

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU, SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU,
INSTITUT RUĐER BOŠKOVIĆ
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Marijana Jukić

Protutumorski učinci novih *N*-9-sulfonilpurinskih derivata *in vitro*

Doktorska disertacija

Osijek, 2017.

Doktorska disertacija izrađena je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku pod vodstvom prof. dr. sc. Ljubice Glavaš-Obrovac, u sklopu Sveučilišnog interdisciplinarnog doktorskog studija Molekularne bioznanosti pri Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorski rad

Institut Ruđer Bošković

Sveučilište u Dubrovniku

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti

Znanstvena polja: Biologija i Temeljne medicinske znanosti

PROTUTUMORSKI UČINCI NOVIH *N*-9-SULFONILPURINSKIH DERIVATA *IN VITRO*

Marijana Jukić

Rad je izrađen u: Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

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

Kratki sažetak:

Novosintetizirani *N*-9-sulfonilpurinski derivati pokazali su antiproliferativno djelovanje na humanim tumorskim stanicama. Snažnije djelovanje derivata pokazalo se prema leukemijskim stanicama i stanicama limfoma u odnosu na stanice karcinoma i na normalne stanice. Zabilježena je veća otpornost stanica na testirane spojeve uzgojene u 3D kulturi u odnosu na stanice koje su rasle u 2D kulturi. Na temelju rezultata učinaka ispitivanih spojeva na 2D i 3D kulturu stanica dobivenih MTT testom i LDH testom za daljnje su istraživanje izdvojeni SPD1 i SPD12. Odabrani derivati svoj potencijal djelovanja ostvaruju aktivacijom apoptoze popraćene narušenim mitohondrijskim potencijalom i povišenim nakupljanjem ROS.

Broj stranica: 121

Broj slika: 44

Broj tablica: 4

Broj literaturnih navoda: 138

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: sulfonilpurinski derivati, tumorske stanice, 3D kultura, stanični ciklus, apoptoza

Datum obrane: 9. lipnja 2017

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **prof. dr. sc. Jerko Barbić**, redoviti profesor (predsjednik)
2. **prof. dr. sc. Biserka Žinić**, redovita profesorica (član)
3. **doc. dr. sc. Saška Marczi**, docentica (član)
4. **doc.dr.sc. Barbara Viljetić**, docentica (zamjenski član)

Rad je pohranjen u: Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

PhD thesis

Ruđer Bošković Institute

University of Dubrovnik

University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular biosciences

Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science

Scientific Fields: Biology and Basic medical science

ANTITUMOR EFFECT OF *N*-9-SULFONYLPURINE DERIVATIVES *IN VITRO*

Marijana Jukić

Thesis performed at Faculty of Medicine Osijek, University J. J. Strossmayer in Osijek

Supervisor: Ljubica Glavaš-Obrovac, PhD, tenured professor

Short abstract:

Newly synthesized *N*-9-sulfonyl-purine derivatives show antiproliferative activity on tested human tumor cells. Stronger activity of derivatives is noticed against leukemia and lymphoma cells compared to carcinoma and normal cells. 3D cultured cells show higher resistance to the tested compounds when compared to 2D cell culture. Based on the results of effects of tested compounds on 2D and 3D cell cultures using MTT assay and LDH assay, SPD1 and SPD12 were selected for further study. Mechanism of action of selected derivatives is accomplished through activation of apoptosis accompanied with impaired mitochondrial potential and increased ROS accumulation.

Number of pages: 121

Number of figures: 44

Number of tables: 4

Number of references: 138

Original in: Croatian

Key words: sulfonyl-purine derivatives, tumor cells, 3D culture, cell cycle, apoptosis

Date of the thesis defense: June 9th, 2017

Reviewers:

1. **Jerko Barbić, MD, PhD**, full profesor (committee president)
2. **Biserka Žinić, PhD**, full professor
3. **Saška Marczi, PhD**, assistant professor
4. **Barbara Viljetić, PhD**, assistant professor (alternative member)

Thesis deposited in: City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Zahvale

Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac na pruženoj prilici i stručnom vodstvu tijekom izrade doktorske disertacije. Zahvaljujem na uloženom trudu i vremenu, te stručnim i mudrim savjetima kojima sam bila vođena kroz svoj znanstveni razvoj.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Biserki Žinić i njezinim suradnicima na dobroj suradnji i osiguravanju uzoraka za testiranje.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Katarini Mišković Špoljarić na trudu i pruženom početnom znanju o laboratorijskom radu i otvorenosti za savjetovanje.

Veliko hvala dr. sc. Teuti Bernardi-Opačak na nesebičnoj pomoći i korisnim savjetima s kojom je uvijek bilo zadovoljstvo raditi, te na pruženoj tehničkoj podršci.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Barbari Viljetić na korisnim savjetima i praktičnoj pomoći oko mojih nedoumica.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Stani Tokić na konstruktivnim prijedlozima, idejama i savjetima te angažmanu za uspostavljanje i provođenje novih metoda.

Zahvaljujem laborantici Jasni Leović na iskazanoj potpori i pomoći prilikom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem laborantici Ivani Jelavić i tehničarki Aleti Bukvić na otvorenosti za pomoć.

Hvala svim članovima Katedre za fiziologiju i imunologiju te svim članovima Katedre za medicinsku biologiju i genetiku na ustupku korištenja potrebne laboratorijske opreme.

Najveću zahvalnost upućujem svojim prekrasnim roditeljima na pruženoj bezuvjetnoj ljubavi i podršci. Posebnu zahvalu dugujem sestri Dragani na pruženoj motivaciji i ohrabrenju tijekom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem svojim prijateljicama na brizi i potpori tijekom izrade doktorske disertacije.

SADRŽAJ

1.UVOD.....	1
1.1. Tumorska oboljenja.....	3
1.1.1. Tumorigene mutacije	3
1.1.2. Progresija tumora.....	4
1.1.3. 3D kultura stanica	5
1.2. Derivati nukleobaza i nukleozida kao antimetaboliti.....	7
1.2.1. Analozi purinskih nukleozida.....	8
1.3. Apoptoza	10
1.3.1. Kaspaza ovisan put.....	10
1.3.1.1. Vanjski put.....	10
1.3.1.2. Unutarnji/mitohondrijski put.....	11
1.3.1.3. Apoptoza inducirana preko endoplazmatskog retikuluma.....	12
1.3.2. Kaspaza neovisan put.....	13
1.4. Stanični ciklus	14
1.5. PI3K/Akt/mTOR put.....	15
1.6. Hipoksijom inducirani faktori	18
1.6.1. Aktivacija ugljične anhidraze CA IX	18
1.7. MiRNA.....	22
1.7.1. MiR-21	23
1.7.2. MiR-34	24
1.7.3. MiR-210.....	24
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	25
3.HIPOTEZA	27
4. MATERIJALI I METODE	29
4.1. Korištene kemikalije	30
4.2. Ispitivani spojevi.....	31
4.3. Stanične linije	33
4.4. Uzgoj i održavanje kulture stanica <i>in vitro</i>	34
4.5.3D kultura stanica	34
4.6.Procjena učinka spojeva na staničnu proliferaciju MTT testom.....	35
4.7.Laktat dehidrogenaza (LDH) test.....	36

