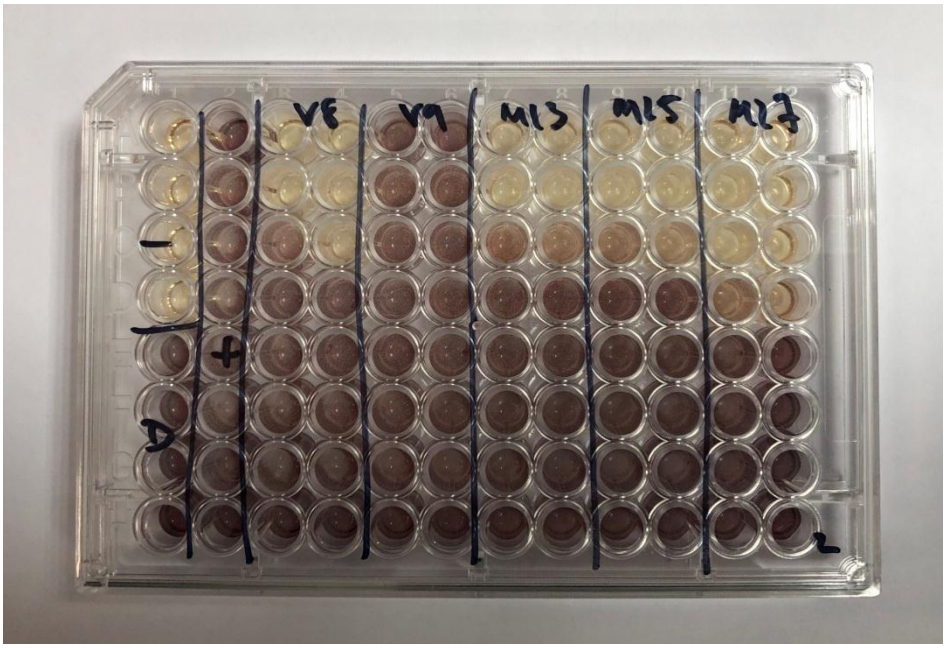
Život i proliferacija stanica određena je mjerenjem staničnog metabolizma koristeći MMT metodu. MTT je prah žute boje koji se pripremi otapanjem u fosfatnom puferu (PBS). Metabolički aktivne stanice pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan dok odumrle stanice nemaju sposobnost pretvorbe MTT-a. Mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektorne do MTT-a (Sylvester, 2011). Nakon dodatka MTT-a, ploče se inkubiraju 1 sat na 37 °C u atmosferi 5 % CO_2. Količina formazana, koja je vjerojatno proporcionalna broju živih stanica, mjeri se spektrofotometrijski na 490 nm na UV-Vis spektrofotometru SpectraMax i3.

4. REZULTATI

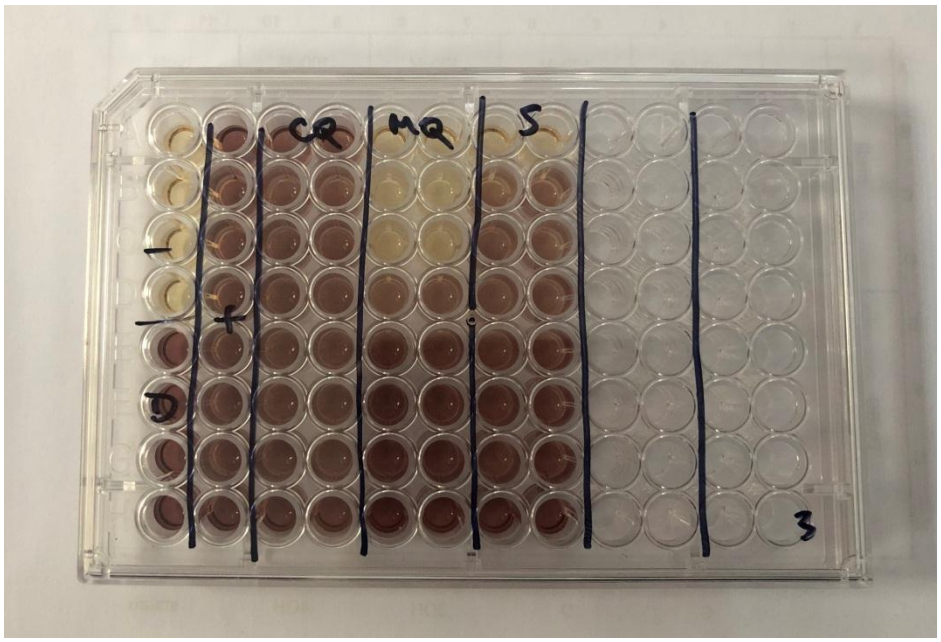
U ovom istraživanju korištena je kultura stanica hepatocita humanog karcinoma jetre HepG2, koja je tretirana s 13 sintetskih spojeva: 10 derivata itakonske kiseline, klorokin-difosfatom, meflokin-hidrokloridom i staurosporinom u koncentracijama 100, 50, 25, 12,5, 6, 3, 1,5 i 0,8 μM. Staurosporin, inhibitor protein kinaza, često se koristi u istraživanjima kao standardni agens koji inducira staničnu smrt. Ispitivala se citotoksičnost tih sintetskih spojeva nakon 24 sata inkubacije u vlažnoj atmosferi pri 37 ^{o}C i 5 % CO_2. Preživljavanje stanica određeno je pomoću MTT testa.



