

Mehanizam djelovanja krunastog etera 613 na stanične linije dojke

Gabrilo, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:596076>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Jelena Gabrilo

**Mehanizam djelovanja krunastog etera 613 na stanične
linije dojke**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju Zavoda za molekularnu medicinu, na Institutu Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Katje Ester. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, dr. sc. Katji Ester, na strpljenju i trudu te mnogobrojnim savjetima i pomoći prilikom rada i pisanja, a naročito zbog toga što joj je uvijek bilo stalo. Hvala što ste me naučili brojnim korisnim stvarima tijekom rada u laboratoriju koje su mi pomogle učvrstiti temelje na kojima ću graditi svoju daljnju karijeru.

Upućujem zahvalu doc. dr. sc. Ingi Marijanović na dobivenim savjetima.

Veliko hvala i dr. sc. Marijeti Kralj koja mi je omogućila da izradim svoj diplomski rad u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju te mi na taj način pružila priliku da sudjelujem u ovom istraživanju. Hvala i ostalim članovima laboratorija.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Maji Matulić na pruženoj pomoći i savjetima.

Najveću zahvalu želim uputiti svojim roditeljima i sestri na neizmjernoj podršci i ljubavi koju su mi pružali svo ovo vrijeme. Hvala što ste vjerovali u mene i omogućili mi da ostvarim svoje ciljeve jer bez vas sve ovo ne bi bilo moguće. Beskrajno sam vam zahvalna.

Hvala i mojim prijateljima te svima ostalima koji su bili uz mene i uljepšali mi studentski život.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

MEHANIZAM DJELOVANJA KRUNASTOG ETERA 613 NA STANIČNE LINIJE DOJKE

Jelena Gabrilo

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Prijašnja istraživanja su pokazala kako krunasti eter 613 ima inhibitorni učinak na rast nekoliko tumorskih staničnih linija te da bi, s obzirom na strukturu, mogao djelovati kao mobilni nosač za ione natrija i kalija. Stoga se u sklopu ovog rada ispitalo kako krunasti eter 613 djeluje na stanične linije tumora dojke i tumorske matične stanice dojke. Korištenjem anionske boje DiBAC₄(3) utvrđeno je da spoj značajno modulira membranski potencijal navedenih stanica, odnosno depolarizira ih. Testom MTT je pokazan i njegov antiproliferativni učinak na svim ispitivanim staničnim linijama. Kako bi se odredilo inducira li krunasti eter 613 apoptozu ili stanice umiru nekrozom, proveden je test Annexin V-FITC. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da je depolarizacija stanične membrane uzrokovana poremećajem homeostaze Na⁺, što izaziva stres za stanice na više razina te u konačnici uzrokuje smrt stanica. Ovi rezultati ukazuju na nove smjernice u istraživanjima i primjeni krunastih etera u terapiji tumora.

(63 stranice, 24 slike, 5 tablica, 37 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: krunasti eter, tumor dojke, membranski potencijal, stanična smrt, ionofor

Voditelj: dr. sc. Katja Ester, znanstveni suradnik

Suvoditelj: doc. dr. sc. Inga Marijanović

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Inga Marijanović

prof. dr. sc. Nada Oršolić

izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: 14.02.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

MECHANISM OF ACTION OF CROWN ETHER COMPOUND 613 IN BREAST CELL LINES

Jelena Gabrilo

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Previous research has shown that crown ether compound 613 has an growth-inhibitory effect in different tumor cell lines. Considering its structure, it could act as a potassium and sodium ionophore. In this graduation thesis we tested its mechanism of action in breast tumor cell lines and breast cancer stem cell model. It was shown that the compound modulates cell membrane potential significantly, i.e. depolarizes cells. This was estimated using anionic dye DiBAC₄(3). Its antiproliferative effect in tested cell lines was determined by the MTT assay. Annexin V-FITC test was performed in order to determine if cells die by apoptosis or necrosis. Our results indicate that cell membrane depolarization caused by disruption of sodium ion homeostasis leads to cellular stress and cell death eventually. These results give new directions in research and application of crown ethers in cancer therapy.

(63 pages, 24 figures, 5 tables, 37 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: crown ether, breast cancer, membrane potential, cell death, ionophore

Supervisor: Dr. Katja Ester, Res. Assoc.

Cosupervisor: Dr. Inga Marijanović, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Inga Marijanović, Asst. Prof.

Dr. Nada Oršolić, Prof.

Dr. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 14.02.2018.

POPIS KRATICA

ABB – pufer za aneksin

Apaf-1 – faktor aktivacije apoptotskih proteaza

ATCC – Američka zbirka tipova kultura

ATP – adenzin trifosfat

AVD – apoptotičko smanjenje volumena

Bcl-2 – protein limfoma-B stanica 2

CD24, CD44 – klaster diferencijacije 24, 44; antigeni na površini tumorskih matičnih stanica

DAMP – molekule pridružene oštećenju

DiBAC₄(3) – bis(1,3-dibutilbarbituratna kiselina) trimetin oksonol

DISC – signalni kompleks indukcije smrt

DMEM - Dulbeccov modificirani Eagleov medij

DMSO – dimetil sulfoksid

EDTA – etilen-diamin tetraoctena kiselina

EMT – epitelno-mezenhimska tranzicija

FADD – protein asociran s FAS koji sadrži domenu smrti

FBS – fetalni goveđi serum

FITC – fluorescein izotiocijanat

c-FLIP – inhibitorni protein sličan FLIC-u

HAM F12 – medij za uzgoj stanične linije SUM159

HBSS – uravnotežena Hanksova solna otopina

HMLE – immortalizirane epitelne stanice dojke

HUMEC – medij za uzgoj HMLE stanica

IC₅₀ – polovica maksimalne inhibitorne koncentracije

MCF7 – epitelne stanice adenokarcinoma dojke

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

OD – optička gustoća

PBS – fosfatni pufer

PFA – paraformaldehid

PI – propidij jodid

pRb – protein retinoblastoma

RIP1 – kinaza 1 koja ostvaruje interakcije s receptorom

RIP3 – kinaza 3 koja ostvaruje interakcije s receptorom

SUM159 – stanice primarnog karcinoma dojke

hTERT – podjedinica telomeraze

TMS – tumorske matične stanice

TNF – faktor nekroze tumora

TRADD – protein koji sadrži domenu smrti asociran s TNF receptorom tipa 1

V_m – membranski potencijal

7-AAD – 7-aminoaktinomicin D

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Krunasti eteri	1
1.1.1. Značajke krunastih etera.....	1
1.1.2. Krunasti eter 613	4
1.2. Rak	5
1.2.1. Obilježja i nastanak raka	5
1.2.2. Tumorske matične stanice	8
1.2.3. Model tumorskih matičnih stanica dojke.....	10
1.3. Bioelektrična svojstva stanice	12
1.3.1. Membranski potencijal	12
1.3.2. Ionski kanali i transporteri.....	13
1.3.3. Ionofori	15
1.3.4. Rak i bioelektrična svojstva stanica.....	16
1.4. Stanična smrt	18
1.4.1. Apoptoza	19
1.4.2. Nekroza	21
1.4.3. Nekroptoza	22
1.5. Cilj istraživanja.....	24
2. MATERIJALI I METODE	25
2.1. Popis korištenih materijala i priprema otopina.....	25
2.1.1. Sastav medija za uzgoj stanica	25
2.1.2. Sastav i priprema otopina	26
2.1.3. Stanične linije	28
2.2 Rad sa stanicama u kulturi.....	30
2.2.1. Presađivanje stanica.....	30
2.2.2. Brojanje stanica	31
2.2.3. Zamrzavanje stanica	31
2.2.4. Odmrzavanje stanica	32
2.3. Određivanje apoptoze korištenjem metode Annexin V-FITC.....	32
2.3.1. Protočna citometrija.....	34
2.4. Praćenje membranskog potencijala pomoću potenciometrijske boje DiBAC ₄ (3).....	38

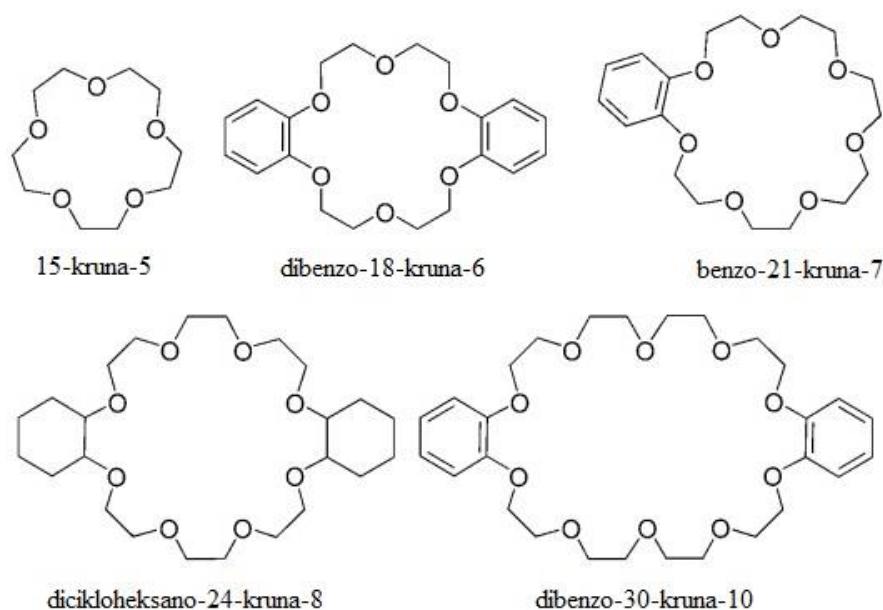
2.5. Određivanje antiproliferativnog učinka spoja 613 na stanične linije dojke	39
2.6. Statistička obrada podataka	41
3. REZULTATI	42
3.1. Modulacija membranskog potencijala stanica djelovanjem spoja 613.....	42
3.2. Učinak spoja 613 na rast stanica	46
3.3. Učinak spoja 613 na indukciju apoptoze.....	49
4. RASPRAVA.....	55
5. ZAKLJUČAK	59
6. LITERATURA.....	60
7. ŽIVOTOPIS	63

1. UVOD

1.1. Krunasti eteri

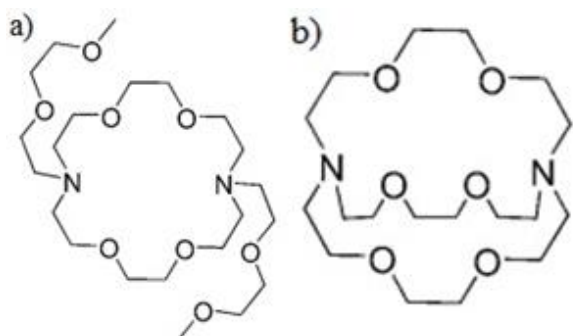
1.1.1. Značajke krunastih etera

U ovom radu istražen je mehanizam djelovanja krunastog etera 613 na stanične linije dojke. U prijašnjim istraživanjima je pokazano da krunasti eteri mogu djelovati antiproliferativno na tumorske stanice, no nije određen mehanizam djelovanja (Marjanović i sur. 2007). Krunasti eteri su makrociklički polieteri koji sadrže 3-20 atoma kisika koji su razdvojeni sa dva ili više atoma ugljika. Ta grupa spojeva je dobila naziv po tome što svojim molekularnim oblikom podsjećaju na krune. Njihova imena sadrže broj i vrstu ugljikovodikovih prstena koji su vezani, broj i vrstu atoma u polieterskom prstenu, zatim klasično ime „kruna“ te broj kisikovih atoma u polieterskom prstenu (Slika 1) (Kralj i sur. 2008). Njihova glavna karakteristika je sposobnost stvaranja stabilnih i selektivnih kompleksa s metalnim kationima. Osim kationa, mogu vezati i anione te neutralne molekule. Krunasti eteri sadrže hidrofobni prsten koji okružuje hidrofilnu šupljinu koja je mjesto kompleksiranja s kationima. Takva struktura im omogućuje da istovremeno stvaraju komplekse s metalnim ionima te da se svojim hidrofobnim dijelom ugrade u staničnu membranu. Na taj način pokazuju svojstva ionofora budući da se ponašaju slično prirodnim ionoforima kao što su gramicidin i valinomycin što ih čini izrazito zanimljivima za istraživanje, i s kemijskog i s biomedicinskog stajališta (Marjanović i sur. 2007). Sintetizirani su 1967. godine i još od tada privlače izuzetno veliku pažnju jer mogu imati potencijalnu primjenu u mnogobrojnim područjima, s naglaskom na antitumorsku terapiju (Kralj i sur. 2008).



Slika 1. Primjeri klasičnih krunastih etera. Preuzeto i prilagođeno prema Kralj i sur. 2008.

Veličina hidrofilne šupljine krunastih etera određuje s kojim će kationom ostvariti kompleksiranje. Primjerice, dibenzo-18-kruna-6 ima veliki afinitet za kalijeve ione dok 15-kruna-5 ima afinitet za Na^+ . Kompleksiranje se temelji na slabim, nekovalentnim interakcijama. S druge strane, kod kruna koje imaju veliki broj atoma u polieterskom prstenu, npr. 24 ili više, veličina šupljine ne igra važnu ulogu budući da imaju veću konformacijsku pokretljivost te kompleksiraju katione djelomično se „omatajući“ oko njih (Kralj i sur. 2008). Napravljene su i brojne modifikacije krunastih etera poput promjene veličine njihovog prstena, dodavanja različitih supstituenata te atom-donora kako bi se poboljšala njihova svojstva i omogućila primjena u raznim područjima (Marjanović i sur. 2007). Tako se primjerice atomi kisika mogu zamijeniti atomom sumpora ili dušika koji se onda nazivaju krunasti tiaeteri odnosno azaeteri (Mlinarić-Majerski i Vujasinović 2007). Budući da kisik i dušik imaju različitu selektivnost vezanja, cikličke makromolekule koje sadrže i kisik i dušik su sposobne vezati veći i raznolikiji broj kationa i aniona nego one koje sadrže isključivo kisik ili dušik. Naime, takve aminske skupine u krunastim azaeterima se mogu koristiti za stvaranje kompleksnijih struktura poput kriptanda koji mogu kompletno zarobiti ligand te lariatnih etera koji na atomima dušika imaju vezane bočne ogranke (Slika 2) (Kralj i sur. 2008).



Slika 2. Strukture : a) larijatnog etera i b) kriptanda. Preuzeto i prilagođeno prema Kralj i sur. 2008.

Krunasti eteri su izrazito zanimljivi zbog svoje biološke aktivnosti jer su neki od njih, oni supstituirani, pokazali toksičnost u prokariotskim i eukariotskim staničnim sustavima odnosno antimikrobnu te antifungalnu aktivnost. Pretpostavlja se da je to rezultat njihove sposobnosti da se integriraju u membranu i provode katione, čime narušavaju protok iona kroz membranu. Također, istraživanja su pokazala da nemaju genotoksična svojstva tj. da ne oštećuju molekulu DNA što je potvrdilo pretpostavku da je njihova toksičnost posljedica interakcije s membranama, a ne s nukleinskim kiselinama.

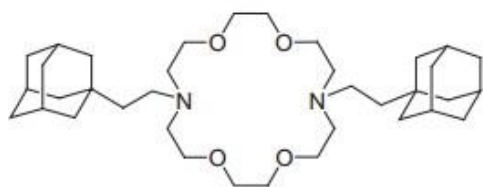
Sintetizirani su i funkcionalni krunasti eteri koji su dizajnirani tako da ostvaruju interakcije te alkiliraju i cijepaju molekulu DNA čime pokazuju antitumorsku aktivnost. Takvi spojevi sadrže dva funkcionalno različita dijela: jedan dio koji se interkalira u DNA, a drugi koji veže metalne ione. U takvim slučajevima krunasti eteri samo olakšavaju odnosno pojačavaju djelovanje druge molekule koja je dio istog spoja (Kralj i sur. 2008). Nefunkcionalni, klasični krunasti eteri također mogu imati antiproliferativnu aktivnost. Primjerice, supstituirani 18-kruna-6 spojevi dovode do zaustavljanja staničnog ciklusa u fazi G1, a poznato je da struja kalijevih iona ima važnu ulogu u staničnoj proliferaciji, naročito u regulaciji progresije kroz fazu G1. Time se potvrđuje hipoteza da krunasti eteri mogu inhibirati rast tumorskih stanica narušavajući homeostazu kalijevih iona što dovodi do smetnji u staničnom ciklusu i konačno apoptoze. Dakle, dodavanje različitih supstituenata povećava antiproliferativni učinak krunastih etera jer supstituenti povećavaju hidrofobnost spoja što onda olakšava njegovu integraciju u membranu. Iako izazivaju toksične nuspojave, to bi se moglo zaobići pomoću „aktivnog ciljanja“ čime bi se osigurala selektivnost između tumorskih i normalnih stanica. Aktivno ciljanje podrazumijeva vezanje monoklonskih antitijela ili liganda koji bi služili za dopremanje potencijalnog lijeka do ciljane stanice (Marjanović i sur. 2007). Osim toga, krunasti eteri bi se mogli koristiti i za senzitivizaciju tumorskih stanica na

kemoterapiju te kao nosači za kemoterapeutike na principu surfaktanta, čime bi se povećala njihova apsorpcija (Kralj i sur. 2008).

1.1.2. Krunasti eter 613

Spoj 613 je krunasti eter formule N,N'-Bis[2-(1-adamantil)ethyl]-4,13-diaza-18-kruna-6. Dakle, spada u grupu diaza krunastih etera s adamantanskom jedinicom (Slika 3). Dobiva se reakcijama diaza-18-kruna-6 s odgovarajućim derivatima adamantana (Supek i sur. 2011). Ugradbena jedinica adamantan se dodaje zato što povećava topljivost krunastih etera u nepolarnim otapalima odnosno membranama te na taj način povećava njihovu sposobnost za transport iona. Također, uvođenjem adamantanske molekule se utječe i na konformacijsku mobilnost cijele strukture (Mlinarić-Majerski i Vujasinović 2007).

Kao što je već rečeno u prvom dijelu teksta, neki krunasti eteri, primjerice 613, djeluju kao ionofori i imaju afinitet za ione kalija (Marjanović i sur. 2007). Ionofori su hidrofobne organske molekule koje prenose ione kroz staničnu membranu. Na taj način mogu narušiti homeostazu za različite ione te djelovati na membranski potencijal stanice. Neki ionofori dobiveni iz mikroorganizama djeluju i kao antibiotici (David i sur. 2013). Dosad je pokazano kako 613 ima inhibitorni učinak na nekoliko tumorskih staničnih linija, a u tijeku su istraživanja učinka na tumorske matične stanice. Utvrđeno je da spoj ima afinitet za K^+ , ali i Na^+ te da povećava permeabilnost tumorskih stanica za oba iona (Ester i sur. neobjavljeni rezultati). No, točan način na koji 613 ubija stanice odnosno mehanizam njegovog djelovanja još uvijek nije poznat i upravo to je tema ovog istraživanja.



Slika 3. Struktura krunastog etera 613. Preuzeto iz Supek i sur. 2011.

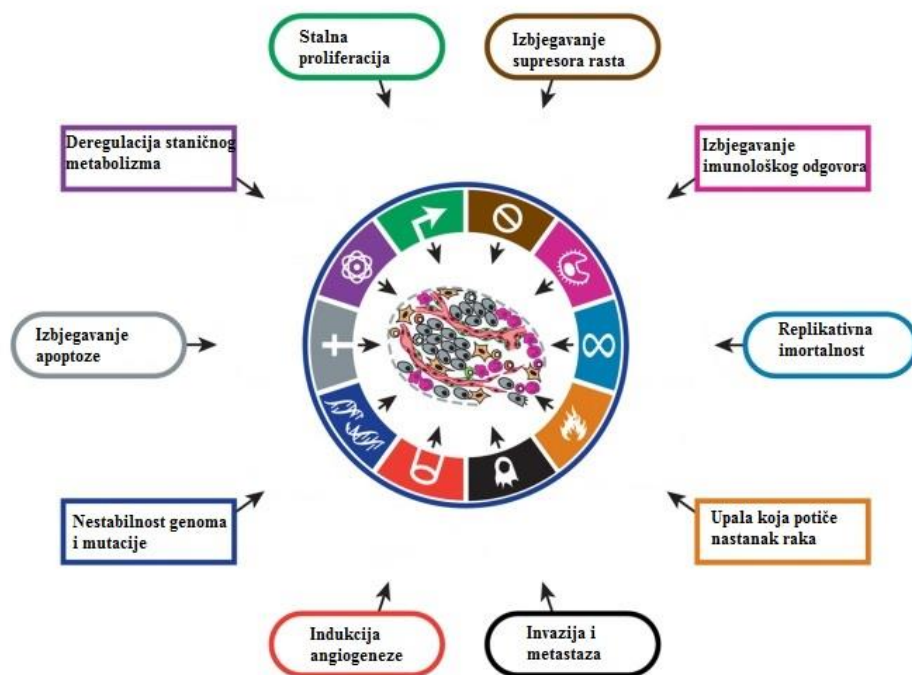
1.2. Rak

1.2.1. Obilježja i nastanak raka

Rak predstavlja grupu bolesti koju karakterizira abnormalan stanični rast i proliferacija, invazija te širenje stanica s mjesta nastanka na druga mjesta u organizmu. Posljedica je nakupljanja mutacija u genima za rast, diferencijaciju i staničnu smrt koje stanicama raka omogućuju konstantnu proliferaciju i zaobilazanje kontrolnih mehanizama poput programirane stanične smrti (apoptoze). Normalne stanice u organizmu postaju stanice raka procesom karcinogeneze, a taj proces ovisi o okolišnim čimbenicima, ali i nasljednim faktorima. Naime, karakterizirane su dvije glavne grupe gena čije su mutacije nužne za nastanak raka. To su onkogeni i tumor supresor geni. Protoonkogeni su geni koji inače potiču stanični rast, a uslijed mutacija ili poremećaja u ekspresiji postaju onkogeni. Kao takvi kodiraju za proteine koji imaju povećanu aktivnost ili se proizvode u većim količinama. Mutacija samo jednog alela je dovoljna da inducira transformaciju stanice. S druge strane, tumor supresorski geni kodiraju za proteine uključene u zaustavljanje staničnog ciklusa u slučaju oštećenja u stanici i poticanje apoptoze te mehanizme popravka DNA. Gubitak funkcije tumor supresora zahtijeva inaktivaciju oba alela (Pecorino 2012).