4.8. Stanični ciklus	37
4.9. Apoptoza	38
4.10. Određivanje katalitičke aktivnosti kaspaze 3.....	38
4.11. Određivanje promjena mitohondrijskog potencijala.....	39
4.12. Određivanje unutarstaničnih slobodnih kisikovih radikala (ROS).....	40
4.13. Određivanje katalitičke aktivnosti CA IX	40
4.14. Kvantifikacija ekspresije gena u stvarnom vremenu	41
4.15. Ekspresija mikroRNA	42
4.16. Western blot analiza proteina	43
4.16.1. Izolacija proteina	43
4.16.2. Natrij dodecil sulfat poliakrilamidna elektroforeza (SDS-PAGE).....	44
4.16.3. Prijenos proteina na membranu	44
4.16.4. Prikaz proteina na membrani.....	44
4.16.5. Kvantifikacija količine proteina na membrani	45
4.17. Statistička obrada podataka.....	45
5. REZULTATI.....	46
5.1. Utjecaj <i>N</i> -9-sulfonilpurinskih derivata na proliferaciju stanica	47
5.2. Uspostavljanje 3D kulture stanica.....	50
5.3. Usporedba utjecaja <i>N</i> -9-sulfonilpurinskih derivata na stanice uzgojene u 2D i 3D kulturi stanica.....	53
5.4. Osjetljivost stanica na ispitivane spojeve ovisno o postotku seruma u mediju .	58
5.5. Procjena citotoksičnog učinka SPD1 i SPD12 mjerenjem otpuštenog LDH u mediju.....	60
5.6. Utjecaj SPD1 i SPD12 na stanični ciklus.....	62
5.7. Određivanje apoptoza.....	65
5.8. Određivanje katalitičke aktivnosti kaspaze 3.....	69
5.9. Određivanje promjene u mitohondrijskom potencijalu	71
5.10. Određivanje unutarstaničnog stresa	74
5.11. Određivanje katalitičke aktivnosti ugljične anhidraze CA IX.....	76
5.12. Kvantifikacija ekspresije gena RT-PCR metodom.....	77
5.13. Ekspresija miRNA u HeLa i K562 staničnim linijama	78
5.14. Identifikacija proteina	80

6.RASPRAVA.....	85
7.ZAKLJUČAK.....	96
8.SAŽETAK.....	98
9.SUMMARY.....	100
10.LITERATURA.....	102
11.ŽIVOTOPIS	117

POPIS KRATICA:

Kratika:	Puni naziv na engleskom	Puni naziv na hrvatskom
2-CdA	<i>cladribine</i>	kladribin, 2-klorodeoksiadenozin
AE	<i>anion exchanger</i>	anionski izmjenjivač
AGO2	<i>Argonate 2 protein</i>	Argonat 2 protein
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>	inducirajući faktor apoptoze
Akt	<i>serin/threonin kinase</i>	<i>serin/treonin kinaza</i>
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>	aktivirajući faktor-1 apoptozne proteaze
ATF4	<i>transcription factor gene 4</i>	transkripcijski faktor gena 4
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>	adenozin trifosfat
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2 protein</i>	B-stanični limfom 2 protein
BCL-xL	<i>BCL extralarge</i>	
BJ	<i>human fibroblasts</i>	humani fibroblasti
CA	<i>catalytic domain</i>	katalitička domena
CA IX	<i>carbonic anhydrase IX</i>	uglična anhidraza IX
CaCo-2	<i>colon carcinoma</i>	karcinom debelog crijeva
CCR-CEM	<i>acute lymphoblastic leukemia</i>	akutna limfoblastična leukemija
Cdk	<i>cyclin-dependent protein kinase</i>	ciklin ovisna kinaza
CIP/KIP	<i>Cdk interacting protein/kinase inhibitory protein</i>	Cdk interakcijski protein/kinaza inhibirajući protein
CKI	<i>Cdk inhibitory protein</i>	Cdk inhibitori
DD	<i>death domain</i>	domena smrti
DISC	<i>Death-Inducing-Signalling-Complex</i>	smrt inducirajući signalni kompleks
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>	Dulbecco modificirani Eagleov medij
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>	dimetil sulfoksid
DNK	<i>deoxyribonucleic acid</i>	deoksiribonukleinska kiselina
DR4	<i>death receptor 4</i>	receptor smrti 4
DR5	<i>death receptor 5</i>	receptor smrti 5
ds-DNK	<i>double stranded DNA</i>	dvostruko zavijena DNK
ER	<i>endoplasmic reticulum</i>	endoplazmatski retikulum

FADD	<i>Fas-associated death domain</i>	Fas protein povezan s domenom smrti
FBS	<i>fetal bovine serum</i>	fetalni goveđi serum
GW182	<i>Glycine (g) – tryptophan (w) repeat - containing protein of 182 kDa</i>	Glicin (g) – triptofan (w) proteina od 182 kDa
hCNT	<i>human Na⁺-dependent concentrative nucleoside transporter</i>	humani Na ⁺ -ovisan koncentracijski nukleozidni transporter
HeLa	<i>cervical adenocarcinoma</i>	adenokarcinom vrata maternice
hENT	<i>human equilibrative nucleoside transporters</i>	humani ekvilibracijski nukleozidni transporter
HIF-1	<i>hypoxia-induced factor 1</i>	hipoksijom inducirani faktor 1
HRE	<i>hypoxia responsive element</i>	hipoksični odgovorni elementi
HuT-78	<i>T-cell lymphoma</i>	limfom T – stanica
IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>	inhibitori apoptoze
JURKAT	<i>T-cell leukemia</i>	leukemija T – stanica
K562	<i>chronic myeloid leukemia in blast crisis</i>	kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi
LDH	<i>lactated dehydrogenase</i>	laktat dehidrogenaza
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	mitogen-aktivirani protein kinaze
MDCK1	<i>epithelial Madin-Darby canine kidney</i>	epitelne stanice bubrega psa
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>	
miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>	miRNA-inducirajući utišani kompleks
MOLT-4	<i>acute lymphoblastic leukemia</i>	akutna limfoblastična leukemija
mRNK	<i>messenger ribonucleic acid</i>	glasnička ribonukleinska kiselina
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>	ciljna molekula rapamicina u sisavaca
NA	<i>nucleoside analogues</i>	nukleozidni analozi
NBC	<i>sodium/bicarbonate cotransporter</i>	Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ kotransport
NCI-H358	<i>bronchioloalveolar carcinoma</i>	bronhioalveolarni karcinom
NDCBE	<i>sodium dependent chloro/bicarbonate exchanger</i>	Na ⁺ ovisan Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ izmjenjivač
NTP	<i>nucleoside-5'-triphosphate</i>	nukleozid-5'-trifosfat

Omi/HtrA2	<i>Omi/high temperature requirement protein A</i>	
PABP	<i>poly(A) binding protein</i>	poli(A)vezujući protein
PACT	<i>protein activator of the interferon induced protein kinase</i>	proteinski aktivator interferon inducirajuće protein kinaze
PAN2-PAN3	<i>poly(A) nucleases 2 and 3</i>	poly(A) nukleaza 2 i 3
PDCD4	<i>programmed cell death protein 4</i>	protein programirane stanične smrti 4
PDK1	<i>protein serin/threonin kinase-3'-phosphoinositide-dependent kinase 1</i>	
PG	<i>proteoglycan-like domain</i>	proteoglikanska domena
PH	<i>pleckstrin homology</i>	plekstrin homologna domena
PHD	<i>prolyl-hydroxylase domain</i>	prolil-4-hidroksilazna domena
pHe	<i>extracellular pH</i>	izvanstanični pH
pHi	<i>intracellular pH</i>	unutarstanični pH
PI3,4,5-P₃	<i>phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate</i>	fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfata
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinases</i>	<i>fosfatidil-inozitol-3 kinaza</i>
PKB	<i>Akt/protein kinase B</i>	Akt/protein kinaza B
PR 1-5	<i>„protected regions“ 1-5</i>	zaštićene regije 1-5
pri-miRNA	<i>primary miRNA</i>	primarna miRNA
pVHL	<i>tumor suppressor protein von Hippel-Lind</i>	
Raji	<i>Burkitt's lymphoma</i>	Burkittov limfom
Rb	<i>retinoblastoma protein</i>	retinoblastomski protein
ROS	<i>reactive oxygen species</i>	slobodni kisikovi radikali
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>	Roswell Park Memorial Institute medij
rRNK	<i>Ribosomal RNA</i>	ribosomalna RNK
Smac/DIABLO	<i>second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low ol</i>	
STI	<i>signal transduction inhibitors</i>	inhibitori signalne transdukcije