Slika 4.1. Mikrotitarska pločica s obojenim medijem za spektrofotometrijsku analizu spojeva **V1**, **V2**, **V3**, **V4**, **V6**

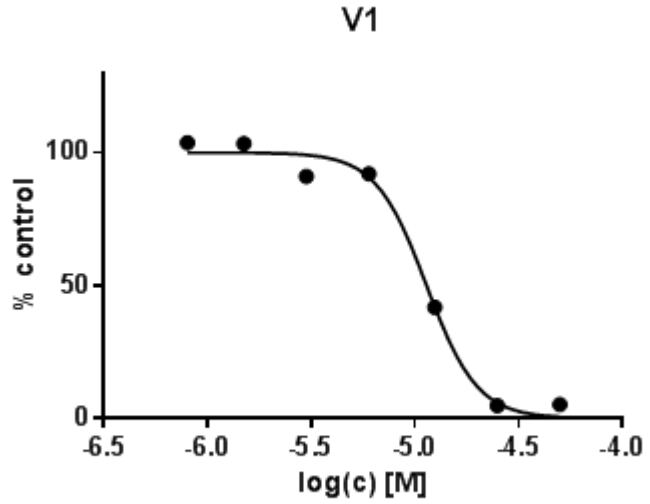


Slika 4.2. Mikrotitarska pločica s obojenim medijem za spektrofotometrijsku analizu spojeva **V8**, **V9**, **MI3**, **MI5**, **MI7**

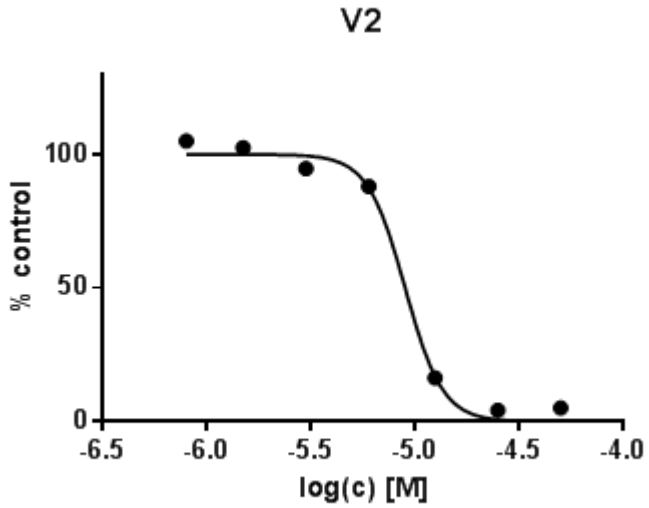


Slika 4.3. Mikrotitarska pločica s obojenim medijem za spektrofotometrijsku analizu spojeva **CQ**, **MQ**, **S**

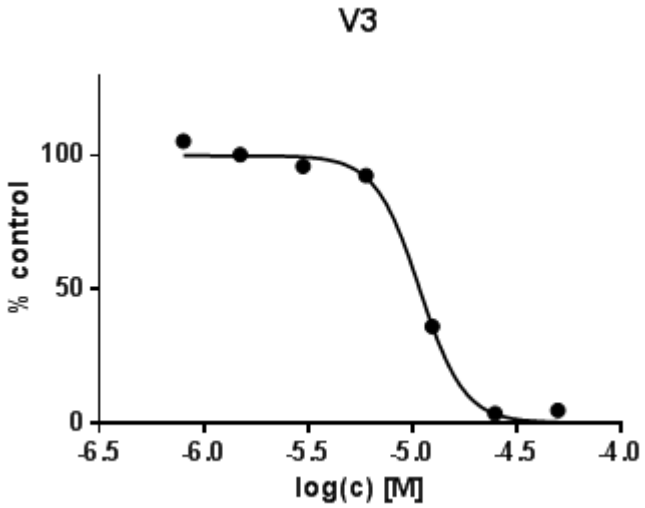
Rezultati dobiveni ispitivanjem anilinskih derivata prikazani su na Grafovima 4.1., 4.2. i 4.3. Radi lakše usporedbe citotoksičnosti, u Tablici 4.1. navedene su njihove IC_{50} vrijednosti koje predstavljaju koncentraciju spoja koja ubija 50 % ispitivanih stanica.