Stanice raka imaju dobro definirane karakteristike (Hanahan i Weinberg 2011), a to su: neovisnost o faktorima rasta, neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast, izbjegavanje stanične smrti, neograničeni replikativni potencijal, angiogeneza (stvaranje novih krvnih žila), invazija u tkiva i metastaziranje. Također, nedavno su im nadodane još dvije karakteristike za koje postoje dokazi da sudjeluju u procesu karcinogeneze, međutim zahtijevaju dodatna istraživanja. To su izbjegavanje imunološkog odgovora i reprogramiranje staničnog metabolizma. Podlogom za nastanak raka odnosno karakteristikama koje to omogućuju smatraju se genomska nestabilnost i upalne reakcije (Slika 4). Genomska nestabilnost stvara mutacije koje uključuju genomske rearanžmane, dok stanice imunosnog sustava sudjeluju u procesu upale koja olakšava progresiju raka.

Stanica raka može održavati konstantnu proliferaciju pomoću nekoliko mehanizama. Primjerice, može sama proizvoditi faktore rasta ili slati signale normalnim stanicama koje ih onda proizvode, povećati razinu receptora na svojoj površini ili pak strukturnim promjenama molekule receptora omogućiti konstitutivnu aktivaciju signalnog puta za proliferaciju stanice (Hanahan i Weinberg 2011).



Slika 4. Osnovna obilježja stanica raka. Prikazana su obilježja koja stanica mora steći da bi se razvila u stanicu raka. Preuzeto i prilagođeno prema Hanahan i Weinberg 2011.

Jedan od najvažnijih tumor supresorskih gena koji je mutiran u skoro svim vrstama raka i naziva se „čuvarom genoma“ je p53. Kao odgovor na stanični stres i oštećenje molekule DNA, normalni protein p53 aktivira puteve koji uključuju popravak DNA, zaustavljanje staničnog ciklusa te apoptozu. Na taj način sprječava širenje mutacija po genomu (Pecorino 2012). Osim p53, u stanicama raka često je mutiran i pRb koji inače regulira stanični ciklus kao odgovor na vanjske signale. Također, istraživanja su pokazala kako međustanični kontakti normalnih stanica u kulturi suprimiraju njihovu daljnju proliferaciju što omogućuje nastanak jednog konfluentnog sloja stanica. Kontaktna inhibicija služi za održavanje normalne homeostaze tkiva, a gubi se kod tumorskih stanica. Nadalje, programirana stanična smrt, apoptoza, služi kao prirodna prepreka za razvoj raka jer se na taj način eliminiraju stanice s oštećenom DNA koje bi mogle imati onkogeni potencijal. Stanice raka su razvile mehanizam kojim izbjegavaju apoptozu, a to je gubitak funkcije proteina p53 koji je senzor staničnog oštećenja. Osim toga, staničnu smrt izbjegavaju i povećanjem ekspresije antiapoptotskih regulatora ili smanjenjem ekspresije proapoptotskih faktora.

Stanice raka imaju i neograničeni replikativni potencijal za razliku od normalnih stanica koje imaju ograničeni broj dioba nakon čega odlaze u senescenciju, neproliferativno, ali vijabilno stanje. Ključnu ulogu u stjecanju sposobnosti neograničene proliferacije imaju telomere koje štite krajeve kromosoma. Sadrže tandemska heksanukleotidna ponavljanja koja se skraćuju prilikom svake diobe čime u konačnici gube sposobnost zaštite krajeva kromosoma te se pokreće proces starenja. Stanice raka imaju aktiviran enzim telomerazu, DNA polimerazu koja produljuje telomere te na taj način onemogućuje njihovo skraćivanje i ulazak u senescenciju ili pak apoptozu. Produljenje telomera stanicama raka omogućuje neograničenu proliferaciju (Hanahan i Weinberg 2011).

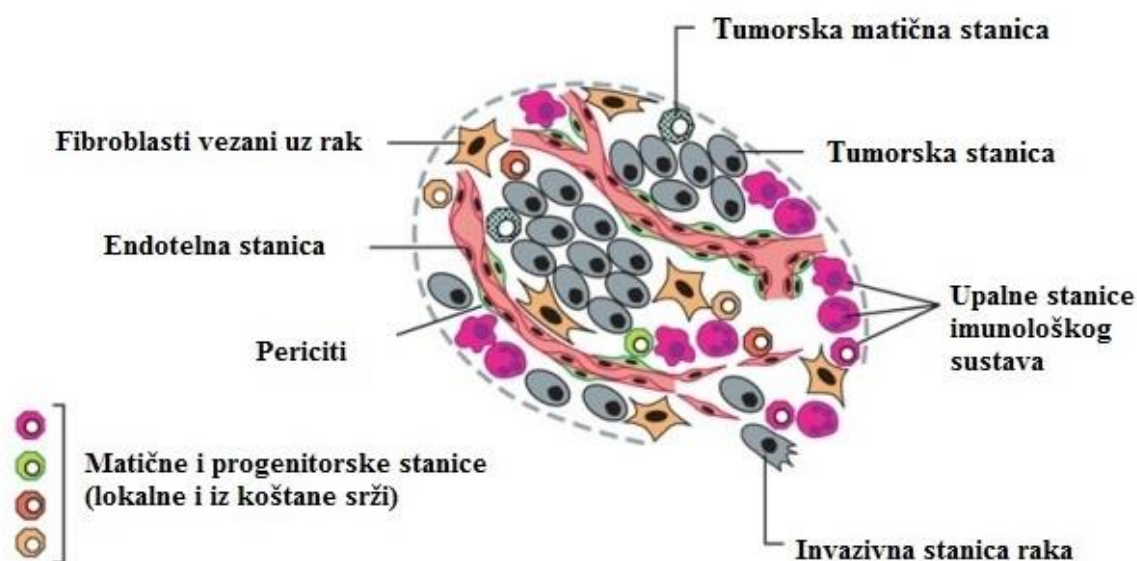
Razvojem tumora javlja se potreba za dodatnim krvnim žilama koje bi omogućile stanicama raka dotok nutrijenata i kisika istovremeno odnoseći produkte metabolizma te ugljikov dioksid. Nove krvne žile nastaju iz već postojećih, a taj proces se naziva angiogeneza. Ona se odvija tijekom embriogeneze, a u odraslih ljudi je samo privremeno aktivna za vrijeme cijeljenja rana i ženskog reproduktivnog ciklusa. Za proces angiogeneze je potreban „angiogeni okidač“ koji pak ovisi o ravnoteži između angiogenih induktora i inhibitora. Jedan od najvažnijih angiogenih induktora je vaskularni endotelni faktor rasta-A (VEGF-A) kojeg luče stanice raka i koji se potom veže na VEGF receptore (VEGFR) na endotelnim stanicama. Na taj način omogućuje inicijaciju angiogeneze (Pecorino 2012).

Proces kojim stanice raka migriraju i naseljavaju udaljena tkiva i organe naziva se metastaziranje. Metastaziranje predstavlja glavnu razliku između benignog i malignog tumora. Proces invazije započinje prvo lokalnom invazijom, zatim intravazacijom stanica raka u obližnje krvne i limfne žile, njihov prijenos kroz žile, nakon čega slijedi izlazak stanica raka iz krvnih i limfnih žila (ekstravazacija) te naseljavanje parenhima udaljenih organa (kolonizacija). Da bi transformirane epitelne stanice mogle migrirati, to zahtijeva promjene u njihovom obliku te promjene u njihovoj vezi s drugim stanicama i ekstracelularnim matriksom. Dakle, invaziju i metastaziranje regulira epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT). EMT uključuje pretvorbu blisko povezanih epitelnih stanica u izrazito mobilne mezenhimske stanice. Pritom dolazi do gubitka stanične polarnosti, smanjenja ekspresije epitelnih markera poput E-kadherina, povećanja ekspresije mezenhimalnih proteina kao što je N-kadherin te lučenje enzima koji degradiraju stanični matriks. Transkripcijski faktori Snail, Slug, Twist, Zeb1/2 kontroliraju set gena koji su potrebni za pokretanje EMT-a. Neka od staničnih svojstava koja kontroliraju ti transkripcijski faktori su gubitak adherentnih veza između stanica, promjena morfologije iz poligonalne, karakteristične za epitelne stanice, u vretenastu,

karakterističnu za fibroblaste, povećana pokretljivost i otpornost na apoptozu. Također, stanice raka imaju dereguliran stanični metabolizam. U aerobnim uvjetima, normalne stanice u citosolu razgrađuju glukozu procesom glikolize do piruvata koji se onda u mitohondriju u potpunosti oksidira sve do ugljikovog dioksida. U anaerobnim uvjetima se favorizira samo glikoliza. Za razliku od njih, stanice raka provode glikolizu i u prisutnosti kisika prilikom čega proizvode laktat. Ta pojava se naziva Warburgov efekt. Osim navedenih karakteristika, za stanice raka je značajno da izbjegavaju i imunološki odgovor domaćina (Hanahan i Weinberg 2011).

1.2.2. Tumorske matične stanice

Tumor predstavlja heterogenu masu koja sadrži različite vrste stanica i regije koje se razlikuju po stupnju diferenciranosti, proliferacije, invazivnosti (Hanahan i Weinberg 2011). Prije nekoliko godina je utvrđeno da postoji subpopulacija stanica unutar tumora koja ima obilježja slična onima u zdravim matičnim stanicama. Dakle, sposobne su samoobnavljati se, diferencirati, ali i regenerirati slične tumore, što je demonstrirano njihovom transplantacijom u imunodeficientnog miša. To su tumorske matične stanice (TMS), a smatraju se pokretačkom silom tumorigeneze upravo zbog svoje sposobnosti samoobnavljanja i diferencijacije u različite tipove stanica unutar tumora. S druge strane, progenitorske i diferencirane stanice raka koje nastaju iz njih, gube sposobnost samoobnavljanja i opsežne proliferacije (O'Connor i sur. 2014). Osim TMS, tumorski mikrokoliš sačinjavaju i drugi stanični tipovi poput endotelnih stanica, pericita, upalnih stanica imunološkog sustava, fibroblasta. Svi oni zajedno doprinose progresiji brojnih tumora (Slika 5) (Hanahan i Weinberg 2011).



Slika 5. Tumorske matične stanice unutar mikrookoliša tumora. Različiti tipovi stanica koji su prikazani sačinjavaju većinu čvrstih tumora te omogućuju njegov rast i progresiju. Preuzeto i prilagođeno prema Hanahan i Weinberg 2011.

Tumorske matične stanice mogu nastati iz normalnih matičnih stanica koje su stekle maligne mutacije. Također mogu nastati i iz već diferenciranih stanica koje su ponovno poprimile sposobnost samoobnavljanja putem genetičkih i epigenetičkih modifikacija. Tumorske matične stanice raka su otporne na kemoterapije te su stoga odgovorne za ponovni rast i širenje tumora nakon terapije. Mehanizmi kemorezistencije imaju podlogu u povećanoj ekspresiji antiapoptotskih proteina, većoj učinkovitosti popravka DNA, povećanoj ekspresiji transportera lijekova i unutarstaničnih detoksifikacijskih enzima koji posreduju u njihovom metabolizmu i izbacivanju. Najvažnija obitelj transportera koji su pojačano eksprimirani u tumorskim matičnim stanicama i imaju sposobnost izbacivanja boja i toksičnih spojeva iz stanice su ABC transporteri (engl. *ATP-binding cassette transporters*). To su membranski proteini koji se nalaze u plazmatskoj membrani, a koriste energiju molekule ATP (O'Connor i sur. 2014). Među 49 poznatih ABC transportera, tri su uključena u rezistenciju na lijekove, P-gp, MDR1 i BCRP. Za kemorezistenciju bitan je i citosolni enzim aldehyd dehidrogenaza (ALDH) koji je inače uključen u oksidaciju unutarstaničnih aldehyda te oksidira retinol do retinoične kiseline tijekom diferencijacije matičnih stanica. Omogućuje kemorezistenciju na način da direktno uklanja kisikove radikale koji nastaju ili indirektno proizvodi antioksidanse.

Tumorske matične stanice na površini izražavaju veliku količinu markera CD44, a malu CD24, stoga se njihov fenotip označava kao CD44⁺/CD24⁻ (Bozorgi i sur. 2015).

U ovom radu fokus je na staničnim linijama dojke. Djelovanje krunastog etera 613 se ispitivalo na tumorskim stanicama dojke s većim postotkom matičnih stanica unutar populacije CD44⁺/CD24⁻ (SUM159), te manjim postotkom CD24⁺/CD44⁻ (MCF7). Također su uključene i stanice koje predstavljaju model tumorskih matičnih stanica dojke, stanice HMLE. Rak dojke je izrazito zanimljiv za istraživanja budući da je to najčešći oblik raka od kojeg obolijevaju žene diljem svijeta, a udio u smrtnosti u odnosu na ostale vrste raka je 15 %. Terapeutski pristup uključuje lokalno uklanjanje raka, kemoterapiju te radioterapiju. Međutim, tretirani pacijenti se često susreću s problemom povratka tumora i njegovog širenja. Za to su odgovorne TMS dojke koje su rezistentne na terapiju, a vrlo često nakon tretmana postaju još agresivnije (Bozorgi i sur. 2015). Dakle, ciljanje tumorskih matičnih stanica umjesto stanica raka općenito predstavlja novu i obećavajuću strategiju za liječenje raka.

1.2.3. Model tumorskih matičnih stanica dojke

Kako bi se dobila nova saznanja o biologiji tumorskih matičnih stanica, bilo je potrebno izvršiti opsežna laboratorijska istraživanja koja podrazumijevaju rad s velikim količinama stanica u kulturi. Da bi se došlo do tumorskih matičnih stanica, potrebno ih je izolirati iz tumora, a na taj način se često ne može dobiti dovoljna količina stanica za istraživanja. Stoga su u laboratorijima dizajnirani modeli tumorskih matičnih stanica dojke *in vitro*. Istraživanja su pokazala da je potrebna inaktivacija tumor supresora p53 kako bi onkogeni transformacija normalnih ljudskih stanica bila izvediva. Stoga su u prvom koraku primarne epitelne stanice dojke, izolirane iz tkiva, transformirane retrovirusnim vektorom koji nosi veliki T antigen virusa SV40. Time se inaktiviraju proteini pRb i p53. Daljnjom transformacijom istih stanica vektorom koji sadrži hTERT podjedinicu telomerase se postiže njihova imortalizacija (Elenbaas i sur. 2001). U sljedećem koraku je iskorišteno saznanje da indukcija epitelno-mezenhimske tranzicije omogućuje i uspostavljanje svojstava matičnih stanica. Stoga je u netumorigeničnim, imortaliziranim ljudskim epitelnim stanicama dojke (HMLE) inducirana epitelno-mezenhimska tranzicija ektopičnom ekspresijom transkripcijskog faktora Twist. Stanice su poprimile mezenhimska obilježja; smanjila se ekspresija mRNA koje kodiraju za epitelne markere poput E-kadherina, a povećala ekspresija

mRNA za mezenhimske markere (N-kadherin, vimentin, fibronektin). Takva stanična linija nazvana je HMLETWIST. Također je pokazano kako stanice HMLETWIST tvore puno više mamosfera u odnosu na HMLE stanice transfecirane kontrolnim vektorom (HMLEpBp) te su stekle $CD44^{+}/CD24^{-}$ ekspresijski obrazac (Mani i sur. 2008). Morfološka razlika između HMLETWIST i kontrolnih HMLEpBp se može vidjeti na Slici 10. u poglavlju Materijali i metode. Iako su TMS rezistentne na većinu kemoterapeutika, pokazano je kako salinomycin selektivno ubija tumorske matične stanice dojke odnosno da nakon tretmana dolazi do smanjenja ekspresije gena vezanih za TMS. Ovo istraživanje predlaže novi put za razvoj antitumorskih terapija kojima bi se, osim specifičnih genetičkih promjena, ciljalo i diferencijacijska stanja stanica raka unutar tumora (Gupta i sur. 2009). Nadalje, treba spomenuti da je salinomycin ionofor za K^{+} , što otvara pretpostavku da su tumorske matične stanice osjetljivije na moduliranje bioelektričnih svojstava od ostalih stanica.

1.3. Bioelektrična svojstva stanice

1.3.1. Membranski potencijal

Bioelektričnost u kontekstu stanice se odnosi na njeno endogeno električno signaliranje putem ionskih kanala i pumpi koji se nalaze u plazmatskoj membrani te koji omogućuju stvaranje membranskog potencijala (Levin 2014). Membranski potencijal nastaje zbog razlike u električnom gradijentu između vanjske i unutrašnje strane membrane, a koja se stvara zbog nejednake distribucije različitih iona kao što su Na^+ , K^+ , Ca^{2+} i Cl^- . Membranski potencijal se izražava u odnosu na vanjski okoliš stanice. Stanična unutrašnjost je negativnija u odnosu na okoliš, pa je dogovoreno da se membranski potencijal stanica u mirovanju (V_m) piše s negativnim predznakom i obično iznosi od -30 do -90 mV. Kada membranski potencijal postane pozitivniji od potencijala u mirovanju, kaže se da je stanica depolarizirana. S druge strane, kada je membranski potencijal negativniji, stanica je hiperpolarizirana. Otvaranje i zatvaranje ionskih kanala te rad ionskih transportera održava membranski potencijal u mirovanju stalnim (Yang i Brackenbury 2013).

Električni gradijent zajedno s koncentracijskim sačinjava elektrokemijski gradijent. Naime, u stanicama je veća koncentracija K^+ , a manja Na^+ , dok u izvanstaničnom okolišu ima više Na^+ , a manje K^+ . Kako bi se takvo stanje moglo održati, uslijed promjena se aktiviraju transporteri kao što je Na^+/K^+ ATPaza koja aktivnim prijenosom u stanicu ubacuje dva K^+ , a izbacuje tri Na^+ . Zbog samog koncentracijskog gradijenta, kalijevi ioni procesom difuzije izlaze iz stanice kroz K^+ kanale. No nakon njihovog izlaska, u unutrašnjosti stanice ostaju anioni koji će membranski potencijal činiti negativnim i zbog te pokretačke sile, K^+ ioni će se vraćati natrag u stanicu. Na taj način se uspostavlja ravnotežni potencijal za tu vrstu iona. Jednadžba koja objašnjava ravnotežu između električnih i kemijskih sila se naziva Nernstova

jednadžba :

$$V_K = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{K}]_{\text{in}}}{[\text{K}]_{\text{out}}},$$

gdje je V_K ravnotežni potencijal za ione kalija, R je plinska konstanta i iznosi 8,31 J/(K mol), T je apsolutna temperatura izražena u Kelvinima, F je Faradayeva konstanta, z je naboj iona, $[\text{K}]_{\text{in}}$ je koncentracija K^+ unutar stanice, a $[\text{K}]_{\text{out}}$ koncentracija K^+ izvan stanice. Ovakva jednadžba se može primjeniti i na druge ione koji sudjeluju u stvaranju membranskog potencijala. U takvom idealiziranom slučaju, u kojem je membrana propusna samo za jednu vrstu iona, membranski potencijal u mirovanju je jednak ravnotežnom potencijalu za tu vrstu iona. No, Nernstova jednadžba koja predstavlja idealnu situaciju se može modificirati tako da

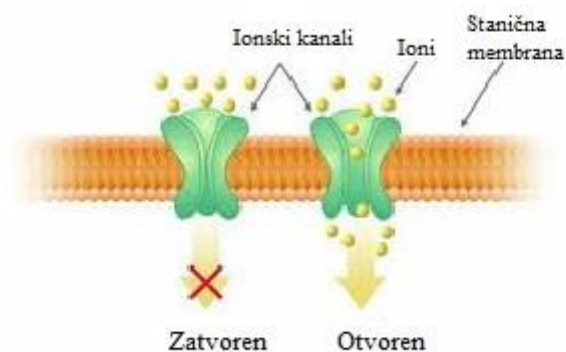
predstavlja fiziološko, stvarno stanje u kojem je membrana propusna i za druge ione. Takva jednadžba se onda naziva Goldmanova jednadžba:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_{Na^+} [Na^+]_o + P_{K^+} [K^+]_o + P_{Cl^-} [Cl^-]_o}{P_{Na^+} [Na^+]_i + P_{K^+} [K^+]_i + P_{Cl^-} [Cl^-]_i} \right)$$

gdje je V_m stvarni membranski potencijal, a P permeabilnost membrane za određeni ion (cm/s) (Wright 2004).