THP-1	<i>acute monocytic leukemia</i>	akutna monocitna leukemija
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>	faktor tumorske nekroze
TNFR1	<i>TNF receptor 1</i>	TNF receptor 1
TRADD	<i>TNF receptor-associated death domain</i>	s TNF receptorom povezana domena smrti
TRAILR1	<i>TNF-related apoptosis-induced ligand receptor 1</i>	TNF-ovisan apoptoza-inducirajući ligand receptora 1
TRAILR2	<i>TNF-related apoptosis-induced ligand receptor 2</i>	TNF-ovisan apoptoza-inducirajući ligand receptora 2
TRBP	<i>HIV transactivating response RNA-binding protein-2</i>	HIV transaktivirajući odgovor RNK-vezujućeg proteina-2
VGEF	<i>vascular endothelial growth factor</i>	faktor rasta vaskularnog endotela
SPD	<i>sulfonyl-purine derivatives</i>	sulfonilpurinski derivati

1.UVOD

Rak je jedna od vodećih bolesti suvremenog društva koja se pojavljuje u svim dobnim skupinama (1). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO, *World Health Organization*), tumorska oboljenja smatraju se jednom od glavnih bolesti sa smrtnošću od 8,2 milijuna u 2012. godini (2). Prema Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo, u Hrvatskoj su tumorska oboljenja druga po redu u skupini vodećih uzroka smrti (3). Razvoj tumorskih stanica uključuje višestruko složene procese koji su najčešće uzrokovani genetičkim oštećenjem. Tumorske stanice okarakterizirane su brzim, nenormalnim i nekontroliranim staničnim rastom s povećanom sintezom nukleinskih kiselina, sintezom proteina i ubrzanim staničnim metabolizmom uz povećanu potrošnju glukoze (1). Većina protutumorskih lijekova koji se danas koriste u liječenju tumorskih oboljenja nije ciljno specifična, što dovodi do oštećenja i normalnih stanica. Ciljno specifični protutumorski lijekovi trebaju imati specifičniji učinak na stanice raka s minimalnim nuspojavama, što predstavlja izazov u razvoju novih protutumorskih lijekova (1, 4). Prema novim spoznajama, protutumorski lijekovi mogu se podijeliti na citotoksine čiji se mehanizam djelovanja zasniva na promicanju neposredne stanične smrti i na citostatike koji se smatraju inhibitorima prijenosa signala (STI, eng. *signal transduction inhibitors*). Većina citotoksičnih protutumorskih lijekova utječe na sintezu DNK i staničnu diobu te se dijele na (I) mitotske toksine, koji sprečavaju funkciju mikrotubula (vinkrisin, vinblastin, paklitaksel i docetaksel), (II) DNK reagirajuće lijekove, koji kao alkilirajući agensi kemijski modificiraju DNK (mitomicin, belomicin, cisplatina i karboplatina), (III) inhibitore DNK replikacije, koji djeluju kao antimetaboliti za sintezu purina, pirimidina i timina (metotreksat i 5-fluoruracil), i (IV) agense koji mijenjaju DNK topologiju (doksorubicin, topotekan i irinotekan) (4). Istraživanja novih potencijalnih protumorskih lijekova imaju za cilj razvoj novih potencijalnih protutumorskih lijekova sa selektivnim inhibicijskim učinkom na proliferaciju tumorskih stanica. Za postizanje najboljeg učinka protutumorski lijekovi trebali bi ciljano djelovati na tumorske stanice bez utjecaja odnosno s minimalnim utjecajem na zdrave stanice. Kao takvi derivati nukleinskih baza i sulfonamida pokazuju značajan potencijal u reguliranoj inhibiciji proliferacije tumorskih stanica sa značajno manjim inhibicijskim učincima na zdrave stanice (5).

1.1. Tumorska oboljenja

Osim nasljednih faktora, osnovni uzroci koji pridonose razvoju raka jesu način života i okolišni čimbenici, kao što su prehrambene navike, izloženost kancerogenim kemikalijama (dim cigareta i alkohol), radijaciji i infektivnim agensima. Tumorigeneza je višestupanjski proces u kojem normalne stanice stječu različite tumorigene mutacije koje za ishod imaju nenormalne proliferativne sposobnosti i ugrožavanje opstanka normalnih okolnih stanica. Pojavnost tumorigenih mutacija javlja se u najmanje 350 protein-kodirajućih gena, što je oko 1,6 % od ukupnog protein-kodirajućeg humanog genoma (6).

1.1.1. Tumorigene mutacije

Relevantni su geni za razvoj tumora onkogeni, tumor-supresor geni i geni odgovorni za popravak DNK. Onkogeni su promijenjeni geni čiji eksprimirani proteini doprinose razvoju tumora. Pro-onkogeni kodiraju proteine koji funkcioniraju kao mitogeni faktori rasta i odgovarajući receptori, citoplazmatske proteinske kinaze, regulatori staničnog ciklusa i stanične smrti, kao i jezgri transkripcijski faktori. Konverzija pro-onkogeni u onkogen vođena je mutacijom, genskom amplifikacijom i/ili kromosomskom translokacijom. Nakupljanje produkata onkogeni dovodi do nekontroliranog rasta i stvaranja transformiranih stanica (6). *Ras* onkogen prisutan je u više od 30 % humanih tumora te sudjeluje u aktivaciji PI3K/Akt signalnog puta, promičući staničnu proliferaciju i transformacije u stanicama. Aktivnost *Ras* onkogeni često je povezana s povišenom ekspresijom *Myc* onkogeni koji sudjeluju u regulaciji staničnog rasta, apoptozi, diferencijaciji i transformaciji stanica. Povišena ekspresija *Myc* onkogeni najprije se povezivala s Burkittovim limfomom, no novije studije ukazuju na prisutnost povišene ekspresije *Myc* onkogeni u gotovo svim humanim tumorima (7 – 9).