Graf 4.1. Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja **V1**



Graf 4.2. Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja **V2**

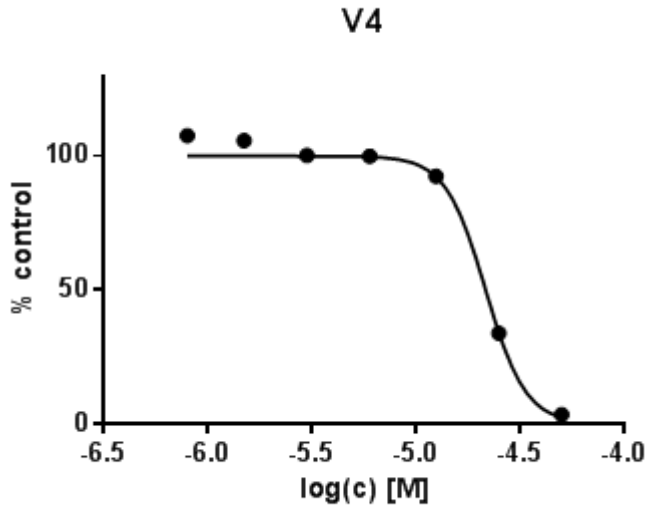


Graf 4.3. Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja **V3**

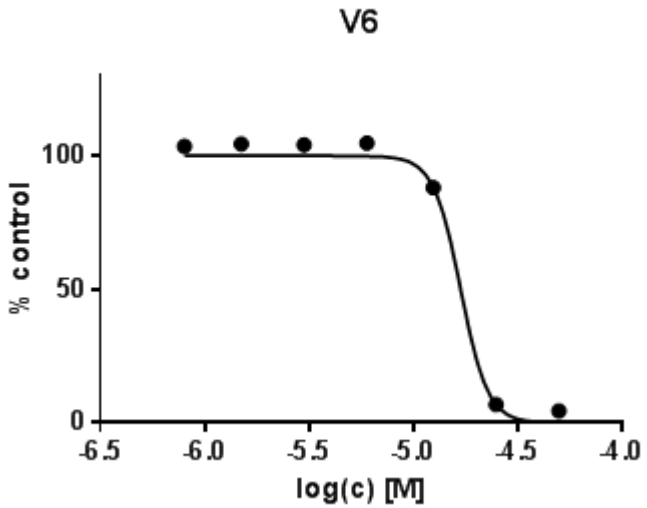
Tablica 4.1. Citotoksična aktivnost spojeva **V1**, **V2** i **V3** ispitana na kulturi stanica hepatocita humanog karcinoma jetre HepG2

Spoj	*IC_{50} (μM)*
V1	11,39
V2	8,97
V3	10,88

Rezultati dobiveni ispitivanjem piridinskih derivata prikazani su na Grafovima 4.4. i 4.5., a u Tablici 4.2. prikazane su njihove IC_{50} vrijednosti.



Graf 4.4. Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja **V4**

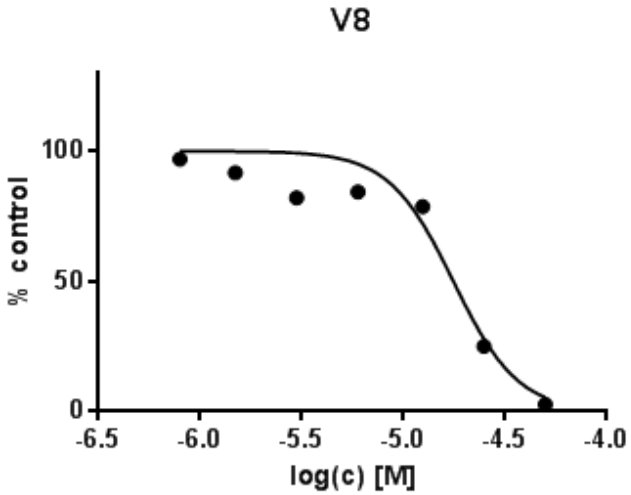


Graf 4.5. Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja **V6**

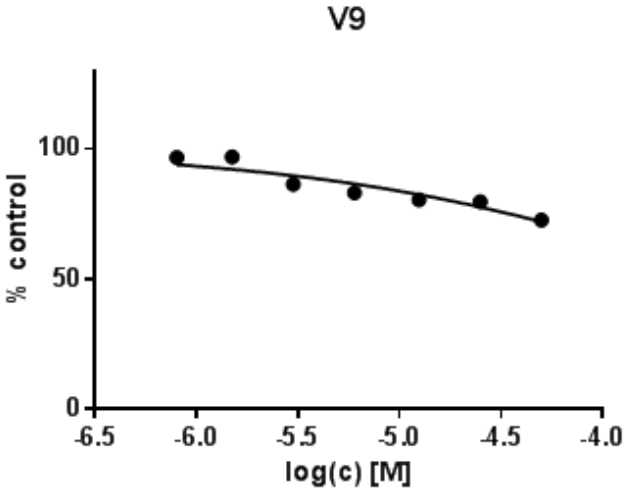
Tablica 4.2. Citotoksična aktivnost spojeva **V4** i **V6** ispitana na kulturi stanica hepatocita humanog karcinoma jetre HepG2

Spoj	*IC_{50} (μM)*
V4	2,16
V6	16,92

Rezultati dobiveni ispitivanjem indolskih derivata prikazani su na Grafovima 4.6. i 4.7., a u Tablici 4.3. prikazane su njihove IC_{50} vrijednosti.



Graf 4.6. Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja **V8**

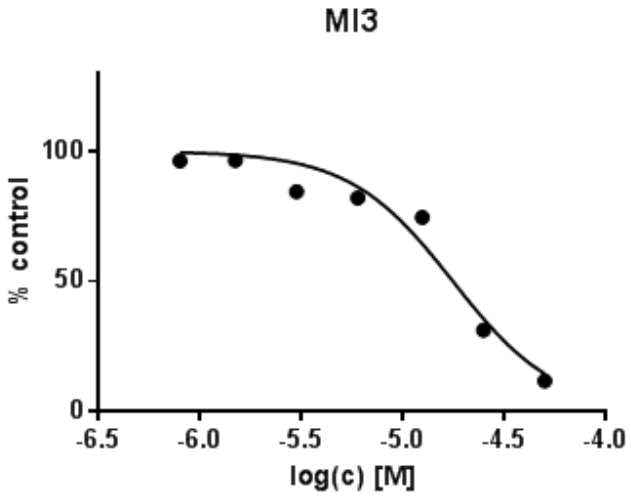


Graf 4.7. Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja **V9**

Tablica 4.3. Citotoksična aktivnost spojeva **V8** i **V9** ispitana na kulturi stanica hepatocita humanog karcinoma jetre HepG2