1.3.2. Ionski kanali i transporteri

Membranski potencijal stvaraju te održavaju ionski kanali i transporteri u staničnoj membrani. Ionski kanali su membranski proteini koji stvaraju poru u membrani i tako omogućuju ionima prelazak s jedne strane membrane na drugu. Brzina kojom kanali omogućuju transport iona je izrazito velika, obično 10^6 iona/sekundi, a ione prenose u skladu s njihovim elektrokemijskim gradijentom što znači da ne troše energiju molekule ATP za takav proces. Omogućuju prolaz ionima točno određene veličine i naboja pa tako postoje kanali isključivo za kalijeve ione, natrijeve ili pak kalcijeve. Ta karakteristika se naziva selektivna permeabilnost. Također postoje i kanali koji su propusni za više od jednu vrstu iona (Hille 1984). Njihova aktivnost je regulirana otvaranjem i zatvaranjem (engl. *gated*) stoga postoje kanali koji se otvaraju/zatvaraju zbog vezanja nekog liganda (engl. *ligand-gated*) te oni koji se otvaraju/zatvaraju zbog membranskog potencijala (engl. *voltage-gated*). Kod prve skupine kanala konformacijska promjena nastala interakcijom s ligandom, otvori odnosno zatvori kanal. Kod druge skupine, promjene u električnom potencijalu membrane uzrokuju pomake u nabijenim domenama proteina koji gradi kanal i time otvaraju ili zatvaraju put ionima (Slika 6) (Lehninger 2013).



Slika 6. Prikaz otvorene i zatvorene konformacije ionskog kanala. Preuzeto i prilagođeno s www.icagen.com.

Najbrojniji, ali i najznačajniji su kanali za ione kalija koji se zbog svoje brojnosti mogu klasificirati i prema podražaju na koji odgovaraju, provodljivosti i strukturi. Kalijevi ioni obično imaju konzerviranu strukturu koja se sastoji od dvije transmembranske domene i motiva ukosnice. Mogu imati i dodatne domene te petlje. Kalijevi kanali imaju veliku ulogu u staničnoj adheziji i migraciji, apoptozi i proliferaciji stanice. Upravo zbog toga što su najbrojniji, imaju najveću ulogu u održavanju membranskog potencijala, a ukoliko membranski potencijal postane negativniji od potencijala u mirovanju, odnosno dođe do hiperpolarizacije, to djeluje kao pokretačka sila za druge ionske kanale. Primjer su kanali za kalcijeve ione koji onda dalje sudjeluju u mnogobrojnim staničnim procesima (Pardo i Stühmer 2014). Održavanje ionske ravnoteže za sve ione je stoga jako važno za normalno funkcioniranje stanica, i svaka modulacija, uključujući i terapiju, može imati veliki učinak na sve stanične funkcije. Kao što je spomenuto, stanice posjedovanjem velikog broja i vrsta ionskih kanala imaju finu regulaciju za „obranu“ od promjena koncentracija kalija. Međutim, za „obranu“ od ulaska natrija ostaje jedino Na^+/K^+ ATPaza.

Ionski transporteri odnosno pumpe prenose ione kroz membranu suprotno od njihovog koncentracijskog gradijenta. Pritom troše molekulu ATP ili koriste energiju elektrokemijskog gradijenta, a takva vrsta transporta se naziva aktivni transport. Među njima važnu ulogu u održavanju membranskog potencijala u mirovanju ima Na^+/K^+ ATPaza. Njeno djelovanje omogućuje odgovor stanica na promjene uslijed ulaska natrija i izlaska kalija iz stanica. Budući da u svakom ciklusu za jednu molekulu ATP izmjenjuje tri Na^+ za dva K^+ , unutarstaničnom prostoru daje negativan naboj u odnosu na izvanstanični (Lehninger 2013).

Ionski kanali imaju izuzetno važnu ulogu u apoptozi s obzirom da tijekom apoptoze dolazi do skupljanja stanice odnosno gubitka staničnog volumena što se naziva apoptotičko smanjenje volumena (engl. *apoptotic volume decrease*, AVD). AVD je posljedica promjena koncentracije unutarstaničnih iona, jer dolazi do gubitka unutarstaničnog kalija što pak igra veliku ulogu u aktivaciji apoptotske mašinerije. Dakle, smanjenje staničnog volumena je rezultat smanjenja unutarstanične ionske jakosti što omogućuje aktivaciju kaspaza, stvaranje apoptosoma i nukleaznu aktivnost. Opisani su brojni kalijevi kanali koji su izrazito bitni za aktivaciju apoptoze, a njihovom inhibicijom moguće je stanicu zaštititi od stanične smrti. Natrijevi kanali također sudjeluju u procesu apoptoze, a primjećeno je da se povećava unutarstanična koncentracija Na^+ u ranim počecima apoptoze (Bortner i Cidlowski 2014). Primjerice, izlaganje fosfatidilserina na vanjskoj strani stanične membrane ovisi o ulasku Na^+ . Tijekom apoptoze se povećava i unutarstanična koncentracija Ca^{2+} pomoću kalcijevih kanala koji su lokalizirani u plazmatskoj membrani i membrani endoplazmatskog retikuluma (Kunzelmann 2016). Što se tiče transportera Na^+/K^+ ATP-aze, za modulaciju njezine ekspresije i aktivnosti važnu bi ulogu mogle imati kaspaze, kinaze te reaktivni kisikovi/dušikovi spojevi (Franco i sur. 2006).

1.3.3. Ionofori

Na membranski potencijal odnosno koncentracije iona s obje strane membrane mogu djelovati i molekule koje se nazivaju ionofori. Dakle, ionofori su lipofilne organske molekule koje svojim djelovanjem narušavaju membranski potencijal stanice na način da staničnu membranu čine propusnom za određenu vrstu iona. Kao što je već navedeno, spoj 613 s obzirom na strukturu ima obilježja ionofora s afinitetom za ione kalija i natrija. Ionofori mogu biti mobilni nosači koji stvaraju komplekse s metalnim kationima te kanalnog tipa kad se ugrađuju u membranu i stvaraju hidrofilnu poru koja omogućuje difuziju kationa kroz membranu. Najpoznatiji ionofori su salinomicin, valinomicin te gramicidin. Gramicidin A primjerice ubacuje natrijeve, a izbacuje kalijeve ione. Budući da na taj način narušava homeostazu Na^+ i K^+ , aktivira se Na^+/K^+ ATP-aza koja pak troši velike količine ATP-a. Također je pokazano kako gramicidin A blokira proizvodnju ATP-a oksidativnom fosforilacijom jer svojim djelovanjem poremeti i mitohondrijski membranski potencijal. To dovodi do potrošnje zaliha stanične energije tj. ATP-a i u konačnici do neapoptotske stanične smrti, nekroze (David i sur. 2013).

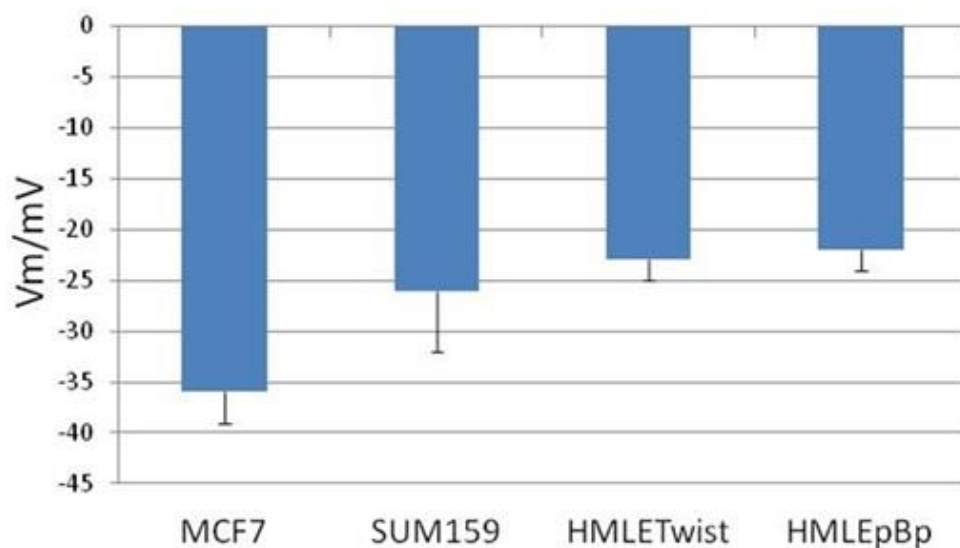
Salinomycin i valinomycin imaju veliki afinitet za ione kalija potičući njegov izlazak iz stanice. Dakle, imaju sličan mehanizam djelovanja poput gramicidina te dovode do potrošnje staničnog ATP-a i smrti stanice (Managò i sur. 2015). Kao što je već spomenuto, salinomycin se smatra i potencijalnom antitumorskom terapijom za kemorezistentne tumorske matične stanice (Gupta i sur. 2009). Zbog svega navedenog treba istražiti kako spoj 613 djeluje na tumorske stanice, posebice u kontekstu narušavanja homeostaze za Na^+ i K^+ .

1.3.4. Rak i bioelektrična svojstva stanica

Osim kod stanica koje su podražljive poput neurona i mišićnih stanica, pokazano je da membranski potencijal igra vrlo važnu ulogu i kod drugih, nepodražljivih stanica. Promjene u membranskom potencijalu kontroliraju proliferaciju, diferencijaciju, oblik stanice i apoptozu. Postoji i razlika u membranskom potencijalu između normalnih i tumorskih stanica što bi se moglo iskoristiti i za potencijalnu terapiju. Naime, membranski potencijal je u direktnoj vezi s diferencijacijskim stanjem stanice što upućuje na to da terminalno diferencirane stanice imaju negativniji membranski potencijal u usporedbi s embrionalnim, matičnim i tumorskim stanicama koje su više depolarizirane (Levin 2014). Mjerenjem membranskog potencijala staničnih linija MCF7, SUM159, HMLETwist i HMLEpBp je djelomično potvrđen takav obrazac. Na slici 7. se vidi kako stanična linija MCF7 ima negativniji potencijal u odnosu na SUM159 koje sadrže veliki udio tumorskih matičnih stanica, no ne postoji razlika u V_m kod modela za TMS dojke, HMLETwist i kontrolnih HMLEpBp stanica (Slika 7) (Ester i sur. neobjavljeni rezultati).

No, i u tumorskim, ali i zdravim stanicama, smatra se da je depolarizacija signal za početak mitoze i sintezu DNA što zapravo omogućuje neprekidan proliferativni signal te u konačnici i malignu transformaciju. Suprotno od toga, hiperpolarizirani V_m prethodi zaustavljanju mitoze. Osim toga, kod nekih staničnih tipova je primjećeno kako tijekom staničnog ciklusa dolazi do kolebanja V_m . Primjerice, na prijelazu iz faze G1 u S stanica se hiperpolarizira te ostaje hiperpolarizirana tijekom faze S, dok se prilikom prijelaza iz G2 u M fazu depolarizira. Naime, vrijednost V_m koja omogućuje napredak kroz stanični ciklus ovisi prvenstveno o tipu stanice, stupnju diferencijacije, ali i gustoći stanica u kulturi. Membranski potencijal je za vrijeme depolarizacije i hiperpolarizacije tumorskih stanica tijekom staničnog

ciklusa, u oba slučaja više depolariziran u odnosu na membranski potencijal zdravih stanica koji je negativniji (Yang i Brackenbury 2013).



Slika 7. Grafički prikaz vrijednosti membranskih potencijala (V_m) staničnih linija MCF7, SUM159, HMLETwist i HMLEpBp. Vrijednosti V_m predstavljaju srednje vrijednosti najmanje šest zasebnih mjerenja. Korištena je metoda Whole cell patch clamp. Preuzeto iz Ester i sur. neobjavljeni rezultati.

Istraživanja su pokazala kako veliku ulogu tijekom staničnog ciklusa i fluktuacije V_m imaju K^+ te bi se stoga inhibicijom određenih kalijevih kanala mogla smanjiti proliferacija tumorskih stanica. Nadalje, pokazano je kako membranski potencijal ima ulogu i u regulaciji migracije stanica raka (Yang i Brackenbury 2013). Stoga bi ionski kanali, naročito K^+ i Ca^{2+} kanali mogli poslužiti kao meta antitumorskih terapija budući da se oni aberantno eksprimirani kanali u tumorskim stanicama razlikuju od onih fizioloških. Također je poznato da je i Na^+/K^+ ATPaza aberantno eksprimirana u različitim tumorima (Pardo i Stühmer 2014). Iz svega navedenog proizlazi da tumorske stanice imaju promijenjena bioelektrična svojstva, pa bi se modulacija bioelektričnih svojstava tih stanica kao što je modulacija membranskog potencijala ili ciljana modulacija pojedinačnih ionskih kanala/transportera mogla potencijalno koristiti za terapiju.

1.4. Stanična smrt

U ovom radu, jedan od ciljeva istraživanja je utvrditi na koji način spoj 613 ubija stanice, odnosno inducira li programiranu staničnu smrt ili pak stanice umiru nekrozom. Obje varijante su moguće kao odgovor stanice na modulaciju membranskog potencijala. Procesom stanične smrti se tkiva višestaničnih organizama uspješno rješavaju oštećenih i nefunkcionalnih stanica. Postoje različiti tipovi stanične smrti koji se uglavnom klasificiraju na temelju morfoloških karakteristika, no u posljednje vrijeme su razvijeni novi biokemijski testovi koji su omogućili klasifikaciju i na temelju biokemijskih značajki (Galluzzi i sur. 2012). Slučajevi stanične smrti se, prema najnovijim spoznajama, mogu podijeliti u dvije široke, međusobno isključive kategorije: „slučajna“ i „regulirana“. Slučajnu staničnu smrt (engl. *accidental cell death*, ACD) uzrokuju teška oštećenja koja nastaju prilikom izlaganja stanica ekstremnim fizičkim, kemijskim ili mehaničkim podražajima. Stanice umiru na nekontroliran način budući da takva stanična smrt ne uključuje nikakvu specifičnu molekularnu mašineriju i ne može se spriječiti. S druge strane, regulirana stanična smrt (engl. *regulated cell death*, RCD) koristi genetički kodiranu mašineriju te se stoga može modulirati, bilo farmakološkim bilo genetičkim intervencijama koje ciljaju ključne komponente te mašinerije. Osim u slučaju mikrookolišnih oštećenja, RCD se pojavljuje i u kontekstu embrionalnog razvoja, imunoloških odgovora i homeostaze tkiva, a takvi slučajevi regulirane stanične smrti se označavaju kao programirana stanična smrt (engl. *programmed cell death*, PCD). Također, s biokemijskog stajališta, slučajevi regulirane stanične smrti mogu biti ovisni ili pak neovisni o enzimu kaspaza (Galluzzi i sur. 2015).

Od različitih tipova stanične smrti, bitno je spomenuti apoptozu, nekrozu, nekroptozu, autofagiju, anoikis. Autofagija je proces razgradnje nepotrebnih i nefunkcionalnih staničnih komponenti kroz proces stvaranja autofagolizosoma, a aktivira se kao odgovor na stres. Anoikis se inducira u adherentnim stanicama kada izgube kontakt s ekstracelularnim matriksom (Kunzelmann 2016). Apoptoza, nekroza te nekroptozu će se detaljnije objasniti u sljedećim poglavljima.

1.4.1. Apoptoza

Najpoznatiji i najučestaliji oblik programirane stanične smrti je apoptoza koja je u višestaničnim organizmima bitna za embrionalni razvoj, homeostazu tkiva te funkcioniranje imunološkog sustava. Apoptozom se organizam riješava oštećenih stanica i omogućuje se kontrola broja stanica. Poremećaji u procesu apoptoze dovode do brojnih patoloških stanja, posebice razvoja raka (Okada i Mak 2004). Stanice u apoptozi imaju specifičnu morfologiju poput skupljanja stanice čime dolazi do kondenzacije citoplazme, a organeli postanu gušće pakirani. Dolazi i do kondenzacije kromatina (piknoza), „blebinga“ membrane, stvaranja „DNA ljestvi“ prilikom cijepanja molekule DNA i apoptotskih tjelešaca koja u konačnici fagocitiraju makrofazi (Kunzelmann 2016). Prilikom ovog procesa ne dolazi do upalne reakcije zato što apoptotske stanice ne otpuštaju stanični sadržaj u okolna tkiva te su vrlo brzo fagocitirane. Apoptotske stanice karakterizira prebacivanje fosfatidilserina s unutarnje strane stanične membrane na vanjsku što fagocitima omogućuje prepoznavanje takvih stanica i daje znak za njihovu fagocitozu (Elmore 2007).

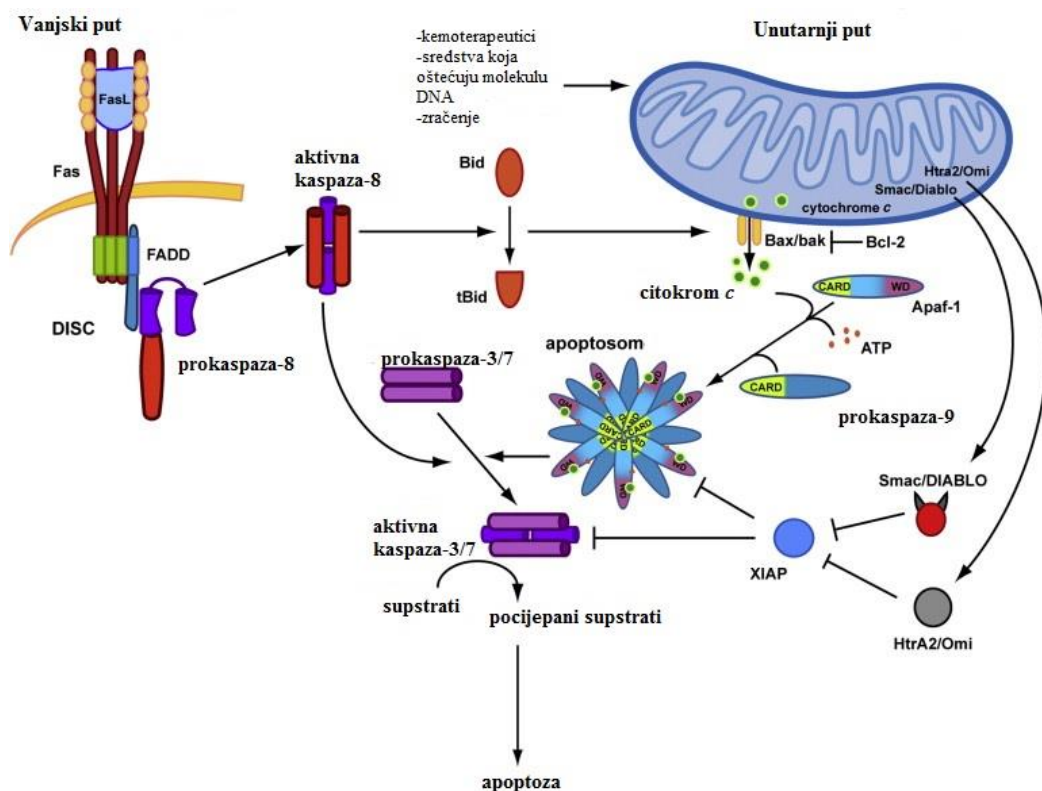
Apoptoza može biti pokrenuta na dva načina, vanjskim i unutarnjim signalnim putem, a u oba slučaja glavni posrednici su kaspaze (Slika 8). Kaspaze su cisteinske proteaze koje su inače unutar stanice prisutne u obliku inaktivnih prokaspaza, a aktiviraju se cijepanjem nakon čega pokreću kaskadu proteolitičkog cijepanja efektorskih kaspaza, a na kraju i proteaza te nukleaza. Cijepaju nakon aminokiseline aspartat po čemu su i dobile ime (engl. *cysteine-rich aspartate proteases*).

Vanjski put apoptoze kreće aktivacijom transmembranskih receptora smrti (FAS i TNFR) vezanjem njihovih liganda FAS i TNF. TNF (engl. *tumor necrosis factor*) je topljivi faktor dok je ligand FAS vezan na plazma membranu susjednih stanica. Njihovim vezanjem dolazi do oligomerizacije receptora i konformacijske promjene u njihovim unutarstaničnim dijelovima čime se otkriva tzv. domena smrti. Glavna uloga te domene je da omogući interakcije s unutarstaničnim adaptorskim proteinima FADD i TRADD koji potom regrutiraju prokaspaze-8. Takav kompleks se naziva DISC (engl. *death inducing signaling complex*). Određene prokaspaze imaju malu enzimatsku aktivnost dovoljnu da pocijepaju same sebe i tako se aktiviraju. Dakle, kaspaza-8 je inicijatorska kaspaza, a dalje proteolitički aktivira efektorske kaspaze poput kaspaze-3,-6,-7. One nastavljaju cijepati proteine poput jezgrinih lamina, citoskeletnih proteina, kinaza, Dnaza što rezultira apoptozom. Ovaj put apoptoze se

može inhibirati proteinom c-FLIP koji se veže na FADD i tako blokira dolazak prokaspaze-8 i njenu aktivaciju.

Unutarnji put apoptoze ne ovisi o vanjskim podražajima nego se pokreće kao odgovor na oštećenja molekule DNA i oksidativni stres. Reguliraju ga članovi Bcl-2 obitelji proteina koji se mogu podijeliti na dvije grupe sa suprotnim funkcijama. Antiapoptotski proteini inhibiraju apoptozu, a među njima ističu se Bcl-2 i Bcl-x_L, dok proapoptotski potiču apoptozu (Bax, Bak) (Pecorino 2012).

Nakon apoptotskog signala, protein Bid veže i aktivira Bax i Bak. Bax se ubacuje u vanjsku mitohondrijsku membranu i zajedno s Bak, membranskim proteinom, mijenja konformaciju i stvara oligomere. Oligomerizacija omogućuje stvaranje kanala unutar mitohondrijske membrane što povećava njenu permeabilnost (Adams i Cory 2007). Zbog toga dolazi do otpuštanja apoptotskih medijatora iz međumembranskog prostora u citosol. Otpuštaju se Smac/DIABLO te citokrom c koji odmah nakon izlaska iz mitohondrija stvara kompleks s citosolnim proteinom Apaf-1 (engl. *apoptosis protease activating factor-1*). Apaf-1 ima vezan dATP, a svojom CARD domenom, koja je prisutna i kod prokaspaze-9, olakšava njenu regrutaciju. Takav kompleks je heptameran i naziva se apoptosom, a upravo njegova struktura omogućuje katalitičku aktivaciju prokaspaze-9. Inicijatorska kaspaza-9 potom aktivira efektorske kaspaze-3,-6,-7 (Fulda i Debatin 2006). Komunikaciju između vanjskog i unutarnjeg puta omogućuje protein Bid kojeg može aktivirati kaspaza-8 (Lamkanfi i sur. 2010).