Odsutnost ili inaktivacija tumor-supresor gena nastali mutacijom, ili epigenetičkim izrezivanjem, doprinose nastanku tumora. Funkcionalni gubitak tumor-supresor gena omogućava tumorskim stanicama promicanje nekontroliranog rasta i izbjegavanje stanične smrti (6). Mutacije *p53* tumor-supresor gena prisutne su u gotovo svim tumorima. Gubitak normalno funkcionalnog *p53* proteina dovodi do nakupljanja funkcionalno izmijenjenih proteina koji dalje sudjeluju u promicanju tumorskih aktivnosti. Najznačajnija aktivnost *p53*

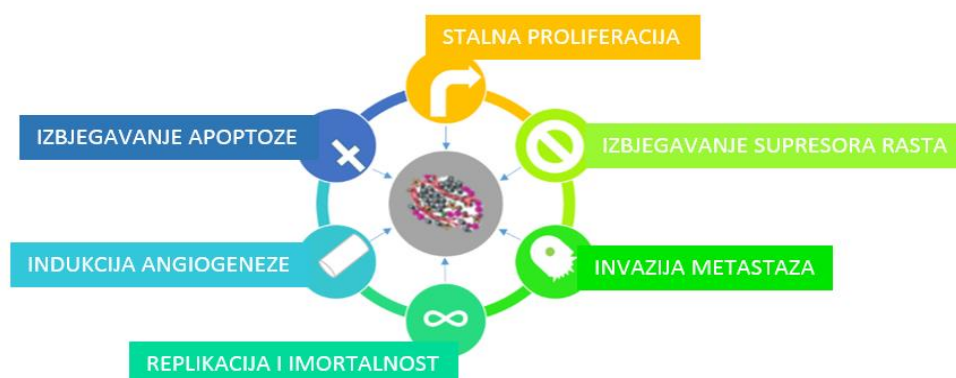
gena očituje se kroz regulaciju metabolizma, staničnog ciklusa, apoptoze, senescencije, autofagije i starenja (10, 11).

Stabilizacijski geni (eng. *stability gene*) odgovorni su za popravak oštećenja DNK tijekom umnožavanja koja su nastala djelovanjem kancerogenih tvari. Kao takvi stabilizacijski geni odgovorni su i za kontroliranje kromosomske segregacije kao i mitotskih rekombinacijskih procesa. Inaktivacijom tih gena dolazi do nagomilavanja mutacija i nepravilno formiranih kromosoma, što posredno doprinosi tumorigenezi (6).

1.1.2. Progresija tumora

Normalne stanice zahtijevaju egzogene mitogene signale kako bi započele dijeljenje. Tumorske stanice uspijevaju izbjeći ovaj način regulacije sintezom abnormalnih proteina koji će aktivirati staničnu proliferaciju i u odsutnosti egzogenog signala. Postizanje autonomije faktora rasta u tumorskim stanicama postiže se prekomjernom ekspresijom receptora rasta, posjedovanjem mutacijom promijenjenih receptora, nizvodnom mutacijom unutarstaničnih komponenti koje olakšavaju ligand neovisnu signalizaciju.

Neosjetljivost tumorskih stanica na antiproliferativne faktore omogućava im nekontrolirano dijeljenje. Osim toga, tumorske stanice uspješno izbjegavaju zaustavljanje staničnog ciklusa, starenje i programiranu staničnu smrt povišenom ekspresijom gena odgovornih za preživljenje i sniženom ekspresijom gena koji vode oštećene stanice u smrt. Tumorske stanice posjeduju mehanizam za održavanje i produljenje telomerne DNK, čime se postiže sposobnost neograničenog dijeljenja i izbjegavanje skraćivanja kromosoma koje bi dovelo do apoptoze (12).

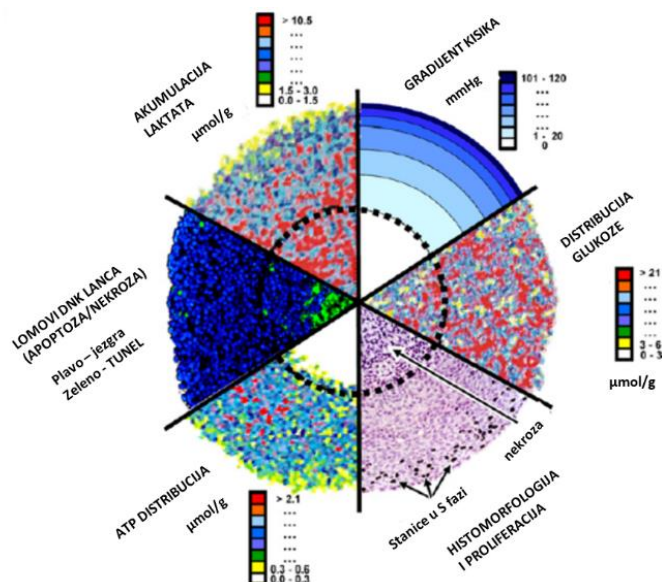


Slika 1.: Opće karakteristike tumorskih stanica (12)

Zbog stalnog rasta tumora javlja se potreba za povećanom opskrbom kisikom i hranjivim tvarima, kao i povećana potreba za uklanjanjem ugljikovog dioksida i proizvoda metabolizma. U skladu s tim, dolazi do urastanja krvnih žila u tumorsko tkivo. Malignost tumora započinje invazivnim rastom i stvaranjem metastaza koje limfom i krvožilnim sustavom odlaze do udaljenijih organa gdje će kolonizirati i stvoriti novo tumorsko tkivo (slika 1.) (12, 13).

1.1.3. 3D kultura stanica

Tijekom posljednjih 10 do 15 godina troškovi uspješnog uvođenja novih biološki aktivnih spojeva kao protutumorskih lijekova na tržište dosežu bilionske razmjere (14). Danas je uobičajeno da se potencijalni protutumorski učinci novih spojeva prvo istraže *in vitro* na stanicama u dvodimenzionalnoj kulturi (2D kultura), nakon čega se ispitivanja nastavljaju na animalnim modelima, a zatim se odabrani spojevi testiraju na ljudima u kliničkim studijama (15). Kako bi se smanjili troškovi i vrijeme testiranja, najveći naponi usmjereni su prema probirnim predkliničkim i *in vitro* modelima. Najnoviji pristupi u istraživanjima uključuju 2D kulturu stanica kao temeljni stanični model (15), a koji se nadopunjava s 3D kulturom stanica, koja predstavlja dobar model za testiranje nosintetiziranih spojeva s visokim potencijalom oponašanja kompleksa trodimenzionalne organizacije tumorskog tkiva *in vivo*.

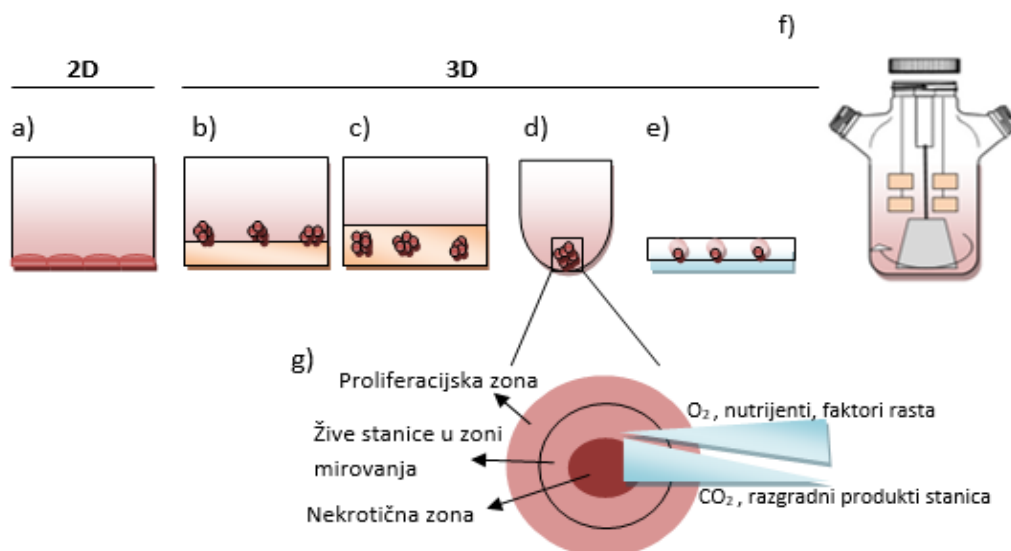


Slika 2.: Karakteristike formiranih sferoida u 3D kulturi stanica (djelomično izmijenjena slika) (16)

Slično nativnom tumorskom tkivu, stanice uzgojene kao tumorski sferoidi pokazuju jaki proliferacijski gradijent koji odražava raspodjelu kisika, hranjivih tvari i energije, kao nakupljanje metabolita od vanjske strane prema unutrašnjoj strani sferoida (17).