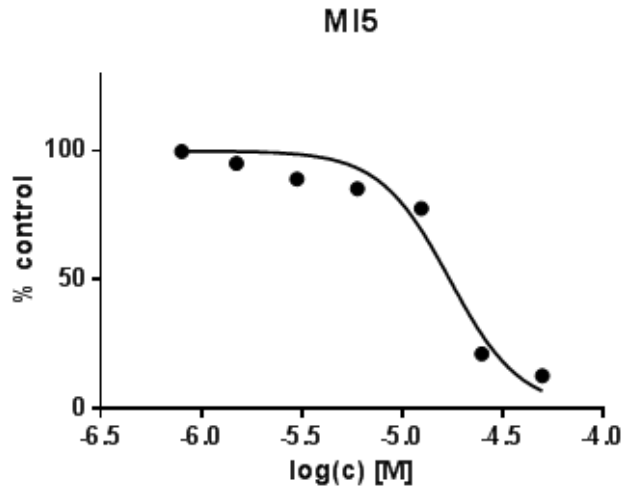
Spoj	*IC_{50} (μM)*
V8	17,67
V9	>100

Rezultati dobiveni ispitivanjem kinolinskih derivata prikazani su na Grafovima 4.8, 4.9., 4.10 i 4.11. a u Tablici 4.4. prikazane su njihove IC_{50} vrijednosti.

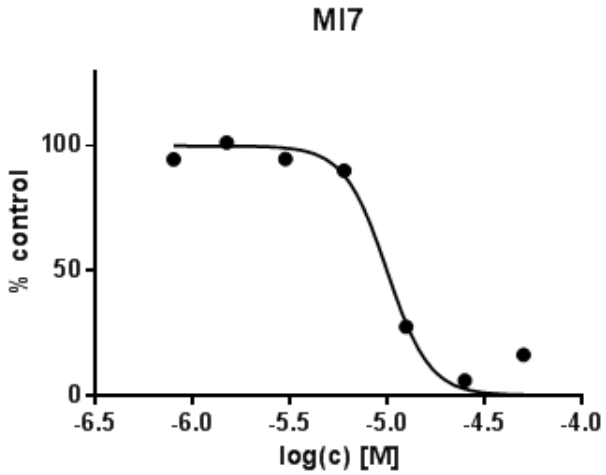


Graf 4.8. Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja **MI3**

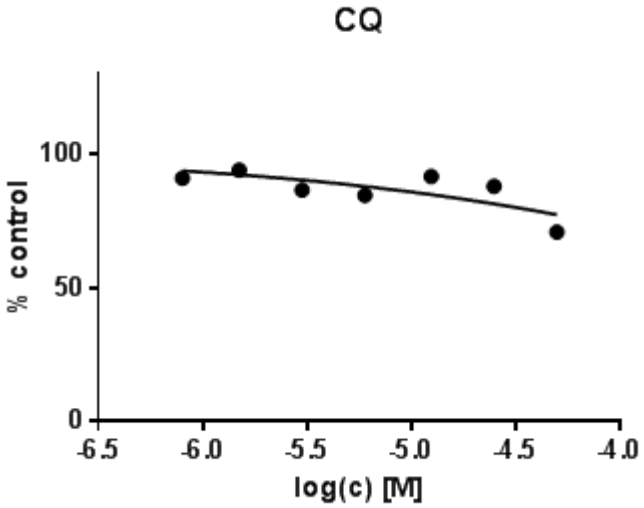
.



Graf 4.9. Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja **MI5**



Graf 4.10. Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja **MI7**

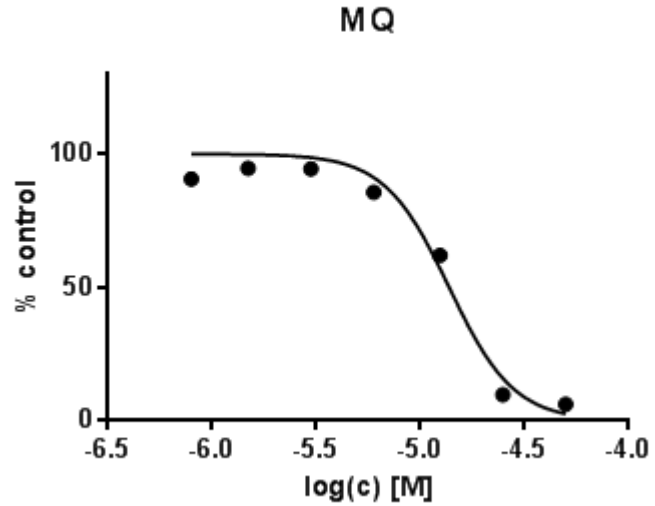


Graf 4.11. Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja **CQ**

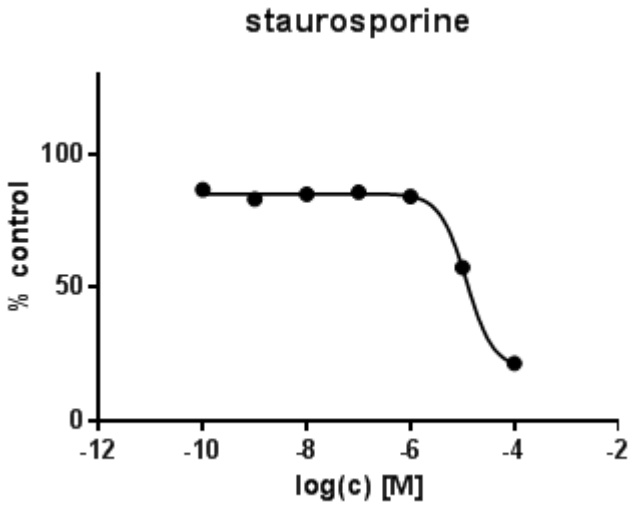
Tablica 4.4. Citotoksična aktivnost spojeva **MI3**, **MI5**, **MI7 i CQ** ispitana na kulturi stanica hepatocita humanog karcinoma jetre HepG2

Spoj	*IC_{50} (μM)*
MI3	17,67
MI5	17,3
MI7	9,95
CQ	>100

Rezultati dobiveni ispitivanjem meflokin-hidroklorida i staurosporina prikazani su na Grafovima 4.12. i 4.13., a u Tablici 4.6. prikazane su njihove IC_{50} vrijednosti.