Slika 8. Vanjski i unutarnji put apoptoze. Vezanje liganda FAS na receptor omogućuje stvaranje kompleksa DISC (engl. *death inducing signaling complex*) u kojem dolazi do aktivacije prokaspaze-8. Aktivna kaspaza-8 između ostaloga cijepa i protein Bid čime omogućuje komunikaciju između vanjskog i unutarnjeg puta apoptoze. Unutarnji put se inače pokreće kao odgovor na oštećenja molekule DNA što pak dovodi do vezanja proteina Bid na Bax i Bak koji potom induciraju otpuštanje citokroma c iz mitohondrija. Citokrom c se veže s Apaf-1 i prokaspazom-9 čime stvaraju apoptosom koji omogućuje aktivaciju kaspaze-9. Kaspaza-9 aktivira kaspaze-3 i -7 koje dalje cijepaju svoje supstrate što stanicu vodi u apoptozu. Preuzeto i prilagođeno prema Lamkanfi i sur. 2010.

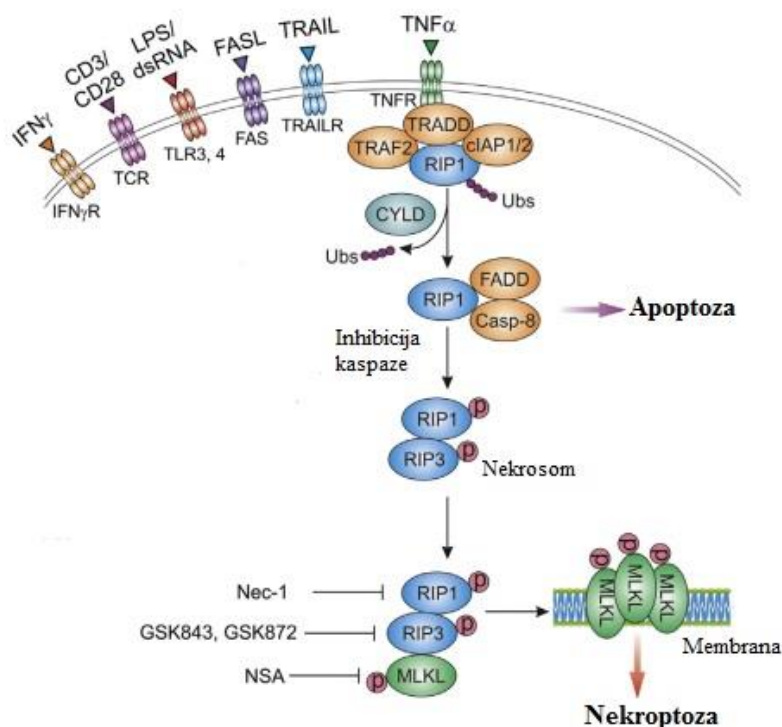
1.4.2. Nekroza

Nekroza je stanična smrt koju karakterizira bubrenje stanice, pucanje stanične membrane te otpuštanje unutarstaničnog sadržaja što potiče upalnu reakciju (Kroemer i Galluzzi 2009). Smatra se slučajnom staničnom smrću. Nekrozu može izazvati osmotski šok, kemijsko ili fizičko oštećenje zbog čega jako brzo dolazi do smrti stanice. Rezultat je gubitka stanične energije odnosno potrošnje ATP-a. Osim toga, ne dolazi do organiziranog cijepanja staničnog sadržaja kao kod programirane stanične smrti. Kod nekroze se molekule DNA, RNA i proteini nasumično degradiraju, dolazi do nekontroliranog, masovnog ulaska Ca^{2+} u stanicu te gubitka integriteta stanične membrane (Bortner i Cidlowski 2014).

1.4.3. Nekroptoza

Nekroptoza se naziva reguliranom nekrozom jer osim što pokazuje morfološke značajke nekroze poput bubrenja stanice, ima točno reguliran stanični mehanizam (Kunzelmann 2016). Javlja se u slučaju kada je apoptoza inhibirana te bi stoga mogla predstavljati mehanizam za ubijanje tumorskih stanica kojima su apoptotski putevi mutirani. Služi kao odgovor na stres, a mogu je inducirati upalni citokini i kemoterapeutici te može biti dominantan tip stanične smrti u slučaju virusne infekcije. Nekroptotske stanice, slično nekrotskim pokazuju veliku potrošnju staničnog ATP-a, za razliku od apoptoze koja zahtijeva relativno visoku razinu ATP-a u stanici. Hoće li stanica umrijeti apoptozom ili pak nekroptozom ovisi o mnoštvu faktora kao što su tip stanice, pH, razina iona, genetička pozadina te vrsta podražaja. Razina stresa i stupanj staničnog oštećenja također utječu na izbor stanične smrti dapače, često može doći i do prebacivanja s apoptotskog puta na nekroptotski. Ključni regulatori nekroptoze su RIP1 (engl. *Receptor-interacting kinase 1*), RIP3 te protein MLKL (engl. *Mixed Lineage Kinase Domain-Like*) koji ima ključnu ulogu u izvršenju stanične smrti (Chen i sur. 2016).

Podražaji koji aktiviraju nekroptozu su isti kao i oni koji potiču vanjski put apoptoze, dakle TNF obitelj citokina, ligand FAS i TRAIL (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Nakon vezanja liganda na njihove receptore, aktivirani receptori ostvaruju interakciju s proteinom RIP1 i regrutiraju inhibitore apoptotskih proteina (cIAP1 i cIAP2) koji poliubikvitiniraju RIP1. Otpuštanje proteina SMAC (engl. *second mitochondria-derived activator of caspases*) koji pak inhibira cIAP vodi do deubikvitinacije RIP1 i njegove disocijacije. U slučaju kada apoptotski putevi u stanici nisu inhibirani, RIP1 se potom veže na FADD (engl. *FAS-Associated Death Domain*) čime regrutira kaspazu-8 koja dalje inducira apoptozu. No, u slučaju kad je kaspaza-8 inhibirana, RIP1 se veže s RIP3 te na taj način tvore nekrosom. Tim kompleksom se omogućuje autofosforilacija RIP3 koji onda veže i fosforilira MLKL kinazu. To rezultira oligomerizacijom proteina MLKL, njihovim ubacivanjem u staničnu membranu što narušava integritet membrane i u konačnici dovodi do nekroptotske smrti (Slika 9). Pretpostavlja se da oligomerizirani MLKL omogućuje ulazak Na^+ i Ca^{2+} u stanicu što također potiče staničnu smrt.



Slika 9. Mehanizam i regulatori nekroptoze. Nakon vezanja liganda na njihove receptore, aktivirani receptori ostvaruju interakciju s proteinom RIP1 kojega proteini cIAP poliubikvitiniraju. Inhibitori proteina cIAP dovode pak do deubikvitinacije RIP1 i njegove disocijacije. U slučaju kada apoptotski putevi u stanici nisu inhibirani, RIP1 se veže na FADD regrutirajući na taj način kaspazu-8 koja dalje inducira apoptozu. U slučaju kad je kaspaza-8 inhibirana, RIP1 se veže s RIP3 te tvore nekrosom. Taj kompleks omogućuje autofosforilaciju RIP3 koji onda veže i fosforilira MLKL kinazu. To omogućuje oligomerizaciju proteina MLKL, njihovo ubacivanje u staničnu membranu i u konačnici vodi stanicu u nekroptozu. Preuzeto i prilagođeno prema Chen i sur. 2016.

Permeabilizacija stanične membrane tijekom nekroptoze dovodi do otpuštanja tzv. DAMP (engl. *Damage Associated Molecular Patterns*) u okolno tkivo koji mogu izazvati imunološki odgovor te upalu. Stanice imunološkog sustava uklanjaju nekroptotične zaostatke i popravljaju oštećeno tkivo. Također, genetičke te epigenetičke promjene regulatora nekroptoze se često mogu pronaći kod tumora koji na taj način izbjegavaju staničnu smrt (Chen i sur. 2016). Stoga je razumijevanje nekroptoze, apoptoze, ali i drugih načina stanične smrti ključno za razvoj novih terapijskih strategija kojima bi se poboljšala terapija tumora.

1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je utvrditi na koji način krunasti eter 613 djeluje na stanične linije dojke, odnosno istražiti mehanizam njegovog djelovanja. S obzirom na strukturu spoja, spoj bi mogao djelovati kao mobilni nosač za ione kalija i natrija, pa će se određivati utječe li spoj na promjenu membranskog potencijala u stanicama. Budući da je u prijašnjim istraživanjima pokazano kako spoj 613 djeluje inhibitorno na rast nekoliko tumorskih staničnih linija, utvrđivat će se antiproliferativni učinak na različite stanične linije dojke. Nadalje će se pokušati odrediti na koji način 613 ubija stanice; inducira li apoptozu ili stanice umiru nekrozom. Na kraju će se usporediti osjetljivost tumorskih staničnih linija dojke i tumorskih matičnih stanica dojke na promjene membranskog potencijala.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Popis korištenih materijala i priprema otopina

2.1.1. Sastav medija za uzgoj stanica

Različite stanične linije zahtijevaju različite medije kako bi mogle uspješno rasti u kulturi. Tako stanična linija MCF7 raste u mediju DMEM, SUM159 u F12, a HMLEpBp i HMLETwist u mediju HUMEK. Svi mediji korišteni u radu sa stanicama su sterilni.

DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) je složeni hranjivi medij (Lonza, SAD) koji se kompletira dodatnim otopinama do konačnog sastava: 10 % fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (Lonza, SAD), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, SAD), 1 U/mL penicilina i 1 µg/mL streptomicina (Sigma-Aldrich, SAD).

HAM F12 je složeni hranjivi medij (Lonza, SAD) u koji se dodaje FBS do 5 %, L-glutamin (2 mM), antibiotici penicilin-streptomicin (500 U/500 mL), 5 µg/mL inzulina i 1 µg/mL hidrokortizona.

HUMEK (GIBCO, Invitrogen, SAD) je također složeni hranjivi medij koji se priprema miješanjem 250 mL kompletiranog DMEM-a i 250 mL HUMEK-a u kojeg je dodano 1,25 mL ekstrakta hipofize (GIBCO, Invitrogen, SAD), 2,5 mL Gibcovog suplementa (GIBCO, Invitrogen, SAD), 5 mL 50 µg/mL hidrokortizona (Sigma-Aldrich, SAD) i 125 µL 10 mg/mL inzulina (Sigma-Aldrich, SAD).

Medij za zamrzavanje se dodaje stanicama prilikom zamrzavanja, a sadrži 90 % FBS i 10 % DMSO.

2.1.2. Sastav i priprema otopina

Sve otopine korištene u radu sa stanicama su sterilne.

PBS (engl. *phosphate buffered saline*) je pufer proizvođača Lonza, SAD, 10 x koncentriran. Za eksperimente se razrijeđuje sterilnom destiliranom vodom do koncentracije 1 x. Priprema se otapanjem sljedećih sastojaka: 100 g NaCl, 2,5 g KCl, 14,35 g Na₂HPO₄, 2,5 g KH₂PO₄ te se nadopuni destiliranom H₂O do 1 L.

Trypsin se priprema dodatkom 100 mL 10 x koncentriranog tripsina, proizvođača GIBCO, Invitrogen, SAD, u 900 mL sterilnog PBS-a, pripremljenog kako je prethodno opisano. Vrijednost pH otopine iznosi 7,4.

Trypansko modriло se priprema otapanjem praha u PBS-u te se profiltrira. Koristimo 0,4 % otopinu.

4 % paraformaldehid se priprema otapanjem paraformaldehida u prahu (Polysciences, Inc, SAD) u PBS-u. Otopina se zagrijava do ključanja u mikrovalnoj pećnici.

FITC Annexin V je konjugirano antitijelo proizvođača BD Biosciences, SAD.

Propidij jodid u prahu se otopi u destiliranoj vodi do koncentracije 1 mg/mL (Sigma-Aldrich, SAD). Koncentracija koja se koristi u eksperimentu je 2 µg/mL.

Pufer za aneksin (engl. *Annexin-binding buffer*, ABB) se priprema miješanjem 0,1 M HEPES, 1,4 M NaCl i 25 mM CaCl₂ čime se dobije 10 x koncentrirana otopina koju za eksperiment razrjeđujemo PBS-om kako bi u konačnici imali 1 x otopinu.

BD FACSTFlow™ Sheat Fluid sadrži natrijev fluorid, a proizvođač je BD Biosciences, SAD.

7-AAD (7-Aminoaktinomycin D) je fluorescentna boja (Invitrogen, SAD) koja se otapa u DMSO-u do koncentracije 1 mg/mL. Koncentracija koja se koristi u eksperimentu iznosi 2 µg/mL.

DiBAC₄(3), (bis(1,3-dibutilbarbituratna kiselina) trimetin oksonol) - DiBAC₄(3) u prahu se otopi u DMSO-u do koncentracije 12 mM (Sigma-Aldrich, SAD). U eksperimentu se koristi 100 nM koncentracija.

Gramicidin se priprema otapanjem praha (Sigma-Aldrich, SAD) u etanolu prilikom čega se dobije otopina koncentracije 10 mM. Koncentracija koja se koristi u eksperimentu je 10 μ M.

HBSS (engl. *Hanks Balanced Salt Solution*) je pufer (Lonza, SAD) sastava: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,186 g/L), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L), KCl (0,4 g/L), KH_2PO_4 (0,06 g/L), NaHCO_3 (0,35 g/L), NaCl (8 g/L), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,09 g/L).

Reagens MTT se priprema kao 10 x koncentrirana matična otopina otapanjem 1 g Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma-Aldrich, SAD) u 200 mL PBS-a.

613 je krunasti eter kemijske formule N,N'-Bis[2-(1-adamantil)etil]-4,13-diaza-18-kruna-6. Otopljen je u DMSO-u u koncentraciji 4 mM, a sintetiziran je u Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković. Razrjeđuje se u DMSO-u ovisno o eksperimentu.

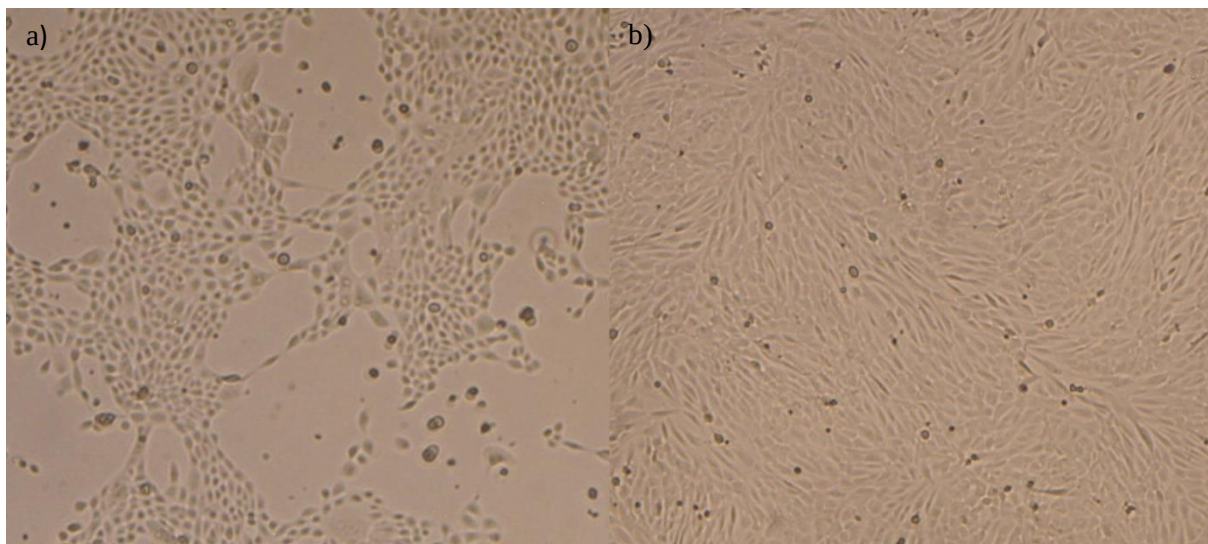
2.1.3. Stanične linije

Stanične linije na kojima se ispitivao učinak spoja 613 su MCF7, SUM159, HMLEpBp i HMLETwist.

Tablica 1. Popis korištenih staničnih linija

Stanična linija	Porijeklo	Opis stanične linije	Napomene
MCF7	ATCC [®] HTB-22 TM	Epitelne stanice adenokarcinoma dojke	Nizak udio tumorskih matičnih stanica (TMS) dojke unutar čitave populacije
SUM159	Dobivene iz laboratorija Dr. RA Weinberg, MIT, SAD	Primarni karcinom dojke	Visok udio TMS
HMLETwist	Dobivene od Dr. Tamer T. Onder, Koç University, School of Medicine, Istanbul	Imortalizirane epitelne stanice dojke s pojačano eksprimiranim transkripcijskim faktorom Twist	Model tumorskih matičnih stanica dojke <i>in vitro</i>
HMLEpBp	Dobivene od Dr. Tamer T. Onder, Koç University, School of Medicine, Istanbul	Imortalizirane epitelne stanice dojke	Model tumorskih matičnih stanica dojke <i>in vitro</i> (kontrola)

Stanice HMLE su ljudske epitelne stanice dojke izolirane iz tkiva, a imortalizirane su transformacijom pomoću vektora koji nosi veliki T antigen virusa SV40 i i hTERT podjedinicu telomeraze (Elenbaas i sur. 2001). Proces njihovog nastanka detaljno je opisan u poglavlju Uvod, a morfološka razlika između HMLETwist i kontrolnih HMLEpBp stanica je vidljiva na Slici 10.



Slika 10. Stanične linije a) HMLEpBp i b) HMLETwist pod svjetlosnim mikroskopom, pri povećanju 100x.

2.2 Rad sa stanicama u kulturi

Prilikom rada sa stanicama je veoma bitno da sve bude sterilno što podrazumijeva rad u sterilnim uvjetima u laminaru s okomitim strujanjem zraka. Upotrebljavaju se sterilne staklene pipete i sterilni nastavci za mikropipete te sterilne epruvete. Stanice se uzgajaju u plastičnim bocama različitih veličina s filterom na čepu koji omogućuje protok zraka. Drže se u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C i 5 % ugljikovom dioksidu. Za presađivanje i rad sa stanicama koriste se i odgovarajući sterilni mediji i otopine. Kako bi se nakon rada sa stanicama ostaci stanica i medija dezinficirali, koristi se 1-5 % otopina Asepsola.

2.2.1. Presađivanje stanica

Stanice se presađuju dva puta tjedno, ovisno o eksperimentu. U laminaru se staklenom pipetom ukloni stari medij iz boce. U sljedećem koraku se za ispiranje dodaje tripsin s EDTA, laganim okretanjem boce se prelije preko stanica i izbací. Još jednom se ponovi isti korak, međutim ovaj put se ostavi malo tripsina (otprilike 1 mL) kako bi se stanice tripsinizirale te se stave u inkubator. Stanice se uglavnom inkubiraju 5 min, no primjerice HMLEpBp se čvrsto vežu za podlogu pa ih je potrebno držati u tripsinu 10-15 minuta. Tripsin omogućuje odvajanje stanica od podloge cijepajući aminokiselinske lance adhezijskih proteina koji pak omogućuju interakcije stanice i podloge, ali i stanice s drugim stanicama. EDTA je kelator, što znači da veže metalne ione poput Ca^{2+} koji su potrebni kadherinima za povezivanje stanica. Nakon inkubacije, tripsin se inaktivira dodatkom odgovarajućeg medija. Stanicama u boci se u konačnici doda 10 mL novog medija, pod invertnim svjetlosnim mikroskopom se provjeri gustoća stanica i stavi u inkubator.

Kod HMLETwist se s vremena na vrijeme napravi kratka tripsinizacija što znači da se tripsin drži otprilike 1-2 minute. Kratka tripsinizacija je potrebna kako bi se osigurali da imamo čistu Twist liniju, bez mutacija. Te stanice spontano mutiraju i mogu početi eksprimirati E-kadherin, dok one stanice koje su se podigle za tako kratko vrijeme sigurno pojačano eksprimiraju Twist i nemaju E-kadherin. Nakon toga se sterilnom pipetom pokupe stanice skupa s tripsinom i to se prebaci u sterilnu epruvetu. Doda se 10 mL medija HUMEC tim stanicama u epruveti i centrifugira 5 min, 1500 rpm na sobnoj temperaturi. Odlije se supernatant, a pelet resuspendira u 10 mL novog medija te prebaci u novu bocu.

2.2.2. Brojanje stanica

Kako bi rezultati bili reproducibilni, za svaki eksperiment je potrebno imati određen broj stanica. Stanice se broje pomoću tripanskog modrila. Tripansko modrilo boji mrtve stanice zbog propusnosti njihove oštećene membrane, dok žive ostaju nebojane. Dakle, nakon resuspendiranja u odgovarajućem mediju, uzme se 20 μL stanične suspenzije i u jažici mikrotitarske pločice se pomiješa s 80 μL tripanskog modrila tako da je suspenzija razrijeđena pet puta. Dio tog volumena se prebaci u komoricu za brojanje. Pod svjetlosnim mikroskopom se broje samo žive stanice koje se nalaze u četiri rubna kvadrata. S obzirom na volumen komorice i razrjeđenje stanične suspenzije, izračuna se broj stanica po mL prema sljedećem izrazu:

$$\text{br. st./mL} = N/4 \cdot 5 \cdot 10^4$$

gdje je N broj stanica u četiri kvadrata komorice, broj 5 predstavlja razrjeđenje stanične suspenzije u tripanskom modrilu (20 μL + 80 μL), a 10^4 se odnosi na volumen komorice ($1 \cdot 1 \cdot 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ mL}$; dakle 10^{-4} je volumen jednog kvadrata).