Sferoidi formirani u 3D kulturi sastavljeni su od stanica koje su u različitim fazama rasta smještene u više slojeva. Vijabilne stanice koje su većinom u S fazi staničnog ciklusa smještene su u vanjskom sloju sferoida i izložene su staničnom mediju. Kao što je prikazano na slici 2., u središtu sferoida nalazi se hipoksična zona sa stanicama koje su u nekrozi ili apoptozi (16).

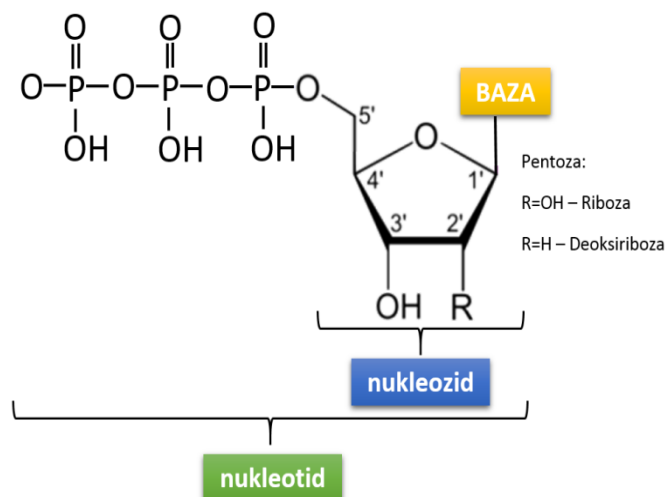
Stanični sferoidi u 3D kulturi stanica mogu se uzgajati sa nosačem ili bez nosača. Formiranje sferoida bez nosača uključuje sakupljanje stanica u neadherentnim uvjetima. Ovaj način 3D kulture stanica postiže se korištenjem slabo prijanjajućih ploča ili oblaganjem podloge poli-hidroksietil metakrilatom ili agarozom. Drugi način uzgoja stanica bez nosača jest metodom viseće kapljice, gdje kapljica medija koja sadrži stanice visi s podloge (18). Modeliranje 3D stanične kulture moguće je pomoću nosača koji mogu biti izgrađeni od prirodnih ili umjetnih materijala; izgrađeni su od poroznog materijala koji služi kao potpora u formiranju 3D strukture. Nadalje, sferoidi mogu biti formirani u bocama s rotirajućim sustavom ili u okretnoj miješalici (slika 3.) gdje kao rezultat vrtložnog sustava dolazi do formiranja 3D strukture (15, 18) .



Slika 3.: Uzgoj 2D i 3D kulture stanica: a) stanice uzgojene u monosloju, b) stvaranje sferoida na nosaču, c) stvaranje sferoida unutar nosača, d) stvaranje sferoida na slabo prijanjajućoj podlozi, e) stvaranje sferoida metodom viseće kapljice, f) uzgoj stanica u bioreaktoru, g) distribucija nutrijenata i razgradnih produkata unutar sferoida

1.2. Derivati nukleobaza i nukleozida kao antimetaboliti

Kemijski modificirani analozi prirodnih nukleozida, nukleotida i nukleinskih baza (slika 4.) klasificiraju se kao endogeni antimetaboliti koji interferiraju s mnogim životno važnim staničnim procesima. Nukleozidni analozi (NA) strukturno su slični prirodnim antimetabolitima, izgrađenim od nukleinske kiseline (purinska ili pirimidinska baza) vezane na šećernu strukturu ili modificirani šećer. Strukturalna sličnost s prirodnim nukleozidima omogućuje im ulazak unutar stanice preko nukleozidnih transportera: humani Na^+ -ovisan koncentracijski nukleozidni transporter (hCNT, eng. *human Na^+ -dependent concentrative nucleoside transporter*) i humani ekvibracijski nukleozidni transporter (hENT, eng. *human equilibrative nucleoside transporter*). Za aktivaciju NA potreban je stanični metabolizam kako bi se preveli u svoj aktivni oblik. Aktivacija se postiže fosforilacijom staničnim kinazama koje koriste nukleozide kao supstrat (19, 20). Rezultat je inicijalne fosforilacije NA nukleozid-5'-monofosfat, koji je ujedno i ograničavajući korak tijekom generiranja aktivnih metabolita unutar stanice. U inicijalnoj fosforilaciji stanica prije svega koristi 2'-deoksicitidin kinazu, timidin kinazu 1 i 2, te deoksiganin kinazu. Svaka kinaza koristi više različitih supstrata čija je aktivnost često regulirana povratnom spregom. Kod tumorskih stanica zapažena je veća ekspresija 2'-deoksicitidin kinaze nego u normalnim stanicama, što pridonosi selektivnom djelovanju NA kao protutumorskim lijekovima. Daljnja fosforilacija monofosfata provodi se djelovanjem različitih staničnih kinaza do nukleozid-5'-trifosfatnog (NTP) analoga (20).



Slika 4.: Strukturna formula nukleozida i nukleotida

NTP analog supstrat je za DNK polimerazu i kao takav može biti ugrađen u DNK tijekom replikacije ili tijekom popravka, dovodeći do zastoja u daljnjoj sintezi DNK. Dodatna selektivnost NA ide u smjeru učestalije replikacije stanične DNK u tumorskim stanicama nego u normalnim stanicama, koje su većinom u stanju mirovanja. Ugradnjom NTP analoga u RNA uzrokuju transkripcijsku terminaciju, kao i nestabilnost glasničke RNK (mRNK) i ribosomalne RNK (rRNK) (20).

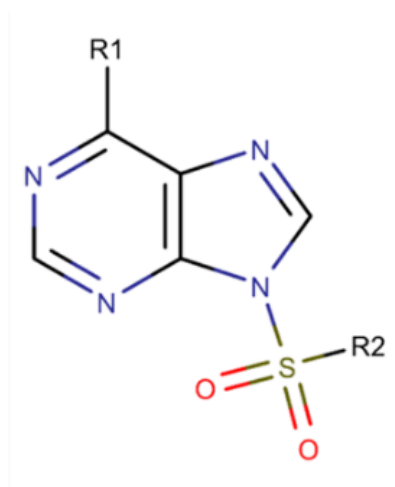
Dodatni učinak djelovanja NA na smanjeni stanični rast jest preko inhibicije ključnih enzima u stanici. NA inhibitorno djeluju na ribonukleotid reduktazu, koja uklanja 2'-OH skupine s riboze u svojstvu nakupljanja *de novo* 2'-deoksiribonukleozid difosfata, purin-nukleozid fosforilazu, koja je uključena u metabolizmu purina, i timidilat sintazu. Novije sintetizirani NA postižu protutumorske učinke djelujući kao antagonisti adenozijskih receptora ili kao inhibitori enzima koji nisu uključeni u sintezu nukleinskih kiselina (20). NA pokazuju citostatsko djelovanje ugradnjom u aktivno replicirajuću DNK uzrokujući steričke smetnje dovodeći do zastoja u S fazi staničnog ciklusa (21, 22).