Graf 4.12. Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji spoja **MQ**



Graf 4.13. Postotak preživjelih stanica ovisno o koncentraciji staurosporina

Tablica 4.5. Citotoksična aktivnost spojeva MQ i staurosporina ispitana na kulturi stanica hepatocita humanog karcinoma jetre HepG2

Spoj	*IC_{50} (μM)*
MQ	13,81
Staurosporin	11,98

Tablica 4.6. Citotoksična aktivnost spojeva ispitana na kulturi stanica hepatocita humanog karcinoma jetre HepG2

Spoj	*IC_{50} (μM)*
V1	11,39
V2	8,97
V3	10,88
V4	2,16
V6	16,92
V8	17,67
V9	>100
MI3	17,67
MI5	17,3
MI7	9,95
CQ	>100
MQ	13,81
Staurosporin	11,98

5. RASPRAVA

Rak kao jedan od najvećih javnozdravstvenih problema današnjice drugi je najčešći uzrok smrti (www.who.int). Čimbenici rizika za nastanak malignih oboljenja su dob, rasa, spol, socioekonomski status i geografski smještaj. Broj oboljelih osoba u stalnom je porastu, što je rezultat povećanog očekivanja trajanja života i većeg broja osoba koje dostižu godine života u kojima se maligne bolesti češće pojavljuju (Stubblefield i O'Dell, 2009.). Unutar tumora nastaju brojne promjene te zbog toga postojeća kemoterapija često nije dovoljno učinkovita. Do malignih transformacija može doći uslijed aktivacije protoonkogen i nastanka onkogena koji potiču stanični rast u tumorskim stanicama. Uzrok nastanka tumora može biti i smanjena aktivnost tumorsupresorskih gena, od kojih su najvažniji RB-1 i TP53. Uslijed mutacija DNA popravljačkih enzima, oštećenja DNA mogu se prenijeti na novostvorene stanice i tako doprinijeti nastanku i razvoju tumora. Rastu tumora doprinose i promjene u putevima programirane stanične smrti koja je zadužena u održavanju homeostaze između starih stanica i novostvorenih stanica (Damjanov i sur., 2018.).

Otpornost stanica raka na kemoterapiju glavni je razlog njene nedovoljne učinkovitosti. Stanice raka razvijaju višestruke, složene mehanizme za izbjegavanje lijekovima izazvane citotoksičnosti (Rebucci i Michiels, 2013.). Kako bi se povećala učinkovitost terapije, traže se novi lijekovi i nove strategije liječenja. Sve češće se primijenjuje ciljana terapija usmjerena prvenstveno na tumorske stanice. No ciljni lijekovi nisu pokazali značajan napredak u liječenju te je klasična kemoterapija i dalje najčešći oblik liječenja liječenja (Katzung, 2018.).

Cilj ovog rada bio je ispitati citototoksičnost novosintetiziranih derivata itakonske kiseline koji bi se mogli koristiti kao potencij

alni citostatici. Itakonska kiselina kao Michaelov akceptor kovalentno se veže na cisteinske ostatke specifičnih proteina. To svojstvo imaju tirozin kinazni inhibitori epidermalnog faktora rasta (EGFR-TKI) afatinib, neratinib, osimertinib, ibrutinib koji se koriste u terapiji karcinoma (Zorc i sur., 2019.). U ovom radu ispitana je citotoksičnost 10 derivata itakonske kiseline, klorokin-difosfata, meflokin- hidroklorida i staurosporina koji se koristi kao standard. Njihova citotoksičnost ispitana je na stanicama hepatocita humanog karcinom jetre HepG2. Ova stanična linija izabrana je kao modelni sistem za testiranje novih spojeva jer je jednostavna za obradu, zadržava mnoge morfolške karakteristike parenhimskih stanica jetre te sadrži nekoliko enzima odgovornih za aktivaciju različitih ksenobiotika (Senthilraja i Kathiresan, 2015.).

Rezultati pokazuju razliku u citotoksičnosti između anilinskih derivata. Među njima je najtoksičniji spoj **V2**, a od spoja **V3** razlikuje se samo po položaju trifluorometilne skupine. Od ispitivanih spojeva najtoksičniji je piridinski derivat **V4.** Spoj **V6** u svojoj strukturi također sadrži piridinski prsten koji je od amidne skupine odvojen jednim ugljikovim atomom i samim time pokazuje smanjenu citotoksičnost. Spoj **V8** sadrži indolski prsten, kao i spoj **V9** koji je simetrični homodimer i kao takav ne pokazuje značajnu toksičnost. Konjugat **MI3** derivat je primakina te pokazuje značajniji citotoksični učinak od klorokin-difosfata. Amido-esteri **MI5** i **MI7** derivati su klorokina, odnosno meflokina. Veću aktivnost na ispitivanu staničnu liniju karcinoma pokazao je **MI5** s klorom na položaju 7 kinolinskog prstena.

Na temelju dobivenih rezultata možemo pretpostaviti kako bi spoj **V4** mogao biti baza za razvoj novog protutumorskog lijeka.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih spektrofotometrijskim mjerenjem nastalog formazana kao produkta u metabolički aktivnim, vijabilnim stanicama linije HepG2 koja je prethodno tretirana s derivatima itakonske kiseline, klorokin-difosfatom, meflokin-hidrokloridom i staurosporinom u koncentracijskom nizu od 8 različitih koncentracija, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

.