2.2.3. Zamrzavanje stanica

Stanice se u pravilu zamrzavaju jednu do dvije pasaže nakon odmrzavanja. Proces zamrzavanja stanica se provodi u sterilnim uvjetima u laminaru. Stanice se tripsiniziraju, a tripsin se inaktivira dodatkom 10 mL odgovarajućeg medija. Stanice se centrifugiraju 5 min, 1500 rpm na sobnoj temperaturi. Talog se resuspendira u 1 mL medija za zamrzavanje te se to prebaci u ampulu za zamrzavanje. Ampula se stavlja u zamrzivač na -80°C za kraću pohranu, a za dugotrajnu pohranu se stavlja u tekući dušik. DMSO se koristi kao krioprotektant jer sprječava stvaranje kristalića leda koji bi prilikom zamrzavanja uništili membranu te tako ubili stanice.

2.2.4. Odmrzavanje stanica

Stanice se odmrzavaju također u sterilnim uvjetima u laminaru. Ampula sa stanicama se izvadi iz zamrzivača te se prvo malo zagrije u ruci kako bi se stanice otopile. U sterilnu epruvetu se doda nekoliko mililitara kompletiranog medija u koji se, nakon otapanja, sterilnom pipetom prebace stanice. Stanice se centrifugiraju 5 min, 1500 rpm na sobnoj temperaturi kako bismo uklonili DMSO koji je toksičan za stanice pri temperaturama višim od 4 °C i zatim nasade u hranjivi medij.

2.3. Određivanje apoptoze korištenjem metode Annexin V-FITC

Kako bi se utvrdilo na koji način spoj 613 ubija stanice odnosno inducira li apoptozu, koristi se test Annexin V-FITC (BD Biosciences, SAD). U ovu svrhu, stanice se nasaduju u pločice sa 6 jažica tako da bude 100 000 stanica po jažici. Stanice se inkubiraju 24 h. Nakon 24 h slijedi tretman spojem 613. Spoj se prije tretmana mora sonificirati 30 minuta u ultrazvučnoj kupelji te dobro resuspendirati. Koncentracija matične otopine iznosi $4 \cdot 10^{-3}$ M. Koncentracije spoja koje su testirane su 1 μ M, 2 μ M te 5 μ M, a dvije jažice se tretiraju dok ostale služe kao kontrolne kojima se samo promijeni medij. Stanice se sa spojem inkubiraju 1 h, 3 h, 6 h, 24 h odnosno 48 h.

Nakon tretmana se stanice pripremaju za protočnu citometriju. Prvo se pokupi medij iz jažica (medij se skuplja jer se u njemu nalaze mrtve stanice koje su potrebne za analizu), stanice se isperu PBS-om i tripsiniziraju; dodaje se 500 μ L tripsina po jažici, a inkubiraju se 5 minuta. Nakon toga se stanice sjedine s medijem u kojem su rasle. Stanice se centrifugiraju 5 min, 1500 rpm na sobnoj temperaturi. Talog se resuspendira u svježem mediju. Stanice se resuspendiraju te izbroje. Izračuna se volumen stanične suspenzije koji je potrebno uzeti da bismo imali 100 000 stanica za analizu na protočnom citometru. Uzorcima se dodaju sljedeće otopine redoslijedom kako je navedeno u Tablici 2.

Tablica 2. Otopine i redoslijed njihovog dodavanja prilikom pripreme stanica za analizu

	Redoslijed dodavanja			
	1.	2.	3.	4.
Nebojana kontrola	400 μ L ABB pufer	-	100 μ L ABB	400 μ L ABB
Kontrola bojana aneksinom i PI	400 μ L ABB pufer	-	2,5 μ L aneksina u 100 μ L ABB**	400 μ L ABB
Kontrola tretirana 4% PFA sa aneksinom	400 μ L ABB pufer	200 μ L 4 % PFA*	2,5 μ L aneksina u 100 μ L ABB	400 μ L ABB
Kontrola tretirana 4% PFA sa PI	400 μ L ABB pufer	200 μ L 4 % PFA	100 μ L ABB	400 μ L ABB
Kontrola tretirana 4% PFA, sa aneksinom i PI	400 μ L ABB pufer	200 μ L 4 % PFA	2,5 μ L aneksina u 100 μ L ABB	400 μ L ABB
Tretman spojem 613	400 μ L ABB pufer	-	2,5 μ L aneksina u 100 μ L ABB	400 μ L ABB

*nakon dodatka 4% PFA, svi uzorci se inkubiraju 15 min na sobnoj temperaturi te centrifugiraju 5 min na 1500 rpm

**nakon dodavanja aneksina stanice se inkubiraju 15 min u mraku

U suspenziju konačnog volumena 500 μ L se dodaje PI odnosno 7-AAD (2 μ g/mL). Propidij jodid je fluorescentna, interkalirajuća boja koja se ugrađuje između baza molekule DNA. PI ne može proći kroz membrane živih stanica stoga se koristi u protočnoj citometriji za razlikovanje živih i mrtvih stanica. Ima ekscitacijski maksimum na 535 nm, a emisijski na 617 nm te fluorescira crveno. U nekim eksperimentima korištena je i boja 7-Aminoaktinomicin D (7-AAD) umjesto propidij jodida iste koncentracije. 7-AAD je također fluorescentni interkalator koji ulazi samo u mrtve stanice. Pobuđuje se na 488 nm, a emisijski maksimum ima na 647 nm.

Dakle, fluorescentni spoj apsorbira svjetlosnu energiju određene valne duljine koja je karakteristična za njega te ta energija pomiče njegov elektron na višu energetska razinu.

Pobuđeni elektron se vrlo brzo vraća u svoje osnovno stanje pritom emitirajući energiju u obliku svjetlosti i to se naziva fluorescencijom. To se odnosi na prethodno spomenute spojeve kao i na FITC Aneksin V. Aneksin V je član aneksinske obitelji unutarstaničnih proteina koji se vežu na fosfatidilserin ovisno o kalciju. Fosfatidilserin se normalno nalazi na unutrašnjoj strani membrane, no tijekom apoptoze se translocira na vanjsku stranu. Konjugira se s fluorokromom FITC koji se onda koristi za detekciju apoptotskih stanica i fluorescira zeleno.

ABB pufer se dodaje zato što sadrži Ca^{2+} ione koji omogućuju vezanje aneksina na fosfatidilserin koji se kod apoptotskih stanica prebacuje s unutrašnje strane lipidnog dvosloja membrane, na vanjsku. PFA služi za fiksaciju stanica jer radi unakrsne veze između makromolekula čime ubija stanice. Stoga u takvim tretmanima imamo mrtve stanice koje će se obojati aneksinom i PI što nam pak služi kao kontrola za zelenu odnosno crvenu fluorescenciju prilikom analize željenog uzorka.

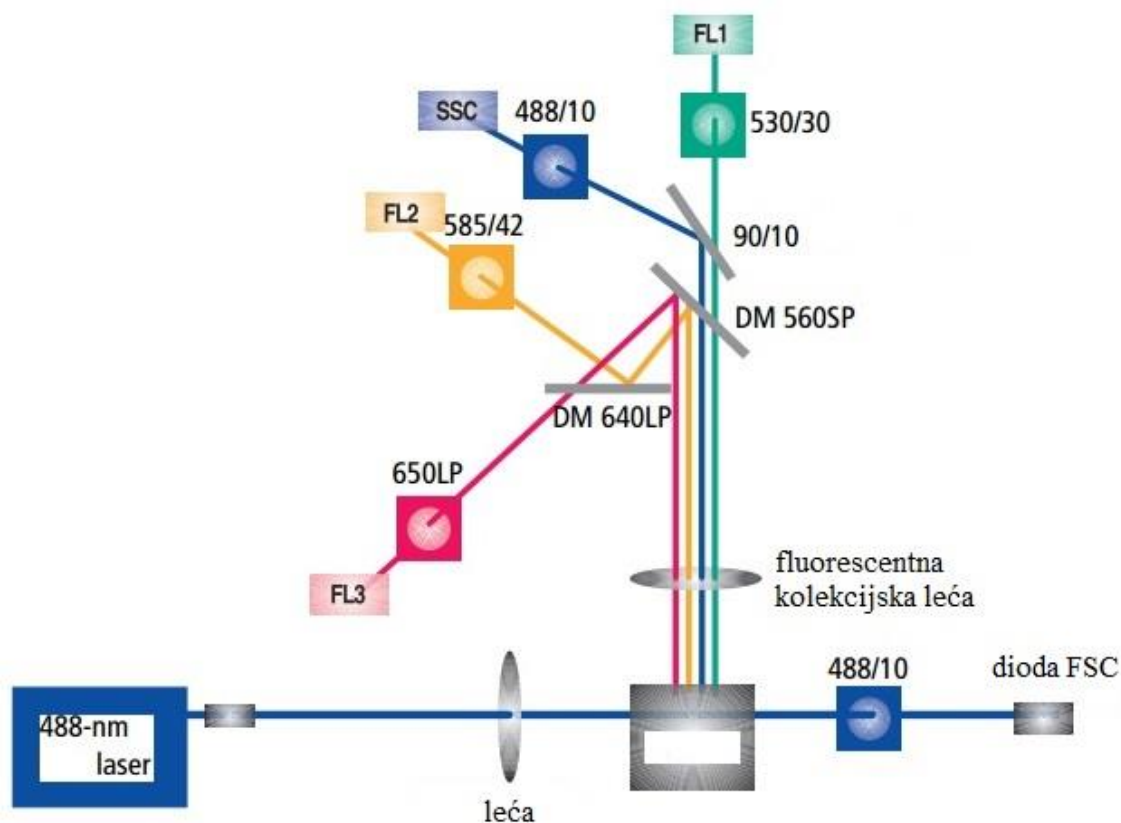
2.3.1. Protočna citometrija

Protočna citometrija je metoda kojom se mjere i analiziraju fizička svojstva stanica kao što su veličina stanice, morfološka kompleksnost te intenzitet fluorescencije. Također, pomoću protočnog citometra se stanice u suspenziji mogu izbrojati te sortirati ukoliko se radi o sorteru. Protočni citometar se sastoji od tri međusobno povezana sustava: protočni, optički te elektronički (BD Biosciences. 2002). Princip rada se temelji na tome da stanice iz suspenzije pojedinačno dolaze do snopa laserske svjetlosti prilikom čega se svjetlost raspršuje od stanice. Stupanj raspršenja svjetlosti je pokazatelj fizičkih osobina stanice – veličine (svjetlost koja se raspršila pod malim kutom od $0,5-10^\circ$, FSC - prema engl. *forward scatter*) i zrnatosti (svjetlost raspršena pod pravim kutom - SSC, prema engl. *side scatter*). Ukoliko je čestica fluorescentno obilježena, mogu se dobiti i informacije o intenzitetu fluorescencije. Fluorescentne boje su obično konjugirane s monoklonskim antitijelima te se različiti fluorokromi mogu koristiti za razlikovanje odvojenih subpopulacija stanica (Batinić i sur. 2006).

Dakle, protočni sustav (cijevi, ventili i pumpa) omogućuje da stanice iz stanične suspenzije pojedinačno laminarnim protokom kroz sustav uske kapilare dolaze do laserske zrake koja zajedno s optičkim filterima i detektorima sačinjava optički sustav. Stanična suspenzija se nalazi u epruveti za protočni citometar koja se postavlja na instrument prilikom

čega stanice ulaze u kapilaru okružene tekućinom koja je u našem slučaju *BD Sheat Fluid*. Protok te tekućine ubrzava čestice i ograničava ih na centar kapilare. Taj proces se naziva hidrodinamičko fokusiranje (BD Biosciences. 2002). Postoje i tri načina na koja se može upravljati protokom kroz protočni citometar: *run*, *standby* i *prime*. Pritiskom na dugme *run* se stvara pritisak koji omogućuje transport stanične suspenzije kroz kapilaru, *standby* zaustavlja protok *BD Sheat Fluid*-a, dok se pomoću *prime* opcije izbacuju mjehurići iz kapilare. Uzorci se mogu propuštati na tri različite brzine: *low*, *medium* i *high*. Osim toga, protočni citometar ima i dva rezervoara; u jedan se ulijeva *BD Sheat Fluid*, a drugi je rezervoar za otpad u kojeg odlaze stanice nakon prolaska kroz lasersku zraku. Koristi se laser koji je argon-ionski, 488-nanometarski laser zato što emitira svjetlost valne duljine 488 nm koja pobuđuje veliki broj fluorokroma.

Fluorescentni signali se zajedno sa signalima SSC skupljaju pomoću fluorescentne kolekcijske leće, a spektralno se razdvajaju dikroičnim zrcalima. Protočni citometar, BD FACSCalibur, sadrži detektore za tri fluorescentna parametra (FL1, FL2, FL3) za različite valne duljine, a pored toga postoji i dioda koja registrira svjetlosne signale laserske zrake koja direktno osvjetljava stanice (FSC prema engl. *forward scatter*) (Slika 11). Elektronični sustav pretvara detektirane svjetlosne signale u elektroničke signale koje onda može procesirati računalno (BD Biosciences. 2007).



Slika 11. Optički sustav BD FACSCalibur protočnog citometra. Prikazani su dijelovi optičkog sustava koji omogućuju sakupljanje SSC i fluorescentnih signala (kolekcijska leća), dioda FSC koja sakuplja signale FSC, zrcala koja razdvajaju signale (DM prema engl. *dichroic mirrors*) te detektori fluorescentnih signala. Preuzeto i prilagođeno prema BD Biosciences. 2007.

Prije analize uzoraka na protočnom citometru potrebno je pokrenuti program BD CellQuest™ Pro te postaviti parametre za eksperiment. Dakle, svi uzorci su analizirani u navedenom programu, a namještaju se parametri za SSC i FSC te FL1 i FL3 detektore. Namjesti se i broj događaja nakon kojega uređaj prestaje analizirati i koji se spremaju, a to je 10 000 što znači da se po svakom uzorku propušta 10 000 stanica.

Propuštanje i analiza uzoraka na protočnom citometru

Prilikom određivanja apoptoze korištenjem metode Annexin V-FITC prvo se kratko propusti neobojani kontrolni uzorak te nakon toga uzorci tretirani paraformaldehidom kako bi se, ukoliko je potrebno, podesili parametri za FSC/SSC i fluorescentne detektore. To se radi kako bi populacija stanica od interesa bila najbolje vidljiva u odabranom prikazu. Nakon namještanja svih parametara, propuštaju se uzorci, a dobiveni rezultati se analiziraju u programu FlowJo.

Analiza podataka u programu FlowJo

Aneksin se detektira FL1 detektorom, a PI i 7-AAD detektorom FL3, no budući da se njihov emisijski spektar preklapa, potrebno je napraviti kompenzaciju koja će umanjiti preklapanje. Prvo se otvori uzorak PFA samo sa aneksinom te se označe populacije stanica koje su aneksin negativne te aneksin pozitivne. U uzorku PFA samo PI/7-AAD se označe populacije stanica koje su PI negativne te PI pozitivne. Nakon toga se otvori *Compensation* gdje se privuku uzorci s označenim populacijama te se dobiju kompenzirani FL1 i FL3. Kad se napravi kompenzacija, na kontrolni i tretirani uzorak se postave četiri kvadranta u kojima se mogu razlikovati različite populacije stanica. Dobiveni podaci se spremaju u Excel.

2.4. Praćenje membranskog potencijala pomoću potenciometrijske boje DiBAC₄(3)

Kako bi se utvrdilo djeluje li spoj 613 na membranski potencijal stanica, provedeni su eksperimenti na protočnom citometru uz pomoć potenciometrijske boje DiBAC₄(3). DiBAC₄(3) je anionska boja koja ulazi u pozitivno nabijene stanice, dakle više boje će ulaziti što su stanice pozitivnije odnosno, u stanice koje su depolarizirane. Dakle, intenzitet fluorescencije je direktno proporcionalan depolarizaciji stanice. S obzirom da su mitohondriji negativniji od ostatka stanice, DiBAC₄(3) neće ulaziti u mitohondrije. Korištenjem ove boje smo sigurni da se ne detektiraju promjene na razini mitohondrija, nego na razini cijele stanice. DiBAC₄(3) je fluorescentna boja koja ima ekscitacijski maksimum na 490 nm, a emisijski na 515 nm.

U tu svrhu se stanice, iz boce u kojoj rastu, tripsiniziraju te prebroje. Potrebno je 250 000 stanica, a izračunati volumen stanične suspenzije se prebaci u epruvete za protočni citometar. Trebaju nam četiri epruvete od kojih će jedna biti kontrolna, jedna tretirana spojem 613, a preostale dvije tretirane gramicidinom i KCl-om. Stanice se centrifugiraju 5 min, 1500 rpm na sobnoj temperaturi, nakon čega se isperu u puferu HBSS te opet centrifugiraju. Talog se resuspendira u 500 µL pufera HBSS i stanice su spremne za analizu na protočnom citometru. Osim toga, naprave se i predrzrijeđenja spojeva i boje u DMSO-u prema Tablici 3, koji će se direktno prije analize na protočnom citometru još dodatno razrijediti u 500 µL stanične suspenzije. Priredi se i epruveta s DMSO-om koji će se koristiti kao kontrola.

Tablica 3. Početne i konačne koncentracije spojeva prema kojima se rade predrzrijeđenja u DMSO-u

Spoj	Početna koncentracija	Konačna koncentracija
613	4 mM	10 µM
Gramicidin	10 mM	10 µM
KCl	2,5 M	50 mM
DiBAC ₄ (3)	12 mM	100 nM

Kod protočnog citometra je procedura ista kao što je opisano za prethodnu metodu (potpoglavlje 2.3.1.) osim što se stanice inkubiraju sa spojevima i bojom direktno prije same analize na protočnom citometru (Shapiro 2004). Dakle, u kontrolnu epruvetu sa stanicama se doda DMSO i to se inkubira 5 minuta nakon čega se doda DiBAC₄(3) i opet inkubira u mraku

5 minuta. Nakon toga se propušta uzorak. Zatim se redom dodaju i ostali spojevi koji se inkubiraju 5 min nakon čega opet ide boja. Razlika je jedino u tome što se DiBAC₄(3) detektira FL2 detektorom. Rezultati se opet obrađuju u programu FlowJo.

2.5. Određivanje antiproliferativnog učinka spoja 613 na stanične linije dojke

Za određivanje citotoksičnosti spoja 613 odnosno za kvantifikaciju preživljenja i proliferacije stanica korišten je test MTT. To je kolorimetrijski test koji se temelji na redukciji topljive tetrazolijum boje MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) u netopljivi formazan. Dakle, žive stanice pomoću mitohondrijskih dehidrogenaza pretvaraju MTT u formazan što se vidi kao ljubičasto obojenje. S druge strane, mrtve stanice gube tu sposobnost i nema nikakvog obojenja.

Stanice se prvo odvoje od podloge i prebace u epruvetu te prebroje prema gore opisanom protokolu. Nakon što se stanice prebroje, trebaju se nasaditi u mikrotitarske pločice s 96 jažica. Broj stanica koji će se nasaditi ovisi o brzini rasta svake stanične linije i naveden je u Tablici 4.

Tablica 4. Broj stanica nasaden po jažici

Stanična linija	Broj stanica/jažici
HMLEpBp	1000
HMLETwist	1000
MCF7	3000
SUM159	2000

U dvije mikrotitarske pločice nasadi se po 150 μ L po jažici s ukupnim brojem stanica ovisnim o staničnoj liniji (Tablica 4). Jedan stupac se ostavi prazan za slijepu probu. Nakon 24 h stanice se tretiraju spojem 613.

Spoj 613 se razrijeđuje u kompletiranom DMEM-u tako da imamo deset različitih koncentracija. Stanice se tretiraju koncentracijama spoja u vrijednosti od $1,25 \cdot 10^{-5}$ M do $1,25 \cdot 10^{-8}$ M. Dodaje se 50 μ L spoja po jažici, a svaka koncentracija se pipetira u triplicatima. Zadnji stupac u pločici služi kao kontrola te se tu samo doda 50 μ L medija. Nakon 72 h se

podvrgnu testu MTT. S pločica se odstrani medij i doda 40 μL 1 x reagensa MTT u sve jažice, uključujući i slijepu probu. Pločice se zamotaju u aluminijsku foliju i drže u inkubatoru sljedeća 4 h. Nakon 4 h u jažice se doda 160 μL DMSO-a, malo se promiješa tipsevima i stavi na tresilicu 5 minuta. DMSO otapa nastale kristaliće formazana. Nakon toga se očitavaju rezultati na čitaču mikrotitarskih pločica (Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific, SAD). Apsorbancija se mjeri na 570 nm na čitaču i direktno je proporcionalna preživljenju stanica. Nakon očitavanja vrijednosti apsorbancije, izračuna se postotak preživljenja za svaku staničnu liniju prema sljedećoj formuli:

$$\text{Postotak preživljenja} = (\text{OD}_{\text{test}} - \text{OD}_{\text{sp}} / \text{OD}_{\text{ctrl}} - \text{OD}_{\text{sp}}) \cdot 100$$

gdje je:

OD_{test} = optička gustoća tretiranih stanica nakon željenog perioda

OD_{ctrl} = optička gustoća kontrolnih stanica nakon željenog perioda

OD_{sp} = optička gustoća slijepe probe

2.6. Statistička obrada podataka

Iz rezultata dobivenih testom MTT izračunaju se srednje vrijednosti tri zasebna eksperimenta te njihove standardne devijacije. U Excelu se pomoću tih podataka izradi krivulja preživljenja iz koje se linearnom regresijom izračuna vrijednost IC_{50} .