1.2.1. Analizi purinskih nukleozida

Purini su heterociklički, aromatski organski spojevi koji se sastoje od pirimidinskog prstena kondenziranog s imidazolnim prstenom i predstavljaju osnovnu građevnu jedinicu baza adenina i gvanina. Endogeni purinski nukleozidi sudjeluju u važnim staničnim procesima, kao što je DNK i RNK sinteza, stanična signalizacija i regulacija enzima. Purinski analozi kemijski su modificirani u smjeru oponašanja fizioloških molekula i iskorištavanja staničnog metabolizma. Kao takvi, analozi se mogu ugraditi u DNK ili RNK te tako inhibirati stanični rast tumorskih stanica. Nadalje, ugradnjom u nukleinske kiseline inhibiraju važne enzime kao što su DNK i RNK polimeraze, različite stanične kinaze, ribonukleinske reduktaze, DNA metiltransferaze i purin nukleinske fosforilaze (23). Prvi su sintetizirani purinski analozi 6-merkaptopurin i tiogvanin, koji se koriste u terapijama akutne leukemije (24). Posljednjih nekoliko godina Europska medicinska agencija odobrila je upotrebu tri deoksiadenozina, kladribina (2-CdA, 2-klorodeoksiadenozin), fludarabina i pentostatina, u liječenju malignih limfoida i drugih hematoloških poremećaja. Kladribin i fludarabin pokazali su se kao izuzetno uspješni u liječenju akutne mijeloidne leukemije (23).

Grupa organskih kemičara na čelu s prof. dr. sc. B. Žinić sintetizirala je seriju nukleozidnih derivata klasificiranih kao antimetaboliti, koji su zatim testirani na protutumorske učinke, te im je dokazan značajan *in vitro* citotoksičan učinak na humanim tumorskim stanicama, s minimalnim učinkom na normalne humane fibroblaste (5, 25). Novosintetizirani *N*-9-sulfonilpurinski derivati svrstavaju se u purinske analoge koji su okarakterizirani kao alosterički modulatori koji se vežu na aktivno mjesto enzima, inhibirajući njegovu aktivnost. Specifičnim vezivanjem na aktivno mjesto u enzimu povećava se njihova selektivnost. *N*-9-sulfonilpurinski derivati (SPD) mogu se promatrati kao spojevi s dva farmakofora: modificirana nukleobaza i derivat sulfonamida. U skladu s tim, spojevi mogu imati mehanizam djelovanja jednog ili drugog farmokofora, ili posve novi mehanizam djelovanja na tumorske stanice koji je potrebno istražiti (slika 5.).

S farmakološkog gledišta, posljednjih pedeset godina aktivna istraživanja usmjerena su prema sulfonamidima (-SO₂-N-) zbog njihovog širokog spektra bioloških aktivnosti vezanih uz protutumorsku aktivnost u *in vivo* i *in vitro* uvjetima, kao i protuupalnu i antimikrobnu aktivnost (26 – 28). Derivati sulfonamida pokazuju snažni protutumorski učinak sa znatno manjim utjecajem na normalne stanice tako da inhibiraju sintezu DNK, RNK i proteina, što dovodi do promicanja apoptoze u humanim tumorskim stanicama (27). Različita biološka aktivnost sulfonamida i pripadajućih izoestera (sulfati, sulfamidi) i kumarina povezuje se s učinkom na tumorske stanice preko selektivnog inhibicijskog djelovanja na ugljičnu anhidrazu IX (CA IX, eng. *carbonic anhydrase IX*). Mehanizam djelovanja temelji se na vezanju sulfonamidnog aniona na cinkov ion unutar aktivnog mjesta CA IX enzima inhibirajući enzimsku aktivnost (29 – 31).



Slika 5.: Opća formula *N*-9-sulfonilpurina

1.3. Apoptoza

Programirana stanična smrt, odnosno apoptoza strogo je reguliran proces s različitim biokemijskim i genetičkim putovima koji imaju ključnu ulogu u razvoju i održavanju homeostaze u normalnom tkivu. Neravnoteža u regulaciji apoptoze u stanici može dovesti do razvoja tumorskih oboljenja ili autoimunih bolesti. Nastali defekti u apoptozi predstavljaju važnu ulogu u tumorigenezi, dopuštajući stanicama preživljenje po isteku životnog vijeka stanice. Posljedice tih promjena dodatno se odražavaju u tumorskim stanicama preko osiguravanja zaštite od oksidativnog stresa i hipoksije, kao i izbjegavanje potrebe za egzogenim faktorima rasta u rastućim tumorskim masama. Krajnji rezultat očituje se u nakupljanju genetički promijenjenog staničnog materijala koji sudjeluje u promicanju karakterističnih tumorskih obilježja. Tumorske stanice izbjegavaju apoptozu promjenom u regulaciji onkogenih proteina koji pokreću staničnu diobu i aktivaciju apoptoze (npr. Myc, E1a, i ciklin D1). Dodatni mehanizmi izbjegavanja apoptoze u tumorskim stanicama jesu ekspresijom antiapoptotskih proteina kao što je B-stanični limfom 2 protein (Bcl-2, eng. *B-cell lymphoma 2* protein) ili sniženom regulacijom proapoptotskih proteina kao što je BAX (32, 33). Postoje mnoga saznanja o mehanizmu aktivacije apoptoze što predstavlja dobre temelje za izučavanje novosintetiziranih spojeva s ciljem inhibitornog djelovanja na tumorske stanice preko aktivacije apoptoznog puta kao poželjnog načina umiranja terapeutiku izložene stanice (34).

Apoptotska kaskada može biti pokrenuta preko aktivacije receptora stanične smrti ili oslobađanjem citokroma c iz mitohondrija. Oba puta pokreću specifičnu obitelj proteaza – kaspaza kako bi se započeo proces programirane stanične smrti. Uz prethodno navedene otkriven je i stresom izazvan put aktivacije apoptoze u endoplazmatskom retikulumu (35).

1.3.1. Kaspaza ovisan put

1.3.1.1. Vanjski put

Vežanjem liganda na receptor smrti pokreće se vanjski put apoptoze koji signalizira proces samouništenja ili upućuje na uništenje druge stanice. Receptori smrti najčešće su članovi receptorske superobitelji faktora tumorske nekroze (TNF, eng. *tumor necrosis factor*), tzv.