- Svi ispitivani spojevi toksični su u određenim koncentracijama za stanice hepatocelularnog karcinoma HepG2.

- Najtoksičniji spoj je **V4** čija IC_{50} iznosi 2,16 μM.

- Spojevi **V9** i klorokin ne pokazuju značajnu toksičnost. Njihova IC_{50} iznosi 100 μM.

7. LITERATURA

Atale N., Gupta S., Yadav U. C. S., Rani V. (2014). Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *J. Microsc.*, 255(1), 7–19.

Aydin S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using Elisa, *Peptides*, 72, 4-15.

Barbezan A. B., Martins R., Bueno J. B., Villavicencio A. L. C. H. (2017). Ames Test to Detect Mutagenicity of 2-Alkylcyclobutanones: A Review. *J. Food Sci.*, 82(7), 1518-1522.

Cancer, https://www.who.int/, pristupljeno: 27.03.2020.

Chen X., Ji Z. L., Chen Y. Z. (2002). TTD: Therapeutic Target Database. *Nucleic Acids Res.* 30, 412–415.

Damjanov I., Seiwerth S., Jukić S., Nola M. Patologija, Peto izdanje, Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 149-191.

Darzynkiewicz Z., Galkowski D., Zhao H. (2008). Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*, 44(3), 250–254.

Donato M. T., Tolosa L., Gómez-Lechón M. J. (2014). Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods Mol. Biol.*, 77–93.

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 35(4), 495–516.

Frey T. (1995). Nucleic acid dyes for detection of apoptosis in live cells. *Cytometry*, 21, 265-274.

Gibbs J.B., Pompliano D.L., Mosser S.D., Rands E., Lingham R.B., Singh S.B., Scolnick E.M., Kohl N.E., Oliff, A. (1993). Selective inhibition of farnesyl-protein transferase blocks Ras processing *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 268, 7617–7620.

Gowder S. J. T.: New Insights into Toxicity and Drug Testing, *InTech*, 2013, str. 123-130.

HALMED, Farmakovigilancija, Kako prijaviti nuspojavu, http://www.halmed.hr, pristupljeno 28. 4. 2020.

Hanahan D., Weinberg R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.

Hughes J., Rees S., Kalindjian S., Philpott K. (2011). Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol*., 162(6), 1239–1249.

Jeggo A. P., Pearl H. L., Carr A. A. (2016). DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective, *Nat. Rev. Cancer*, 16(1), 35-42.

Jones G., Willett P., Glen R. C., Leach A. R., Taylor R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking, Edited by F. E. Cohen. *J. Mol. Biol*., 267(3), 727–748.

Jones K. H., Senft J. A. (1984.). An Improved Method to Determine Cell Viability by Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide. *J. Histochem. Cytochem*, 31(1), 77-79.

Katzung G. B. Basic and Clinical Pharmacology, Četrnaesto izdanje, Mc Graw Hill Education, 2018, str. 10-13.

Kim BM, Rode AB, Han EJ, Hong IS, Hong SH (2012). 5-Phenylselenyl- and 5-methylselenyl-methyl-2′-deoxyuridine induce oxidative stress, DNA damage, and caspase-2-dependent apoptosis in cancer cells. Apoptosis 17(2), 200–216.

Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3(11), 935-949.

Kubinyi H. (2003). Drug Research: Myths, Hype and Reality, *Nat. Rev. Drug Discov*., 2(8), 665–668.

Kumar P., Nagarajan A., Uchil P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor Protoc*., 2018(6).

Kyrylkova K., Kyryachenko S., Leid M., Kioussi C. (2012). Detection of Apoptosis by TUNEL Assay. *Methods Mol. Bio*., 41–47.

Leach A. R., Hann M. M.(2000). The *in silico* world of virtual libraries. *Drug Discov. Today*, 5(8), 326–336.

Lomakina G. Y., Modestova Y. A., Ugarova N. N. (2015). Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry (Mosc.)*, 80(6), 701–713.

Majtnerová P., Roušar T. (2018). An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol. Bio. Rep*., 45(5), 1469-1478.

Molecular Networks GmbH, http://www.mol-net.de/software/tautomer, pristupljeno: 18.3.2020.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65(1-2), 55–63.

Mršić-Krmpotić Z., Roth A.i sur.: Internistička onkologija, Medicinska naklada Zagreb, 2004.

Mutschler E., Derendorf H. (1995). Drug Actions: Basic Principles and Therapeutic Aspects, ed. CRC Press, Stuttgart.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard M7–A5, 5th ed., National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 2000.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, www.oecd-ilibrary.org, pristupljeno 20. 3. 2020.

Olive P. L., Banath J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc*., 1(1), 23–29.

Olive P. L., Frazer G, Banath J. P. (1993). Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat Res*, 136(1), 130–136.

Patrick L. G.: An Introduction to Medicinal Chemistry, Peto izdanje, Oxford University Press, 2013, str. 277-281.

Präbst K., Engelhardt H., Ringgeler S., Hübner H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol. Biol*., 1–17.

Rebucci M., Michiels C. (2013). Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem. Pharmacol*., 85(9), 1219–1226.

Riss T. L., Moravec R. A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating, density in cell-based cytotoxicity assays. Assay. *Drug Dev. Technol*. 2, 51-62.

Rydberg B, Johnson JK (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. *Elsevier Inc*., 465-468.

Saini R. K., Chauhan R., Bagri L. P., Bajpai A. K. (2012). Strategies of targeting tumors and cancers. *J. Cancer Res.Updates* 1, 129 - 152.

Seethala, R. (2000). Fluorescence Polarization Competition Immunoassay for Tyrosine Kinases. *Methods*, 22(1), 61–70.