Za rezultate testa Aneksin V-FITC također su izračunate srednje vrijednosti medijana fluorescencije svih pokusa i standardne devijacije.

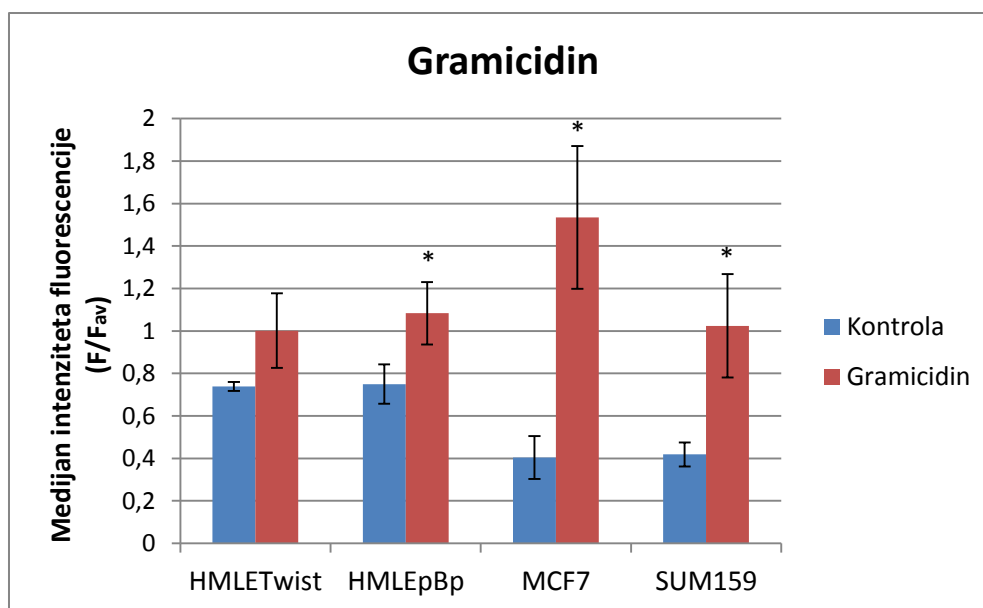
Rezultati DiBAC₄(3) analize su statistički obrađeni pomoću programa Excel, a napravljen je t-test za nesparene uzorke koji imaju pravilnu distribuciju da bi se procjenila statistička značajnost razlike između skupina. Za svaku staničnu liniju smo radili minimalno tri pokusa, a u svakom pokusu su srednje vrijednosti medijana fluorescencije normalizirane prema kontroli. Određeno je da p vrijednost mora biti manja od 0,05 da bi razlika bila statistički značajna.

3. REZULTATI

U ovom radu istražen je mehanizam djelovanja krunastog etera 613 na stanične linije tumora dojke i na TMS dojke. Stanične linije na kojima se spoj testirao su MCF7, SUM159, HMLETwist i HMLEpBp. Budući da je pokazano kako spojevi iz reda krunastih etera imaju antiproliferativno djelovanje, 613 po svim karakteristikama opisanim u poglavlju Uvod izgleda kao obećavajuća antitumorska terapija.

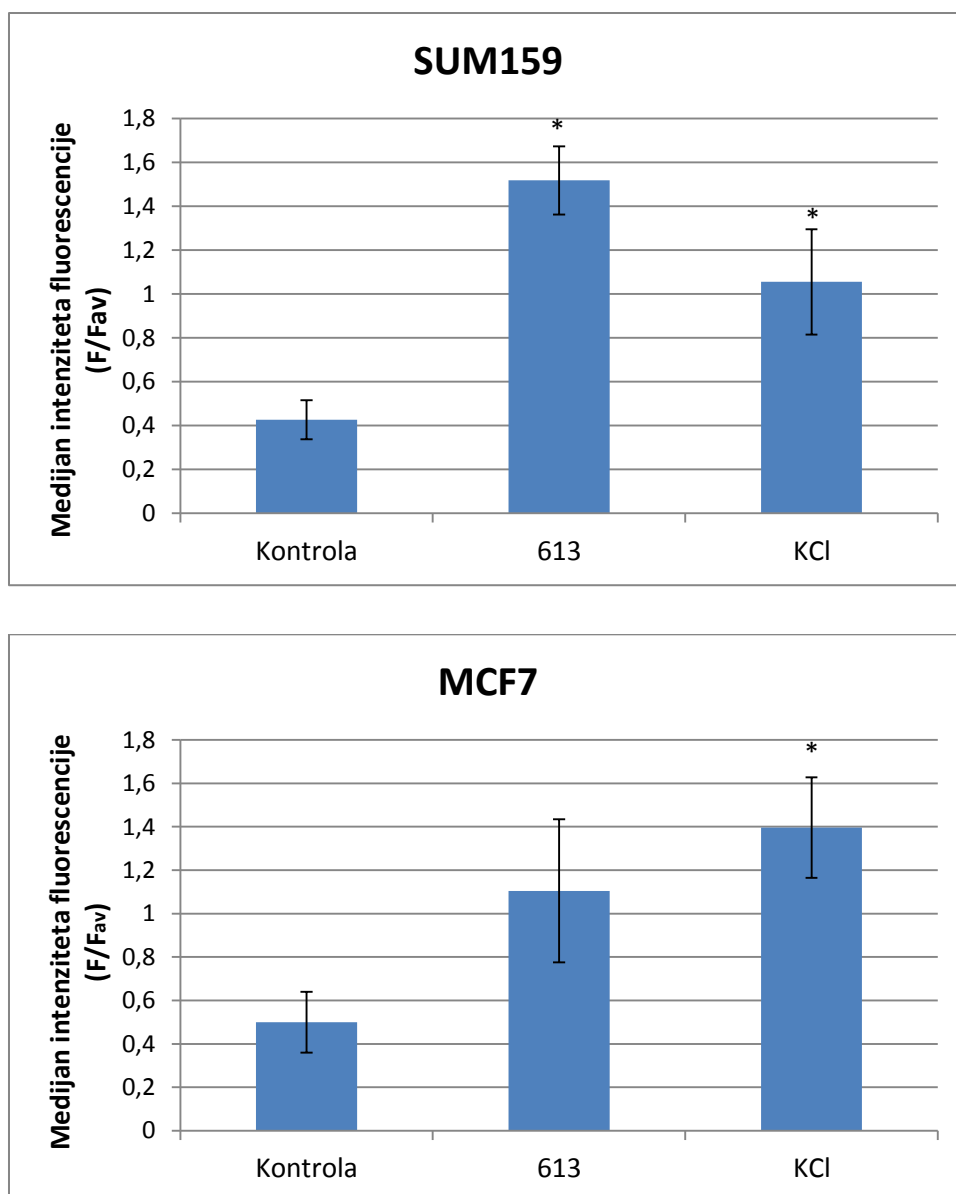
3.1. Modulacija membranskog potencijala stanica djelovanjem spoja 613

Kako bi se utvrdilo ima li spoj 613 utjecaj na membranski potencijal stanica, provedeni su eksperimenti na protočnom citometru uz pomoć anionske boje DiBAC₄(3). Na samom početku je uhodana metoda te je pritom korišten gramicidin za kojeg je poznato iz literature da depolarizira staničnu membranu (David i sur. 2013, Shapiro 2004). Učinak gramicidina se vidi na grafičkom prikazu gdje je uspoređen s kontrolnim uzorkom tretiranim DMSO-om (Slika 12). Značajne su razlike u membranskom potencijalu pokazane kod stanica HMLEpBp, MCF7 i SUM159, a najveći učinak na membranski potencijal gramicidin je imao kod stanične linije MCF7.



Slika 12. Djelovanje gramicidina na stanice. Stanice su tretirane 10 μ M gramicidinom te inkubirane s bojom DiBAC₄(3) nakon čega su analizirane na protočnom citometru. Kontrola predstavlja uzorke tretirane DMSO-om. Rezultati su izraženi kao medijan intenziteta fluorescencije pri čemu je intenzitet fluorescencije direktno proporcionalan depolarizaciji stanične membrane. Sumirani rezultati na slici su prikazani kao F/F_{av} , gdje je F fluorescencija pojedinog uzorka u pokusu i F_{av} srednja vrijednost fluorescencije svih uzoraka jednog pokusa, a predstavljaju srednju vrijednost tri zasebna eksperimenta $\pm$ standardna devijacija. Statistički značajne razlike su označene zvjezdicom. * $P < 0,05$.

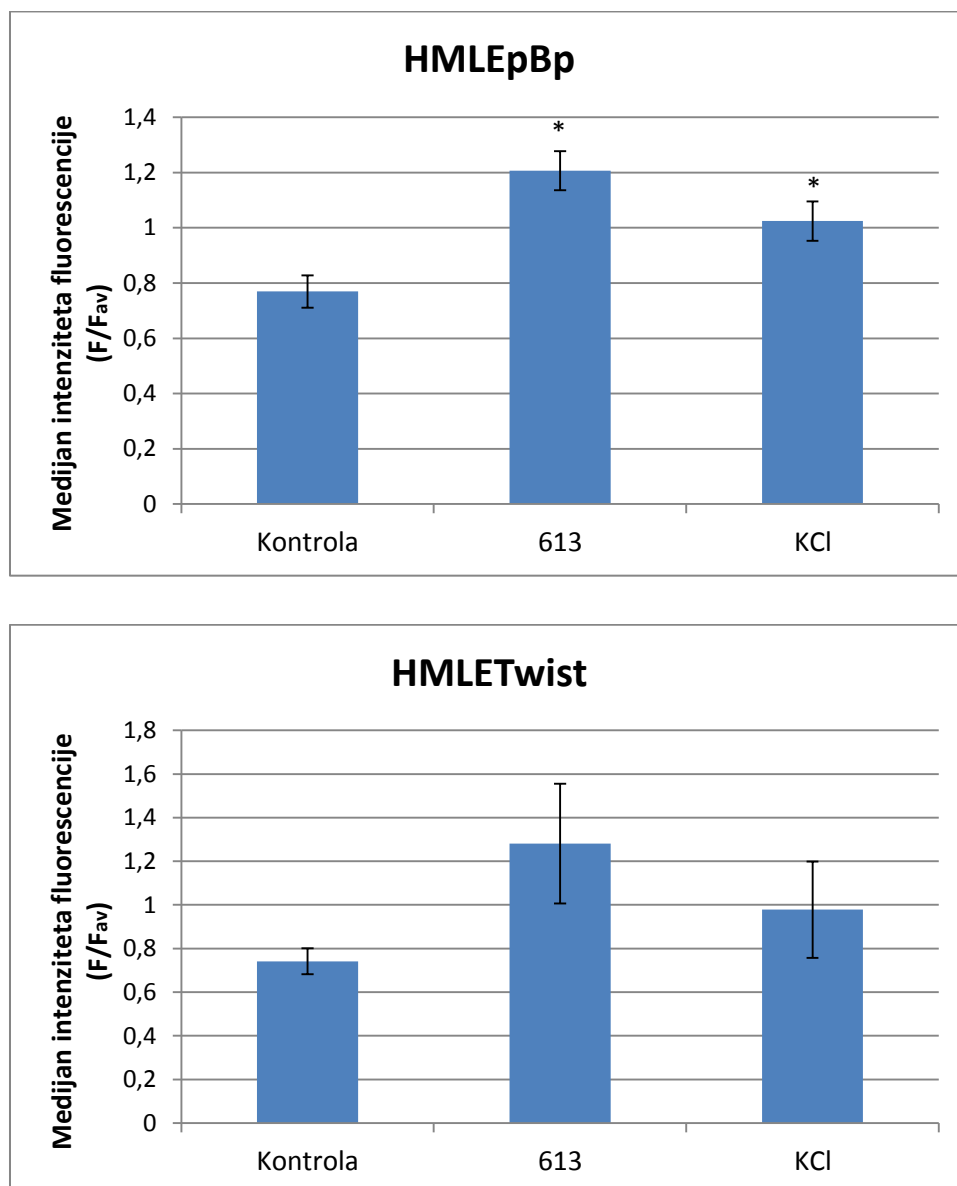
Nakon uhodavanja metode, analiziran je učinak spoja 613. U tu svrhu stanice su tretirane s 10 μ M koncentracijom spoja 613 koji se inkubirao 5 minuta. Nakon toga se dodalo 100 nM DiBAC₄(3) koji se isto inkubira 5 minuta, a zatim se stanice analiziraju na protočnom citometru. Osim tretmana spojem, stanicama se dodaje i DMSO koji služi kao netretirani kontrolni uzorak te 50 mM KCl kao pozitivna kontrola. Dodavanje KCl-a depolarizira staničnu membranu što nam omogućuje da usporedimo učinak spoja 613 na membranski potencijal.



Slika 13. Učinak spoja 613 na membranski potencijal stanica MCF7 i SUM159. Stanice su tretirane 10 μ M spojem 613 te inkubirane s bojom DiBAC₄(3) nakon čega su analizirane na protočnom citometru. KCl služi kao pozitivna kontrola. Rezultati su izraženi kao medijan intenziteta fluorescencije pri čemu je intenzitet fluorescencije direktno proporcionalan depolarizaciji stanične membrane. Sumirani rezultati na slici su prikazani kao F/F_{av} , gdje je F fluorescencija pojedinog uzorka u pokusu i F_{av} srednja vrijednost fluorescencije svih uzoraka jednog pokusa, a predstavljaju srednju vrijednost tri zasebna eksperimenta $\pm$ standardna devijacija. Statistički značajne razlike su označene zvjezdicom. * $P < 0,05$.

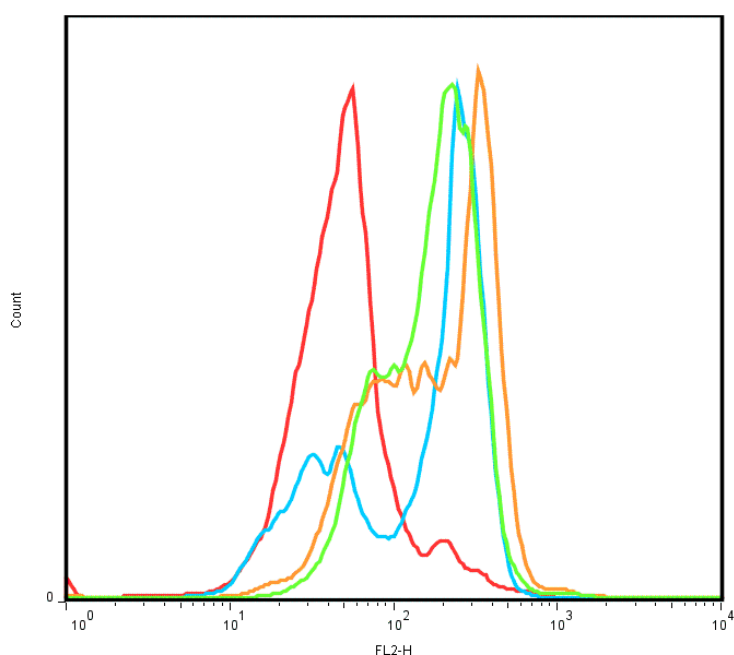
Budući da je intenzitet fluorescencije proporcionalan depolarizaciji stanične membrane, na Slici 13. se može primjetiti kako je 613 depolarizirao membranu stanica SUM159 u usporedbi s kontrolom, dapače ima jači učinak i od samog KCl-a. Kod stanica

MCF7 razlika nije statistički značajna osim kod tretmana s KCl-om. Na Slici 14. prikazano je djelovanje spoja 613 na stanične linije HMLETwist i HMLEpBp kod kojih također depolarizira membranu. Kod linije HMLEpBp razlika je statistički značajna, dok kod HMLETwist nije.



Slika 14. Učinak spoja 613 na membranski potencijal stanica HMLEpBp i HMLETwist. Stanice su tretirane 10 μ M spojem 613 te inkubirane s bojom DiBAC₄(3) nakon čega su analizirane na protočnom citometru. KCl služi kao pozitivna kontrola. Rezultati su izraženi kao medijan intenziteta fluorescencije pri čemu je intenzitet fluorescencije direktno proporcionalan depolarizaciji stanične membrane. Sumirani rezultati na slici su prikazani kao F/F_{av} , gdje je F fluorescencija pojedinog uzorka u pokusu i F_{av} srednja vrijednost fluorescencije svih uzoraka jednog pokusa, a predstavljaju srednju vrijednost tri zasebna eksperimenta $\pm$ standardna devijacija. Statistički značajne razlike su označene zvjezdicom. * $P < 0,05$.

Na Slici 15. se može vidjeti i reprezentativni histogram djelovanja spoja 613 na membranski potencijal stanica koji također upućuje na zaključak da spoj 613 depolarizira staničnu membranu (pomak u desno). FL2 je detektor fluorescentne boje DiBAC₄(3) čiji je intenzitet fluorescencije proporcionalan depolarizaciji stanične membrane. Stoga pomak u desno predstavlja povećanje intenziteta fluorescencije što znači da je u stanice ušlo više boje odnosno da su stanice depolarizirane. Dakle, spoj 613 djeluje na način kao i gramicidin te KCl, kod kojih dolazi do depolarizacije stanica.

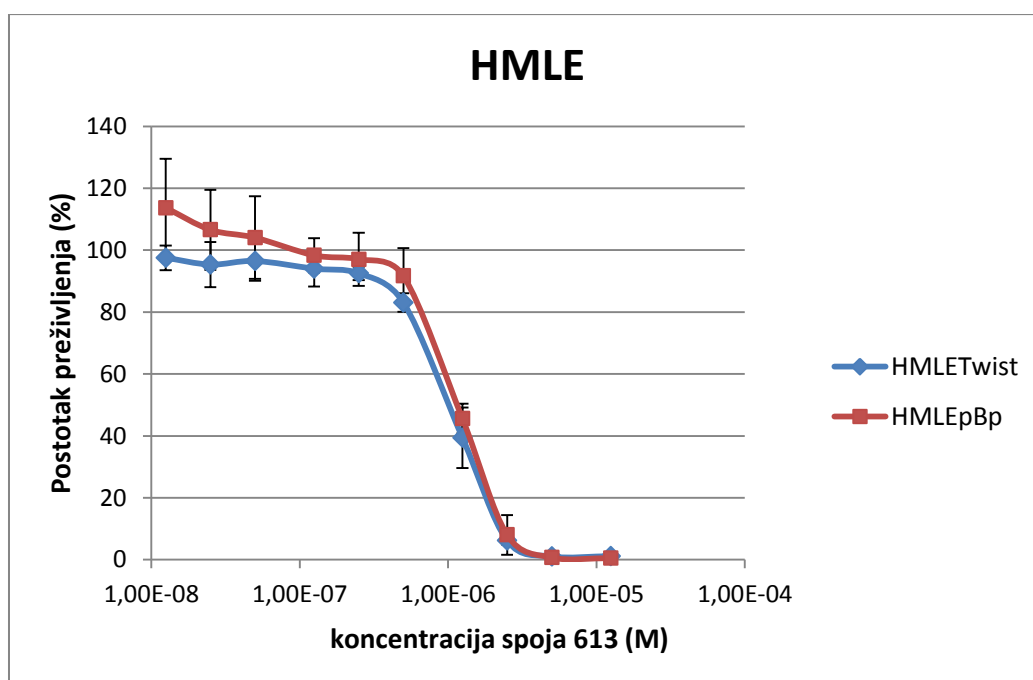


Slika 15. Histogram djelovanja spoja 613 na membranski potencijal stanica MCF7. Stanice su tretirane 10 μ M spojem 613 te inkubirane s bojom DiBAC₄(3) nakon čega su analizirane na protočnom citometru. Stanice su tretirane i 10 μ M gramicidinom te 50 mM KCl-om nakon čega su opet inkubirane s bojom DiBAC₄(3). Crveni histogram predstavlja kontrolni uzorak, zeleni uzorak s KCl-om, plavi uzorak s gramicidinom, a narančasti histogram se odnosi na uzorak tretiran spojem 613. Prikaz je dobiven analizom podataka u programu FlowJo.

3.2. Učinak spoja 613 na rast stanica

Budući da se spoj 613 pokazao kao citotoksičan za nekoliko tumorskih staničnih linija, određen je i uspoređen njegov antiproliferativni učinak na staničnim linijama dojke. Njegova citotoksičnost se provjerila testom MTT te se odredila vrijednost IC₅₀. IC₅₀ je polovica

maksimalne inhibitorne koncentracije, odnosno koncentracija potrebna za 50 % inhibicije. Predstavlja mjeru učinkovitosti određenog spoja u inhibiranju specifične biološke funkcije. U tu svrhu, stanice su se nasadile u mikrotitarske pločice s 96 jažica u različitim koncentracijama ovisno o staničnoj liniji. Koncentracije spojeva kojima su tretirane su u vrijednosti od $1,25 \cdot 10^{-8}$ M do $1,25 \cdot 10^{-5}$ M kako bi se što preciznije odredila koncentracija IC_{50} . Nakon 72 h stanice su podvrgnute testu MTT, a apsorbancije su očitane na čitaču mikrotitarskih pločica na 570 nm.