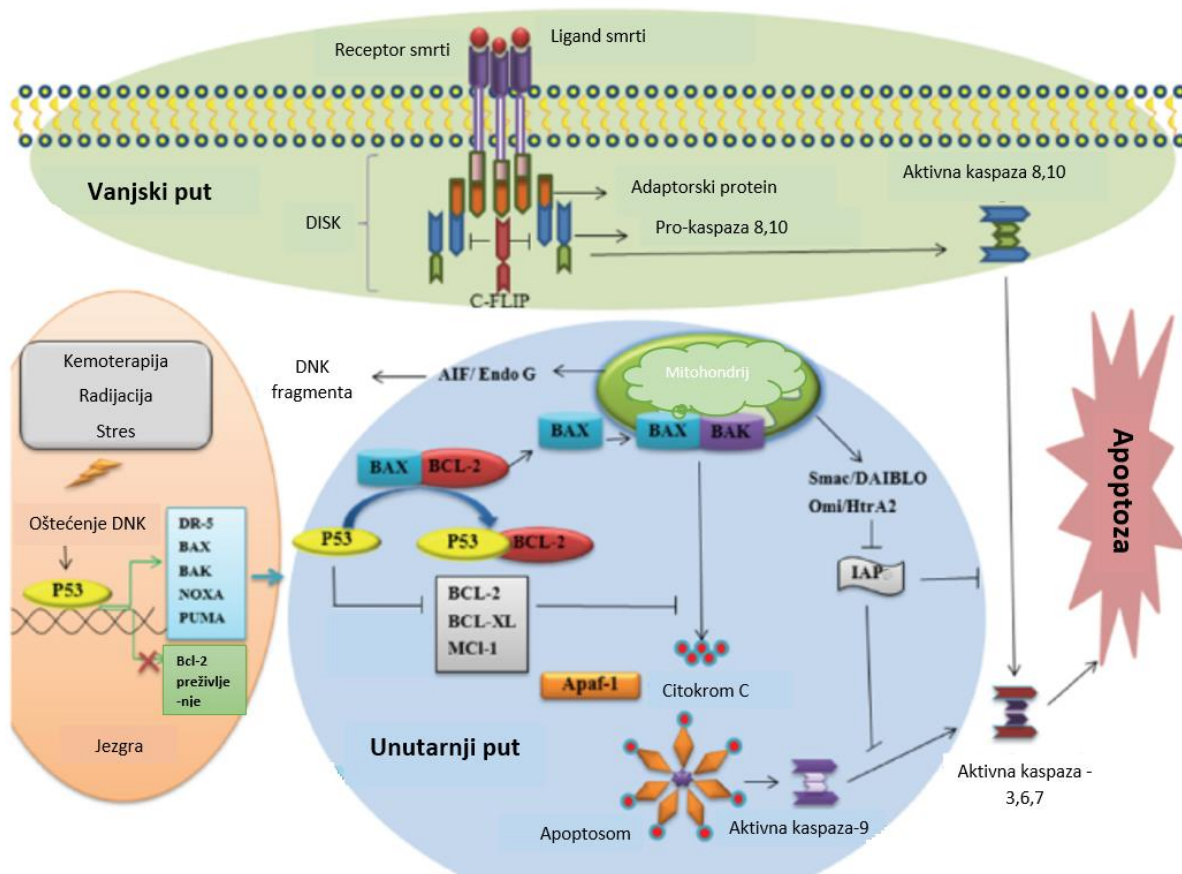
receptori smrti; FAS ili CD95/APO-1, TNF-receptor 1 (TNFR1, eng. *TNF receptor 1*), receptor smrti 4 (DR4, eng. *death receptor*) ili (TRAILR1, eng. *TNF-related apoptosis-induced ligand receptor 1*) i DR 5 ili TRAILR 2. Receptori smrti sadrže unutarstaničnu domenu smrti (DD, eng. *death domain*) koja preraspoređuje adaptorske proteine povezane s TNF receptor-povezanim domenom smrti (TRADD, eng. *TNF receptor-associated death domain*) i Fas protein povezan s domenom smrti (FADD, eng. *Fas-associated death domain*). Nakon aktivacije Fas receptora Fas ligandom dolazi do trimerizacije DD dijelova pomoću smrt-inducirajućeg signalnog kompleksa (DISC, eng. *death-inducing-signalling-complex*). Daljnja trimerizacija ide preko FADD adaptorske molekule preko koje se prenosi transdukcijski signal za kaspaze te dolazi do aktivacije prokaspaze -8 ili -10 (24). Inicijatorske kaspaze -8 i -10 aktiviraju kaskadnu aktivaciju efektorskih kaspaza -3, -6, i -7, što će rezultirati apoptozom kao krajnjim rezultatom (slika 6.) (36, 37).

1.3.1.2. Unutarnji/mitohondrijski put

Unutarnji put apoptoze, koji se još naziva i mitohondrijski put, započinje unutar stanice. Izvanstanični ili unutarstanični stres (hipoksija, oštećenje DNA, nedostatak faktora rasta, visoka koncentracija citosolnog kalcija, ili sam oksidativni stres) promiču mitohondrijski put apoptoze. Povećana propusnost vanjske mitohondrijske membrane dovodi do otpuštanja proapoptotskih molekula: citokrom c, inducirajući faktor apoptoze (AIF, eng. *apoptosis inducing factor*), Smac/DIABLO (eng. *second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low ol*), Omi/HtrA2 (eng. *Omi/high temperature requirement protein A*) i endonukleazu G u citoplazmu stanice. Propusnost mitohondrijske membrane kontrolirana je od strane proteina iz Bcl-2 obitelji, koji mogu djelovati proapoptotski ili antiapoptotski. Otpuštanjem citokroma c u citoplazmu zajedno s kaspazom -9 i Apaf-1 (eng. *apoptotic protease activating factor 1*) stvara se apoptosom koji dalje aktivira izvršne kaspaze -3, -6 i -7. Članovi obitelji inhibitora apoptoze (IAP, eng. *inhibitor of apoptosis*) mogu se izravno vezati na kaspaze te inhibirati njihovu aktivnost. Proteini AIF/Endonukleaza G otpuštaju se iz mitohondrijskog međumembranskog prostora, odlazeći u jezgru gdje cijepaju DNK. IAP molekule negativno su regulirane djelovanjem mitohondrijskih molekula Smac/DIABLO i Omi/HtrA2 molekulama. Mitohondrijski put apoptoze dodatno je reguliran *p53* genom preko ekspresije proapoptotskih članova Bcl-2 obitelji ili supresijom antiapoptotskih molekula (35, 36).

1.3.1.3. Apoptoza inducirana preko endoplazmatskog retikuluma

Aktivacija apoptoze putem endoplazmatskog retikuluma (ER) manje je poznat put i vjeruje se da je o kaspazi-12 ovisan put. Različiti stresovi ER imaju za posljedicu nakupljanje nepravilno formiranih proteina što dovodi do otpuštanja Ca^{2+} , koji zatim aktiviraju kaspazu-12 koja potom inducira kaspaznu kaskadu. Aktiviranjem transkripcijskog faktora *gena 4* (ATF4, eng. *transcription factor gene 4*) inducira se apoptoza preko aktivacije transkripcijskog faktora Chop/GADD153, što zauzvrat ima povišenje regulacije proapoptotskih članova Bcl-2 obitelji, Bax i Bak, i sniženu regulaciju antiapoptotskih članova obitelji BCL-xL (eng. *BCL extralarge*), nakon čega dolazi do translokacije proteina Bax i Bak iz ER na mitohondrijsku membranu i aktivacije kaspaza preko otpuštenog citokroma c (38).