Seneci P., Miertus S. (2000). Chombinatorial Chemistry and High-Throughput Screening in Drug Discovery: Different Strategies and Formats. *Mol. Divers*., 5(2), 75–89.

Senthilraja P., Kathiresan K. (2015). In vitro cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF -7 cell lines study of Marine Yeast. *J. Appl. Pharm. Sci*., 5(3), 80-84.

Shama G., Malik D. J. (2013) The uses and abuses of rapid bioluminescencebased ATP assays. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 115-125.

Slater K. (2001). Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. *Curr. Opin. Biotechnol*., 12, 79-74.

Stoddart, M. J. (2011). Cell Viability Assays: Introduction. *Methods Mol. Biol*., 1–6.

Stubblefield M. D., O'Dell M. W. (2009). Cancer Rehabilitation: Principles and Practice. *Demos Medical Publishing*, str. 161-167.

Suman, S., Pandey, A., Chandna, S. (2011). An improved non-enzymatic "DNA ladder assay" for more sensitive and early detection of apoptosis. *Cytotechnology*, 64(1), 9–14.

Sylvester P. W. (2011). Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. *Drug Des. Discov*., 157–168.

Verbanac D., Jelić D., Stepanić V., Tatić I., Žiher D., Koštrun S. (2005). Combined in silico and in vitro Approach to Drug Screening. *Croat. Chem. Acta*, 78(2), 133-139.

Vermes I., Haanen, C. Steffens-Nakken, H., Reutellingsperger C. (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods*, 184(1), 39–51.

Walsh B., Henderson D. (2004). Microarrays and Beyond: What Potential Do Current and Future Genomics Tools Have for Breeders. *J. Anim. Sci*. 82, 292– 299.

Waszkowycz B., Perkins T. D. J., Sykes R. A., Li J. (2001). Large-scale virtual screening for discovering leads in the postgenomic era. *IBM Syst. J*. 40, 360–378.

Wiegand I., Hilpert K., Hancock E W R. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc*., 3, 163-175.

Wong SY R. (2011). Apoptosis in Cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res*., 30(1), 87.

Zerkowski J.A., Solaiman D. K. Y. (2014). 2-Fatty acrylic acids: New highly derivatizable lipophilic platform molecules. *J. Am. Oil Chem. Soc*., 91, 1225–1233.

Zorc B., Perković I., Beus M., Schols D., Persoons L., Uzelac L., Kralj M. (2019). Itaconic acid conjugates as potential anticancer and antiviral agents. Hrvatsko farmaceutsko drustvo, 175-175.

Zugazagoitia J., Guedes C., Ponce S., Ferrer I., Molina-Pinelo S., Paz-Ares L. (2016). Current Challenges in Cancer Treatment. *Clin. Ther*., 38(7), 1551–1566.

8. SAŽETAK

Razvoj lijekova složen je proces. Započinje probirom molekula pomoću računalnog modeliranja čime se izdvajaju molekule s potencijalnim ljekovitim djelovanjem. Slijede i*n vitro* ispitivanja koja se najčešće provode na specifičnim tkivima ili stanicama. Od velike su važnosti jer ukoliko molekule ne pokažu željenu aktivnost, daljni razvoj molekule se obustavlja, ne provode se *in vivo* i klinička ispitivanja. Test citotoksičnosti spada u skupinu *in vitro* ispitivanja i ključan je u razvoju citostatika. Citostatici djeluju na način da ubijaju tumorske stanice. Neselektivni su, odnosno toksični i za zdrave stanice pa izazivaju teške nuspojave. Smanjenjem doze citostatika, smanjuju se i nuspojave. Zbog nedovoljne učinkovitosti postojećih terapija tumora, znanstvenici su u potrazi za novim, učinkovitijim lijekovima.

Tema ovog diplomskog rada bila je ispitati citotoksičnost derivata itakonske kiseline kao potencijalnih citostatika. Ispitivanje je provedeno na stanicama hepatocelularnog karcinoma HepG2. Stanice su tretirane otopinom sintetskih spojeva u različitim koncentracima (100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM, 6 μM, 3 μM, 1,5 μM, 0,8 μM). Vijabilnost stanica određena je pomoću MTT testa u kojem metabolički aktivne stanice pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan, dok mrtve nemaju tu sposobnost. Količina nastalog formazana koja je proporcionalna broju živih stanica određena je spektrofotometrijski. Radi lakše usporedbe citotoksičnosti, rezultati su prikazani u obliku IC_{50} vrijednosti. Svi ispitivani spojevi citotoksični su za stanice hepatocelularnog karcinoma HepG2. Najučinkovitiji je spoj **V4** koji je toksičan već pri niskim koncentracijama. To saznanje je bitno jer bi se mogao primjenjivati u niskim dozama ukoliko prođe ostale faze razvoja.

SUMMARY

Drug development is a complex process. It begins with the screening of molecules by computer modeling, by which the molecules with potential therapeutic effects are isolated. It is followed by *in vitro* experiments which are usually carried out on specific tissues or cells. These experiments are of great importance because if the tested molecules do not show the desired activity, further development of the molecules is halted and *in vivo* and clinical trials are not performed. The cytotoxicity test, which is crucial in the development of cytostatics, belongs to the group of *in vitro* studies. Cytostatics act by killing tumor cells. They are non-selective, i.e. toxic to healthy cells and cause severe side effects. Therefore, by reducing the dose of cytostatics, side effects are also reduced. Due to the lack of effectiveness of existing tumor therapies, scientists are looking for new, more effective drugs.