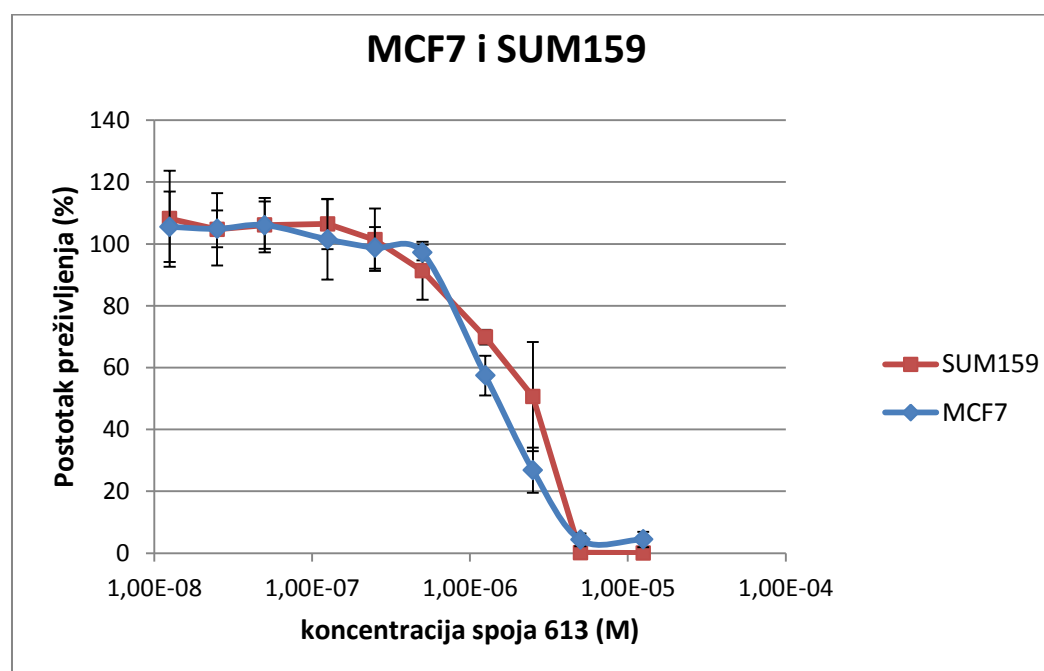
Slika 16. Krivulja preživljenja za stanične linije HMLEpBp i HMLETwist. Stanice su nasadene u mikrotitarske pločice sa 96 jažica u gustoći od 1000 stanica po jažici. Sljedeći dan su tretirane različitim koncentracijama spoja 613 u vrijednosti od $1,25 \cdot 10^{-8}$ M do $1,25 \cdot 10^{-5}$ M. Nakon 72 h su podvrgnute testu MTT. Rezultati su izraženi kao postotak preživljenja u odnosu na netretiranu kontrolu. Rezultati na grafu predstavljaju srednje vrijednosti tri zasebna eksperimenta napravljena u triplikatima $\pm$ standardne devijacije.

Na Slici 16. se može vidjeti kako obje stanične linije prate sličan trend preživljenja nakon tretmana različitim koncentracijama spoja 613. Antiproliferativni test MTT ukazuje na značajno smanjenje preživljenja stanica ovisno o koncentraciji 613 prilikom čega se može primjetiti da pri koncentraciji od $5 \cdot 10^{-7}$ M počinje inhibicija rasta. No, pri koncentraciji $1,25 \cdot 10^{-6}$ M postotak preživljenja je već manji od 50 % što upućuje na to da dolazi do naglog pada u preživljenju stanica u rasponu od te dvije koncentracije. Vrijednost IC_{50} je izračunata

iz krivulje preživljenja korištenjem linearne regresije (Tablica 5). Za liniju HMLETwist iznosi $1,04 \cdot 10^{-6}$ M, dok je za HMLEpBp $1,2 \cdot 10^{-6}$ M. To upućuje na zaključak da su HMLETwist stanice ipak malo osjetljivije od HMLEpBp. Kod staničnih linija MCF7 i SUM159 također dolazi do smanjenja proliferacije stanica u ovisnosti o koncentraciji spoja te se na Slici 17. vidi da je stanična linija MCF7 malo osjetljivija od SUM159.

Tablica 5. Vrijednosti IC_{50} za ispitivane stanične linije

Stanična linija	IC_{50} (μ M)
HMLETwist	1,04
HMLEpBp	1,2
MCF7	1,9
SUM159	2,5

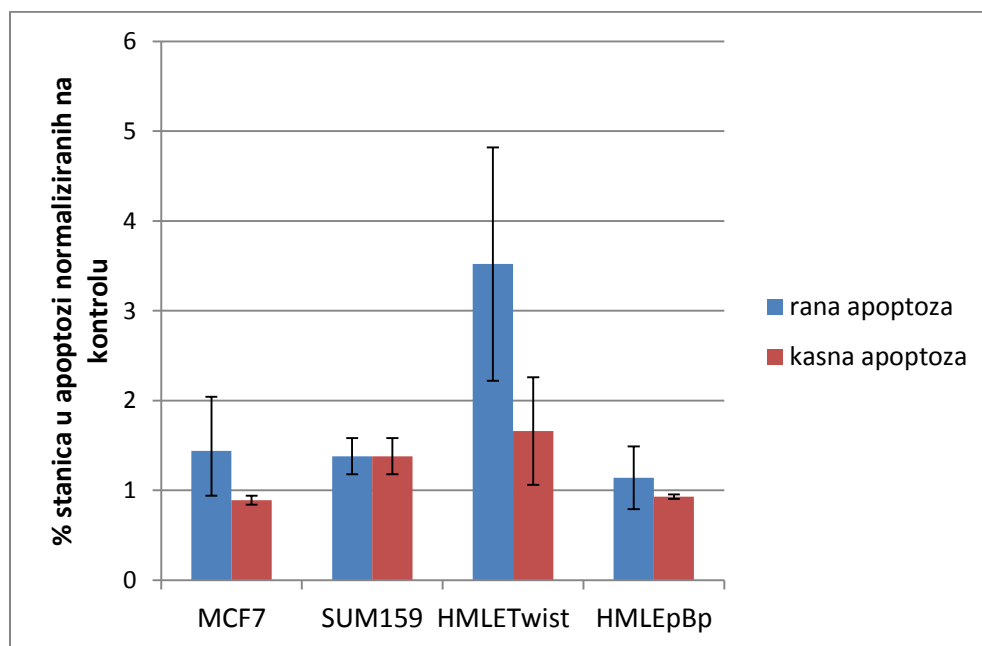


Slika 17. Krivulja preživljenja za stanične linije MCF7 i SUM159. Stanice su nasadene u mikrotitarske pločice sa 96 jažica u gustoći od 3000 stanica po jažici za MCF7 odnosno 2000 stanica za SUM159. Sljedeći dan su tretirane različitim koncentracijama spoja 613 u vrijednosti od $1,25 \cdot 10^{-8}$ M do $1,25 \cdot 10^{-5}$ M. Nakon 72 h su podvrgnute testu MTT. Rezultati su izraženi kao postotak preživljenja u odnosu na netretiranu kontrolu. Rezultati na grafu predstavljaju srednje vrijednosti tri zasebna eksperimenta napravljena u triplicatima $\pm$ standardne devijacije.

3.3. Učinak spoja 613 na indukciju apoptoze

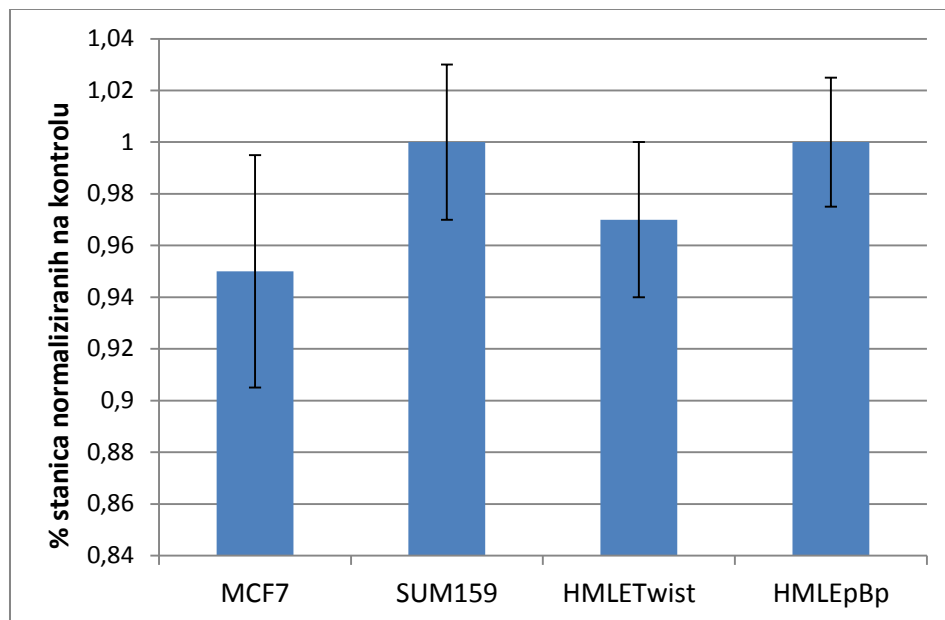
U sklopu istraživanja se želio odrediti točan način stanične smrti koju uzrokuje spoj 613, a da bi se utvrdilo je li u pitanju apoptoza, korišten je test Annexin V-FITC na protočnom citometru. Prvo su određene koncentracije te vremenska razdoblja u kojima bi se pratila apoptoza. Stoga se u početnim mjerenjima krenulo s 1 μ M koncentracijom spoja kroz 24 h i 48 h, no ubrzo je izbačena vremenska točka od 48 h jer je pritom spoj djelovao previše razarajuće za stanice. Za test Annexin V stanice su nasadene u pločice sa 6 jažica u gustoći od 100 000 stanica po jažici te je prilikom pripreme stanica za protočnu citometriju uzeto također 100 000 stanica.

1 μ M spoj 613 kroz 24 h imao je blagi učinak na stanice odnosno indukciju apoptoze prilikom čega je najveći učinak imao na staničnu liniju HMLETwist, što je prikazano na Slici 18. Kod te stanične linije dolazi do povećanja broja stanica u ranoj apoptozi.



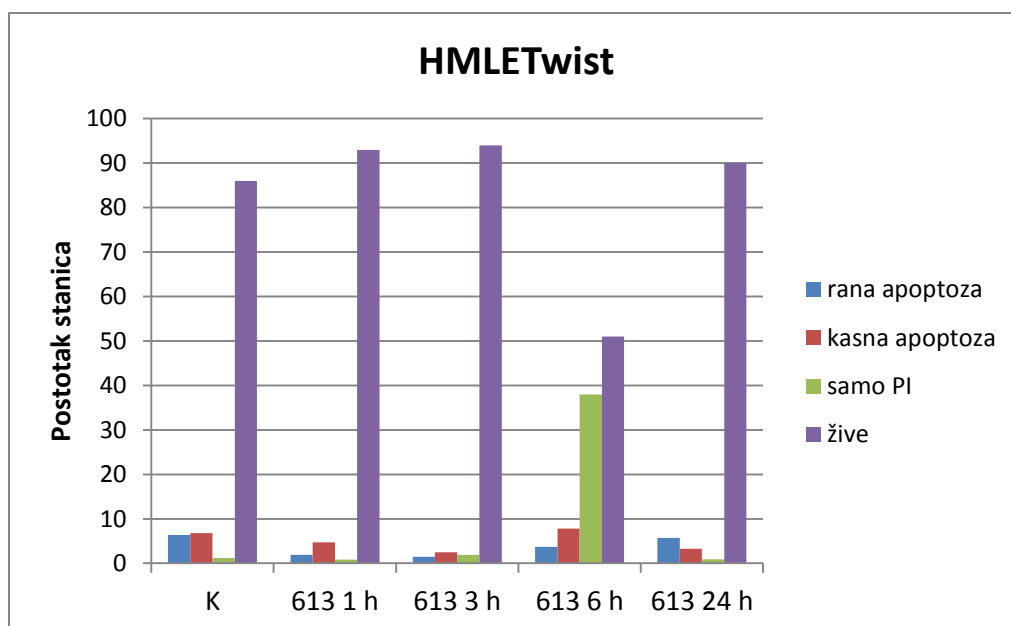
Slika 18. Stanice tretirane spojem 613 koncentracije 1 μ M u trajanju od 24 h. Na dan analize su obojane aneksinom i propidij jodidom te analizirane na protočnom citometru. Aneksin omogućuje detekciju stanica u ranoj apoptozi dok se pomoću propidij jodida detektiraju stanice u kasnoj apoptozi. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ standardne devijacije tri zasebna eksperimenta, a izraženi su kao normalizacija u odnosu na kontrolu.

U odnosu na postotak živih stanica vidi se da je spoj u koncentraciji 1 μM jako slabo djelovao na stanice: kod svih staničnih linija postotak živih stanica je skoro 100 % (Slika 19).



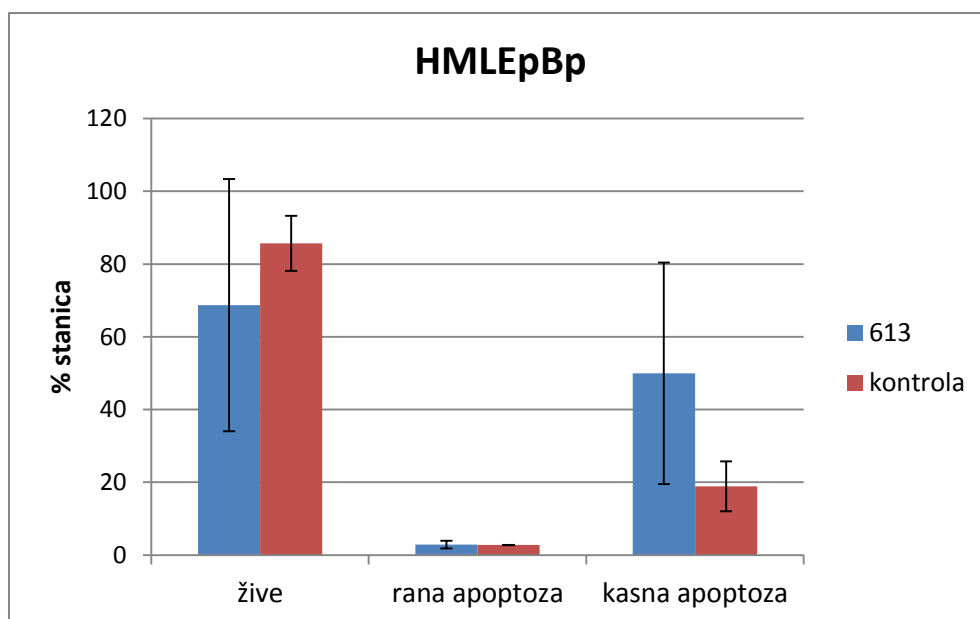
Slika 19. Postotak živih stanica nakon tretmana spojem 613 koncentracije 1 μM kroz 24 h. Žive stanice podrazumijevaju populaciju stanica koja nije obojana niti aneksinom niti propidij jodidom. Rezultati na grafičkom prikazu predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ standardne devijacije tri zasebna eksperimenta, a izraženi su kao normalizacija u odnosu na kontrolu.

Sljedeća koncentracija spoja koja je testirana bila je 2 μM u vremenskom razdoblju od 1 h, 3 h, 6 h i 24 h kako bi se pronašla odgovarajuća vremenska točka za daljnja mjerenja. Dobiveni rezultati prikazani na Slici 20. su pokazali da je spoj najveći učinak postigao za 6 h te je postotak živih stanica najniži u odnosu na druge vremenske točke kod kojih nije došlo do značajnijih promjena u usporedbi s kontrolom.

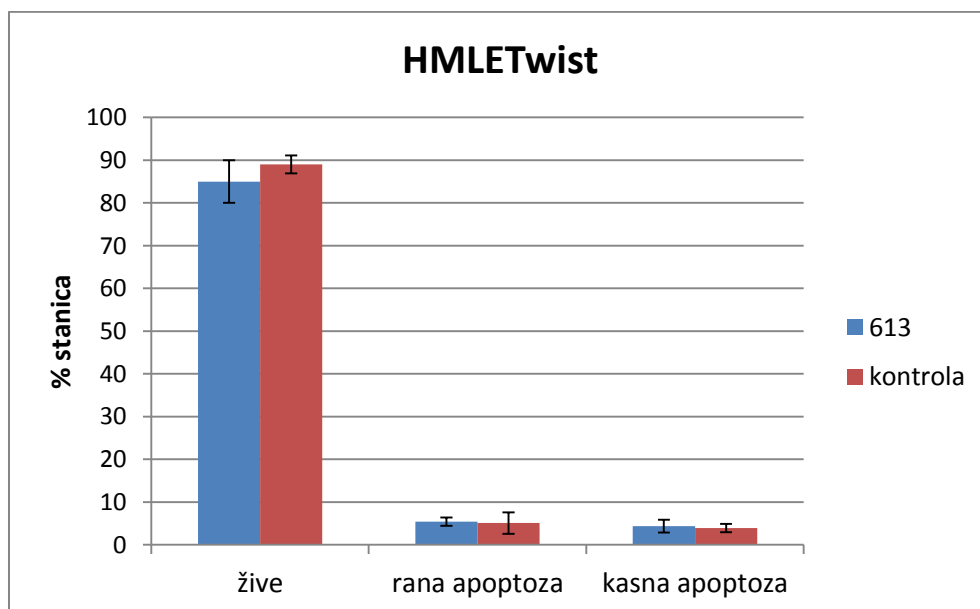


Slika 20. Određivanje vremenske točke u kojoj je citotoksični učinak spoja najveći. Stanice su tretirane spojem 613 koncentracije 2 μM u vremenskom razdoblju od 1 h, 3 h, 6 h i 24 h, obojane aneksinom i propidij jodidom te analizirane na protočnom citometru. Rezultati su izraženi kao postotak stanica. PI: propidij jodid, K: kontrola.

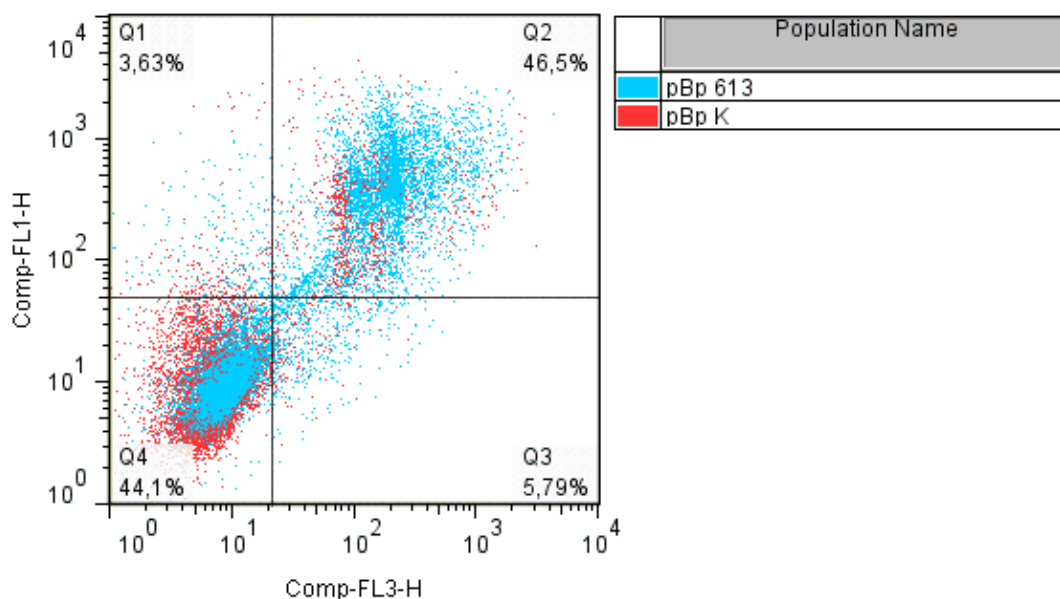
Budući da je izabrana vremenska točka od 6 h kao razdoblje u kojem je spoj pokazao svoje citotoksično djelovanje, sljedeći eksperimenti su provedeni s koncentracijom spoja 5 μM , a propidij jodid je zamijenjen fluorescentnom interkalirajućom bojom 7-AAD. Rezultati mjerenja provedenih na staničnim linijama HMLETwist i HMLEpBp su prikazani na slikama 21. i 22. na kojima se vidi da je učinak spoja veći na stanice HMLEpBp. Dakle, kod te stanične linije je veći postotak stanica koje su u kasnoj apoptozi u odnosu na kontrolni uzorak (Slika 23).



Slika 21. Indukcija apoptoze kod stanične linije HMLEpBp. Stanice su tretirane spojem 613 koncentracije 5 μM kroz 6 h, obojane aneksinom i 7-AAD te analizirane na protočnom citometru. Rezultati su obrađeni u programu FlowJo. Grafički prikaz predstavlja srednje vrijednosti $\pm$ standardne devijacije dva zasebna eksperimenta.