The topic of this thesis was to test the cytotoxicity of itaconic acid derivatives as potential cytostatics. The study was performed on hepatocellular carcinoma HepG2 cells. Cells were treated with a solution of synthetic compounds in various concentrations (100 μM, 50 μM, 25 μM, 12.5 μM, 6 μM, 3 μM, 1.5 μM, 0.8 μM). Cell viability was determined by using an MTT assay in which metabolically active cells convert MTT to a purple-colored compound formazan, whereas the dead ones lack this ability. The amount of produced formazan, which is proportional to the number of living cells, is determined spectrophotometrically. To simplify cytotoxicity comparisons, the results are presented in the form of IC_{50} values. All test compounds were cytotoxic for hepatocellular carcinoma cells HepG2. The most effective compound, toxic even at low concentrations, is **V4**. This finding is important because if the compound passes other stages of the development, it could be administered at low doses.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva ulica 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Ispitivanje citotoksičnosti derivata itakonske kiseline kao potencijalnih citostatika na HepG2 staničnoj liniji

Ivana Horvat

SAŽETAK

Razvoj lijekova složen je proces. Započinje probirom molekula pomoću računalnog modeliranja čime se izdvajaju molekule s potencijalnim ljekovitim djelovanjem. Slijede i*n vitro* ispitivanja koja se najčešće provode na specifičnim tkivima ili stanicama. Od velike su važnosti jer ukoliko molekule ne pokažu željenu aktivnost, daljni razvoj molekule se obustavlja, ne provode se *in vivo* i klinička ispitivanja. Test citotoksičnosti spada u skupinu *in vitro* ispitivanja i ključan je u razvoju citostatika. Citostatici djeluju na način da ubijaju tumorske stanice. Neselektivni su, odnosno toksični i za zdrave stanice pa izazivaju teške nuspojave. Smanjenjem doze citostatika, smanjuju se i nuspojave. Zbog nedovoljne učinkovitosti postojećih terapija tumora, znanstvenici su u potrazi za novim, učinkovitijim lijekovima. Tema ovog diplomskog rada bila je ispitati citotoksičnost derivata itakonske kiseline kao potencijalnih citostatika. Ispitivanje je provedeno na stanicama hepatocelularnog karcinoma HepG2. Stanice su tretirane otopinom sintetskih spojeva u različitim koncentracima (100 μM, 50 μM, 25 μM, 12,5 μM, 6 μM, 3 μM, 1,5 μM, 0,8 μM). Vijabilnost stanica određena je pomoću MTT testa u kojem metabolički aktivne stanice pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan, dok mrtve nemaju tu sposobnost. Količina nastalog formazana koja je proporcionalna broju živih stanica određena je spektrofotometrijski. Radi lakše usporedbe citotoksičnosti, rezultati su prikazani u obliku IC_{50} vrijednosti. Svi ispitivani spojevi citotoksični su za stanice hepatocelularnog karcinoma HepG2. Najučinkovitiji je spoj **V4** koji je toksičan već pri niskim koncentracijama. To saznanje je bitno jer bi se mogao primjenjivati u niskim dozama ukoliko prođe ostale faze razvoja.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranice, 20 grafičkih prikaza, 7 tablica i 59 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: citotoksičnost, derivati itakonske kiseline, protutumorski spojevi

Mentor: **Prof. dr. sc. Karmela Barišić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Komentor: **Dr. sc. Mario Matijašić**, *znanstveni suradnik Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Karmela Barišić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Prof. dr. sc. Branka Zorc, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Mario Matijašić, *znanstveni suradnik Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of medicinal biochemistry and hematology
2 Domagojeva Street, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Cytotoxicity testing of itaconic acid derivatives as potential cytostatics on HepG2 cell line

Ivana Horvat

SUMMARY

Drug development is a complex process. It begins with the screening of molecules by computer modeling, by which the molecules with potential therapeutic effects are isolated. It is followed by *in vitro* experiments which are usually carried out on specific tissues or cells. These experiments are of great importance because if the tested molecules do not show the desired activity, further development of the molecules is halted and *in vivo* and clinical trials are not performed. The cytotoxicity test, which is crucial in the development of cytostatics, belongs to the group of *in vitro* studies. Cytostatics act by killing tumor cells. They are non-selective, i.e. toxic to healthy cells and cause severe side effects. Therefore, by reducing the dose of cytostatics, side effects are also reduced. Due to the lack of effectiveness of existing tumor therapies, scientists are looking for new, more effective drugs. The topic of this thesis was to test the cytotoxicity of itaconic acid derivatives as potential cytostatics. The study was performed on hepatocellular carcinoma HepG2 cells. Cells were treated with a solution of synthetic compounds in various concentrations (100 μM, 50 μM, 25 μM, 12.5 μM, 6 μM, 3 μM, 1.5 μM, 0.8 μM). Cell viability was determined by using an MTT assay in which metabolically active cells convert MTT to a purple-colored compound formazan, whereas the dead ones lack this ability. The amount of produced formazan, which is proportional to the number of living cells, is determined spectrophotometrically. To simplify cytotoxicity comparisons, the results are presented in the form of IC_{50} values. All test compounds were cytotoxic for hepatocellular carcinoma cells HepG2. The most effective compound, toxic even at low concentrations, is **V4**. This finding is important because if the compound passes other stages of the development, it could be administered at low doses.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 42 pages, 20 figures, 7 tables and 59 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Cytotoxicity, itaconic acid derivates, anti-cancer compounds

Mentor: **Karmela Barišić**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Co-Mentor: **Mario Matijašić**, **Ph.D.** *Research associate,,* University of Zagreb School of Medicine

Reviewers: **Karmela Barišić**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Branka Zorc, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mario Matijašić, **Ph.D.** *Research associate,,* University of Zagreb School of Medicine

The thesis was accepted: June 2020.