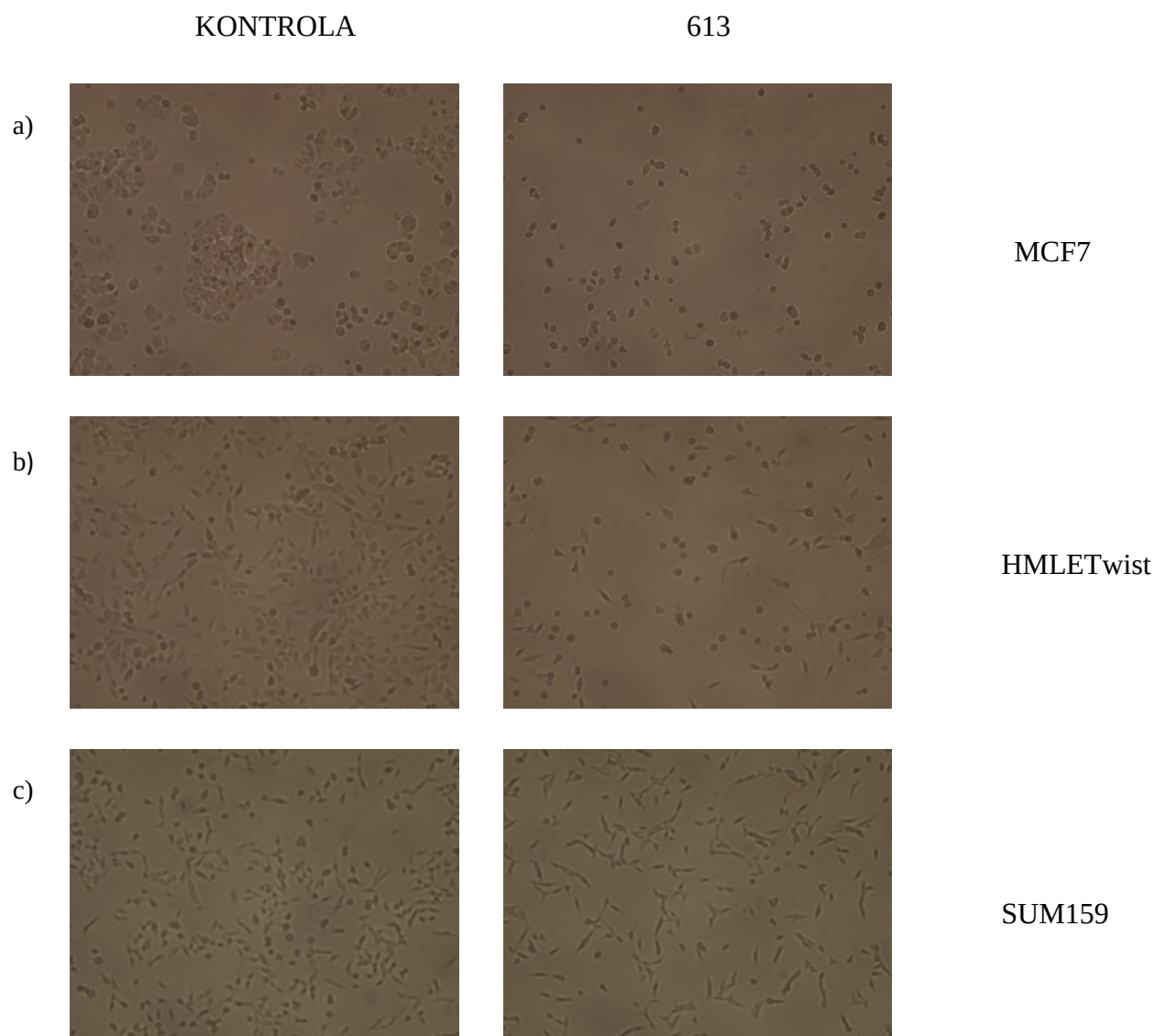


Slika 22. Indukcija apoptoze kod stanične linije HMLETwist. Stanice su tretirane spojem 613 koncentracije 5 μM kroz 6 h, obojane aneksinom i 7-AAD te analizirane na protočnom citometru. Rezultati su obrađeni u programu FlowJo. Grafički prikaz predstavlja srednje vrijednosti $\pm$ standardne devijacije dva zasebna eksperimenta.



Slika 23. Prikaz djelovanja spoja 613 na indukciju apoptoze kod stanične linije HMLEpBp u usporedbi s kontrolom. Stanice su tretirane spojem 613 koncentracije 5 μ M kroz 6 h, obojane aneksinom i 7-AAD i analizirane na protočnom citometru. Rezultati su obrađeni u programu FlowJo. Kvadrant Q4 predstavlja populaciju stanica koje nisu obojane ni aneksinom ni 7-AAD (žive stanice), Q1 predstavlja stanice obojane samo aneksinom (rana apoptoza), Q2 stanice obojane i aneksinom i 7-AAD (kasna apoptoza). U kvadrantu Q3 se nalaze stanice obojane samo 7-AAD.

Iz rezultata dobivenih testom Annexin V-FITC se teško može zaključiti da spoj 613 inducira apoptozu ispitivanih staničnih linija budući da je postotak živih stanica u tretiranim uzorcima poprilično visok. No, pod svjetlosnim mikroskopom, neposredno prije analize na protočnom citometru, primjećeno je kako stanice tretirane spojem ipak umiru, ali taj učinak nije bilo moguće uhvatiti na protočnom citometru. Najvjerojatnije objašnjenje za to je da se stanice pod utjecajem spoja rasprsnu prije samog procesa analize na protočnom citometru, a one koje preostanu predstavljaju ostatak stanica koji nije pogođen spojem te se stoga neće moći obojati ni aneksinom ni 7-AAD i neće se vidjeti citotoksični učinak spoja. Razlika koja je opažena pod svjetlosnim mikroskopom između kontrolnih i tretiranih stanica u jažicama se može vidjeti na Slici 24. Iz dobivenih rezultata proizlazi da točan način stanične smrti posredovane spojem 613 nije moguće odrediti na protočnom citometru. Naime, nakon uhođavanja mjerenja apoptoze/nekroze na protočnom citometru, bilo je planirano u mjerenja uvrstiti i specifične inhibitore apoptoze i nekroptoze, od čega se u ovoj fazi istraživanja odustalo.



Slika 24. Razlika između kontrolnih (lijevo) i tretiranih (desno) stanica u jažicama vidljiva pod svjetlosnim mikroskopom, pri povećanju 100x. Stanice su tretirane spojem 613 koncentracije 5 μ M kroz 6 h. Na slici a) je prikazana stanična linija MCF7, b) HMLETwist, c) SUM159.

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada je bio istražiti mehanizam djelovanja krunastog etera 613 na stanične linije tumora dojke i tumorske matične stanice dojke. Kako bi se dobio uvid utječe li spoj na membranski potencijal ispitivanih stanica, njegov učinak se mjerio pomoću anionske boje DiBAC₄(3). Za sve stanične linije je utvrđeno kako 613 modulira njihov membranski potencijal, odnosno depolarizira stanice. U usporedbi s pozitivnom kontrolom KCl, spoj je imao čak i jači učinak kod staničnih linija SUM159, HMLETwist i HMLEpBp. Veći je učinak na depolarizaciju imao kod SUM159 stanica koje sadrže veliki udio TMS što bi pak moglo upućivati na zaključak da su TMS osjetljivije odnosno podložnije promjenama membranskog potencijala. Budući da gramicidin također depolarizira stanice što je poznato iz literature, ali i potvrđeno ovim eksperimentima, pretpostavlja se da bi 613 mogao djelovati na sličan način kao i gramicidin. Naime, gramicidin mijenja permeabilnost stanične membrane nespecifično za razne katione te uzrokuje energetski stres koji u konačnici vodi do smrti tumorskih stanica (David i sur. 2013). S obzirom na strukturu, spoj 613 bi trebao imati afinitet specifičan za kalijeve te u nešto manjoj mjeri natrijeve ione. Naši rezultati ukazuju na to da spoj ipak jače utječe na permeabilnost stanice za Na⁺. Stanice već nakon 5 minuta inkubacije postaju pozitivnije, dakle Na⁺ koji se u izvanstaničnom okruženju nalazi u velikim koncentracijama (stanični medij ili HBSS) ulazi u stanice. Kad bi spoj imao veći afinitet za kalijeve ione, izbacivao bi K⁺ iz stanica, gdje se nalazi u većoj koncentraciji, u izvanstanično okruženje. U tom slučaju bi membranski potencijal stanica nakon tretmana postao negativniji, odnosno stanice bi se hiperpolarizirale.

Utvrđen je i antiproliferativni učinak spoja na ispitivane stanične linije, a rezultati su pokazali kako spoj djeluje inhibitorno na rast svih staničnih linija. HMLETwist stanice koje imaju pretjerano eksprimiran transkripcijski faktor Twist odgovoran za epitelno-mezenhimsku tranziciju, su malo osjetljivije na citotoksično djelovanje spoja u usporedbi s kontrolnim HMLEpBp stanicama. Međutim, pokazano je da su SUM159 malo otpornije od MCF7 što nije u skladu s literaturom prema kojoj su MCF7 stanice u usporedbi s drugim tumorskim staničnim linijama, otpornije na antiproliferativni učinak krunastih etera. Njihova rezistencija se objašnjava delecijom gena za kaspazu-3 koja ima ključnu ulogu u apoptozi (Marjanović i sur. 2007). Jedan od razloga zbog čega se MCF7 nisu pokazale otpornijima na 613 u odnosu na SUM159 može biti u tome da je u pokusima s tom staničnom linijom nasađeno manje

stanica po jažici nego što je potrebno, zbog čega su stanice bile osjetljivije na djelovanje spoja. Druga mogućnost je da su stanice pri pokusima bile inficirane.

Eksperimenti koji su provedeni sa svrhom određivanja načina stanične smrti koju 613 inducira, nisu uspješno utvrdili je li u pitanju apoptoza ili nekroza. Problem s kojim smo se suočili tijekom istraživanja je naime, neuspješan način detekcije mrtvih stanica testom Annexin V-FITC. Nakon tretmana spojem 613, pod svjetlosnim mikroskopom je uočeno kako stanice masovno umiru odnosno imaju promijenjenu morfologiju u usporedbi s kontrolnim stanicama što bi moglo upućivati na zaključak da su stanice krenule u staničnu smrt. No, na protočnom citometru nije bilo moguće uhvatiti taj učinak, a najvjerojatnije objašnjenje je da se tijekom procesa pripremanja stanica za protočnu citometriju, koji iziskuje nekoliko koraka centrifugiranja i pipetiranja, stanice rasprsnu. S obzirom da spoj direktno utječe na permeabilnost stanične membrane, to ne čudi. Naime, već pri samom promatranju stanica pod svjetlosnim mikroskopom mogli su se primjetiti sitni ostaci rasprsnutih stanica. Stoga mrtve stanice nije bilo moguće detektirati te je u tretmanima bio visok postotak živih stanica. Još jedna mogućnost je da spoj mijenja permeabilnost membrane i za boje kao što su propidij jodid ili 7-AAD, pa je moguće da je ulazak tih boja u stanice inhibiran.

Prema literaturi, krunasti eteri su pokazali svoje antitumorsko djelovanje te inducirali apoptozu tumorskih staničnih linija (Marjanović i sur. 2007), no rezultati našeg istraživanja nisu u skladu s literaturom. Indukcija apoptoze nije uobičajen stanični odgovor nakon poremećaja homeostaze za ione i depolarizacije stanice, a jedan od razloga leži i u tome što se aktivira Na^+/K^+ ATP-aza koja masovno troši ATP potreban za apoptozu, stoga je ova istraživanja potrebno nastaviti.

Budući da su se stanične linije s većim udjelom TMS pokazale nešto osjetljivije na djelovanje spoja, to je u skladu s istraživanjima koja su pokazala kako ionofor salinomycin selektivno ubija TMS dojke (Gupta i sur. 2009). No, razlike koje smo izmjerili su premale da bismo mogli zaključiti kako su TMS zaista osjetljivije na modulaciju membranskog potencijala. Za salinomycin je poznato kako ima afinitet za alkalijske ione, naročito K^+ omogućujući na taj način izbacivanje K^+ iz citoplazme i mitohondrija čime inhibira oksidativnu fosforilaciju i dovodi do potrošnje staničnog ATP-a kod stanične linije HMLETwist (Managò i sur. 2015).

Naša istraživanja dovode do zaključka da spoj 613 djeluje kao jači ionofor za natrijeve ione jer je ukupan učinak na ione takav da dolazi do snažne depolarizacije stanice.

Pretpostavka je da 613 u većoj mjeri ubacuje ione natrija, a u manjoj izbacuje ione kalija iz stanice čime narušava membranski potencijal. Elektrofiziološka mjerenja protoka iona posredstvom spoja 613 koja su u tijeku, također ukazuju da spoj mijenja permeabilnost stanične membrane za ione natrija (Ester i sur. neobjavljeni rezultati). Daljnja pretpostavka je da narušeni membranski potencijal aktivira Na^+/K^+ ATP-azu koja izbacuje Na^+ , a ubacuje K^+ prilikom čega troši tj. hidrolizira velike količine ATP-a. Potrošene zalihe stanične energije bi mogle voditi stanicu u nekrozu ili čak nekroptozu, uzevši u obzir da za takvu staničnu smrt nije potreban ATP u usporedbi s apoptozom koja je ovisna o unutarstaničnom ATP-u (Tsujimoto 1997). Istraživanja su pokazala kako 613 depolarizira i mitohondrijski potencijal (Ester i sur. neobjavljeni rezultati), što bi moglo interferirati s oksidativnom fosforilacijom i blokirati proizvodnju ATP-a. To sve skupa može dovesti do potrošnje staničnog ATP-a pa stanica ostaje bez svojih energetske zaliha i na kraju umire. Iako se nekroza smatra negativnom jer izaziva imunološki odgovor odnosno upalu čime oštećuje i okolna tkiva, na taj način može privući i leukocite domaćina čime se zapravo povećava antitumorski odgovor imunološkog sustava (David i sur. 2013).

Dobiveni rezultati su pokazali kako 613 ima inhibitorni učinak na rast staničnih linija raka dojke i TMS dojke te da modulira njihov membranski potencijal. No, još uvijek ne možemo sa sigurnošću tvrditi koji tip stanične smrti inducira, iako je nekroza najizglednija. Trenutačno su u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju u tijeku istraživanja djelovanja spoja 613 na potrošnju ATP-a, te daljnja istraživanja stanične smrti. Naime, rezultati dobiveni testom Annexin V-FITC su oprečni te je nužno dodatno mijenjati uvjete eksperimenta, ali i razmotriti opciju da u pitanju može biti i programirana nekroza odnosno nekroptoza. To bi se moglo provjeriti daljnjim testovima kao što je antiproliferativni test u kombinaciji s inhibitorom nekroptoze - nekrostatinom-1 te inhibitorom apoptoze, Z-VAD-FMK.

Usporedbom učinka na sve stanične linije nije utvrđena direktna korelacija djelovanja na membranski potencijal i antiproliferativnog učinka. To je zato jer se radi o malim razlikama među linijama, naime spoj je podjednako aktivan na svim testiranim linijama i što se tiče depolarizacije, i što se tiče inhibicije rasta.

Na kraju, narušavanje staničnog i mitohondrijskog membranskog potencijala te posljedično metabolizma stanice izgleda kao obećavajuća strategija za razvoj novih antitumorskih terapija, a rezultati dobiveni u skopu ovog diplomskog rada ukazuju da bi 613 mogao biti učinkovit u terapiji tumorskih matičnih stanica dojke koje su se također pokazale

osjetljivima na njegov učinak. Stoga je nužan nastavak istraživanja mehanizma djelovanja krunastog etera 613 *in vitro* i *in vivo*.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitivan je mehanizam djelovanja krunastog etera 613 na različite stanične linije dojke (MCF7, SUM159, HMLETwist i HMLEpBp), a iz rezultata koji su dobiveni, može se izvući nekoliko najvažnijih zaključaka:

- Spoj 613 može modulirati membranski potencijal staničnih linija dojke.
- Spoj 613 izaziva snažnu depolarizaciju membrane stanica svih ispitivanih linija.
- Kod tumorske stanične linije SUM159, koja ima povećani udio TMS unutar populacije učinak je spoja na modulaciju membranskog potencijala nešto jači nego kod tumorske stanične linije MCF7.
- Spoj 613 ima jak antiproliferativni učinak na sve stanične linije.
- Dobivene IC_{50} vrijednosti ukazuju na to da je stanična linija HMLETwist nešto osjetljivija od kontrolnih HMLEpBp stanica te najosjetljivija od svih ispitivanih linija na citotoksično djelovanje spoja 613.
- Stanice SUM159 su nešto malo otpornije od MCF7 na citotoksično djelovanje spoja 613.
- Metoda za određivanje modaliteta stanične smrti testom Annexin V-FITC na protočnom citometru nije prikladna za određivanje učinka spoja 613.
- Usporedbom učinka na sve stanične linije nije utvrđena direktna korelacija djelovanja na membranski potencijal i antiproliferativnog učinka.
- Istraživanja mehanizma djelovanja krunastog etera 613 se trebaju nastaviti s obzirom da dobiveni rezultati upućuju na zaključak da bi spoj mogao biti učinkovit u potencijalnoj terapiji tumorskih i tumorskih matičnih stanica dojke.

6. LITERATURA

Adams J., Cory S. (2007): The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26: 1324–1337.

Batinić D., Rnjak L., Dubravčić K. (2006): Protočna citometrija u hematologiji. *Paediatrica Croatica* 50(Suppl 1): 176-182.

BD Biosciences. (2007): BD FACSCalibur Instructions For Use. User's Guide.

BD Biosciences. (2002): Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, Manual part number: 11-11032-03.

Bortner C. D., Cidlowski J. A. (2014): Ion channels and apoptosis in cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 369.

Bozorgi A., Khazaei M., Khazaei M. R. (2015): New findings on breast cancer stem cells: A review. *Journal of Breast Cancer* 18: 303–312.

Chen D., Yu J., Zhang L. (2016): Necroptosis: An alternative cell death program defending against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1865: 228–236.

David J. M., Owens T. A., Barwe S. P., Rajasekaran A. K. (2013): Gramicidin A induces metabolic dysfunction and energy depletion leading to cell death in renal cell carcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 12: 2296–2307.

Elenbaas B., Spirio L., Koerner F. (2001): Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes & Development* 15: 50–65.

Elmore S. (2007): Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35: 495–516.

Franco R., Bortner C. D., Cidlowski J. A. (2006): Potential roles of electrogenic ion transport and plasma membrane depolarization in apoptosis. *The Journal of Membrane Biology* 209: 43–58.

Fulda S., Debatin K. M. (2006): Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25: 4798–4811.

Galluzzi L., Bravo-San Pedro J. M., Vitale I., i sur. (2015): Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation* 22: 58–73.

Galluzzi L., Vitale I., Abrams J. M., i sur. (2012): Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* 19: 107–120.

- Gupta P. B., Onder T. T., Jiang G., i sur. (2009): Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening. *Cell* 138: 645–659.
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2011): Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646–674.
- Hille B. (1984): *Ionic Channel of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA; 1st Edition
- Kralj M., Tušek-Božić L., Frkanec L. (2008): Biomedical potentials of crown ethers: Prospective antitumor agents. *ChemMedChem* 3: 1478–1492.
- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., i sur. (2009): Classification of Cell Death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* 16: 3–11.
- Kunzelmann K. (2016): Ion channels in regulated cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 2387–2403.
- Lamkanfi M., Dixit V. M. (2010): Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host and Microbe* 8: 44–54.
- Lehninger A. L., Nelson D. L. 1., Cox M. M. (2013): *Lehninger principles of biochemistry*. W.H. Freeman, New York; 6th Edition
- Levin M. (2014): Molecular bioelectricity: how endogenous voltage potentials control cell behavior and instruct pattern regulation in vivo. *Molecular Biology of the Cell* 25: 3835–3850.
- Managò A., Leanza L., Carraretto L., i sur. (2015): Early effects of the antineoplastic agent salinomycin on mitochondrial function. *Cell Death and Disease* 6: e1930.
- Mani S. A., Guo W., Liao M. J., i sur. (2008): The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* 133: 704–715.
- Marjanović M., Kralj M., Supek F., i sur. (2007): Antitumor potential of crown ethers: Structure-activity relationships, cell cycle disturbances, and cell death studies of a series of ionophores. *Journal of Medicinal Chemistry* 50: 1007–1018.
- Mlinarić-Majerski K., Vujasinović I. (2007): Adamantan, ugradbena jedinica u makrocikličkim sustavima. *Kemija u industriji* 56: 145–150.
- O'Connor M. L., Xiang D., Shigdar S., i sur. (2014): Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward. *Cancer Letters* 344: 180–187.
- Okada H., Mak T. W. (2004): Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer* 4: 592–603.

Pardo L. A., Stühmer W. (2014): The roles of K⁺ channels in cancer. *Nature Reviews Cancer* 14: 39–48.

Pecorino L. (2012): *Molecular Biology of Cancer: Mechanism, Targets and Therapeutics*. Oxford University Press, Oxford, UK; 3rd Edition

Shapiro H. M. (2004): Estimation of membrane potential by flow cytometry. *Current Protocols in Cytometry*, Chapter 9, Unit 9.6.

Supek F., Ramljak T. Š., Marjanović M., i sur. (2011). Could LogP be a principal determinant of biological activity in 18-crown-6 ethers? Synthesis of biologically active adamantane-substituted diaza-crowns. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46: 3444–3454.

Tsujimoto Y. (1997): Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death and Differentiation* 4: 429–434.

Wright S. H. (2004): Generation of resting membrane potential. *Advances in Physiology Education* 28: 139–142.

Yang M., Brackenbury W. J. (2013): Membrane potential and cancer progression. *Frontiers in Physiology* 4: 1–10.

Internetski izvor:

www.icagen.com, pristupljeno 15.12.2017.

7. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime

Jelena Gabrilo

Radno iskustvo

Ožujak 2017 – Studeni 2017 Studentski posao u Parku prirode Medvednica

Obrazovanje

- | | |
|-------------|---|
| 2015 – 2018 | Diplomski studij Molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu |
| 2012 – 2015 | Preddiplomski studij Molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu |
| 2008 – 2012 | IV Gimnazija Marko Marulić, opća gimnazija, Split |

Iskustvo

- | | |
|----------------------------|---|
| Ožujak 2016 – Srpanj 2016 | Laboratorijska stručna praksa, Laboratorij za nasljedni rak, Institut Ruđer Bošković |
| Veljača 2015 – Lipanj 2015 | Laboratorijska stručna praksa, Zavod za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet |

Ostalo

10th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, Dubrovnik, 2017

Osobne vještine

Jezici: hrvatski (materinski), engleski (C1)

Rad u operativnom sustavu MS Windows