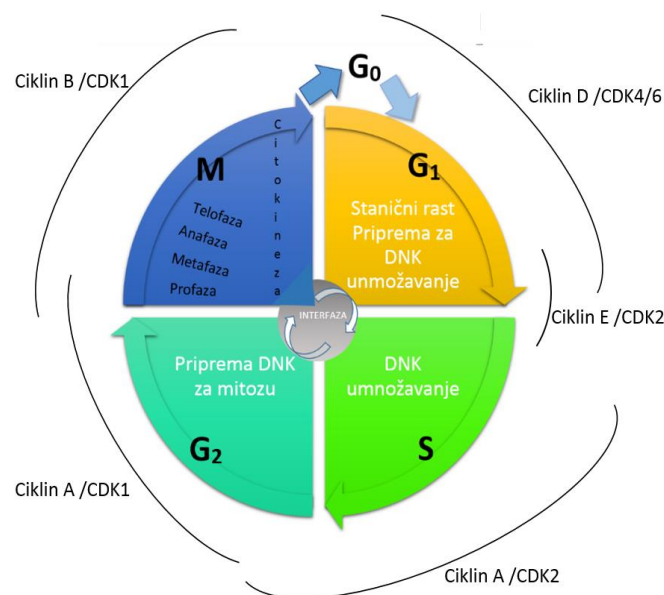
Slika 6.: Vanjski i unutarnji put apoptoze (djelomično izmijenjena slika) (36)

1.3.2. Kaspaza neovisan put

Alternativni modeli koji se smatraju kaspaza neovisnim putovima u apoptozi jesu: senescencija, autofagija, paraptoza, mitotska katastrofa, programirana stanična smrt nalik apoptozi ili stanična smrt nalik nekrozi. Kaspaza neovisni putovi smatraju se sigurnosnim mehanizmima za zaštitu organizma od neželjenih i potencijalno štetnih stanica kada je kaspazni put narušen, a dodatna zaštita očituje se aktivacijom kao odgovorom na neke citotoksične spojeve. Ove vrste stanične smrti međusobno se razlikuju morfološki i biokemijski, a dodatno su ovisne o tipu stanice i intenzitetu podražaja (35).

1.4. Stanični ciklus

Stanični je ciklus strogo reguliran proces između faza staničnog rasta, udvostručavanja DNK, mitoze i citokineze (podjela citoplazme). Tijek staničnog ciklusa podijeljen je u faze G_1 , S, G_2 i M, gdje G_1 i G_2 faze predstavljaju fazu odmora između faze udvostručavanja DNK (S faza) i faze segregacije koja se javlja tijekom M faze. Napredovanje staničnog ciklusa regulirano je kroz kontrolne točke koje dopuštaju prolaz stanice kroz faze samo ako je stanica u pogodnom okruženju te ako je adekvatno završena prethodna faza staničnog ciklusa (39). Napredovanje staničnog ciklusa kroz faze pod kontrolom je proteina iz obitelji serin/treonin kinaza, koje se sastoje od katalitičke podjedinice ciklin ovisne proteinske kinaze (Cdk, eng. *cyclin-dependent protein kinase*) i ciklinske regulacijske podjedinice. Ekspresija Cdk relativno je konstantna tijekom staničnog ciklusa, gdje dolazi do sinteze i razgradnje ciklina tijekom faza. U ranoj G_1 fazi dolazi do ekspresije ciklina D (D1, D2 i D3) koji imaju afinitet za vezanje i aktiviranje Cdk4 i Cdk6. Na kraju G_1 faze, Cdk2 aktivira se vezanjem na cikline tipa E (E1 i E2). Tijekom G_1 faze aktivirani Cdk dovode do fosforilacije retinoblastomskih proteina (Rb, eng. *retinoblastoma protein*) koji omogućuju akumulaciju E2F transkripcijskih faktora. E2F transkripcijski faktori uključuju gene koji kodiraju potrebne proteine za S fazu. Tijekom S faze aktiviran je Cdk2 preko ciklina tipa A (A1 i A2). Ciklin tipa A izražen je tijekom S i G_2 faza koji je potreban za DNK udvostručavanje. Ciklin tipa B (B1 i B2) zajedno s Cdk1 pogone stanicu u mitozu. Degradacijom ciklina B preko APC/C kompleksa omogućava se odvijanje mitoze. Ciklin A1 i B3 zastupljeni su samo u zametnim stanicama testisa (40 – 42) (slika 7.).



Slika 7.: Tijek staničnog ciklusa

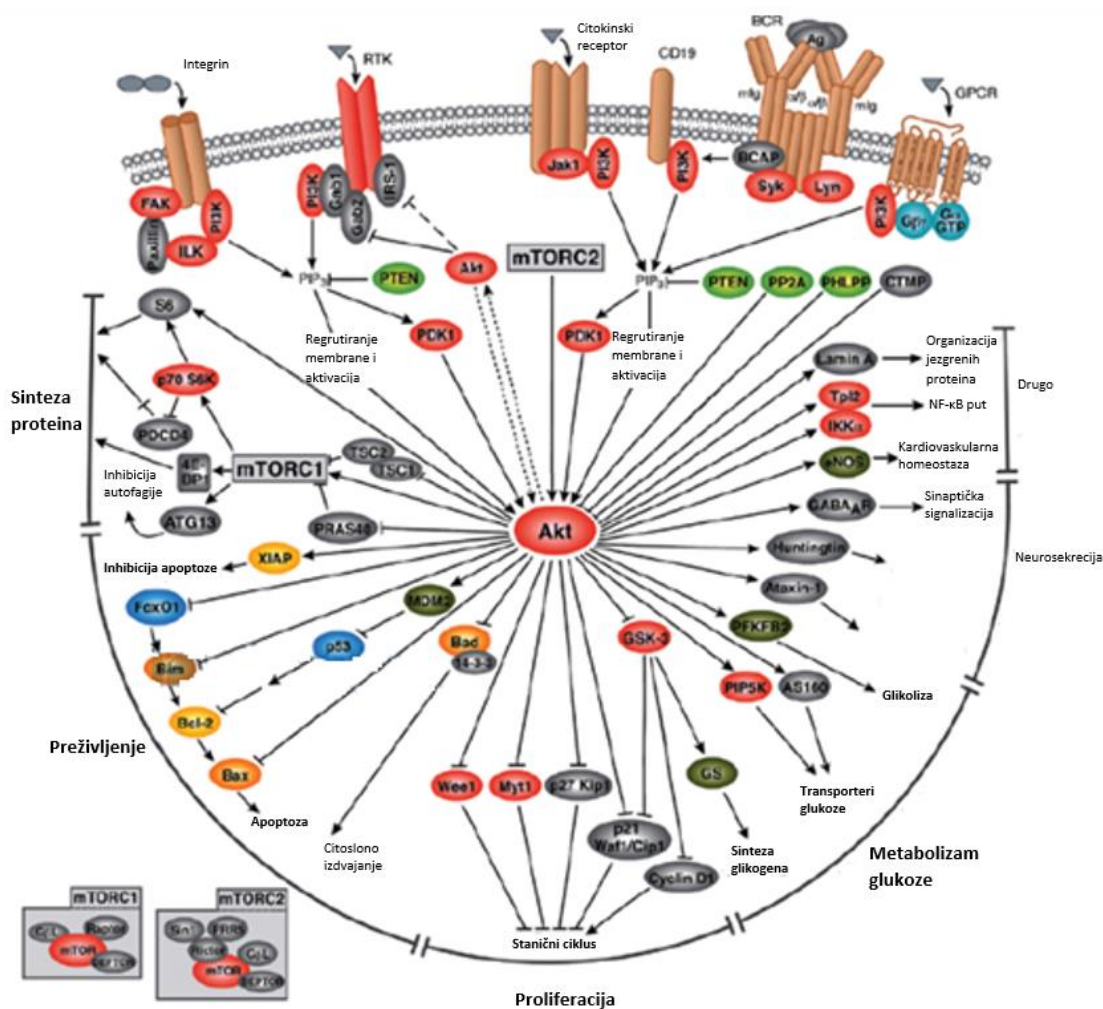
Cdk proteini negativno su kontrolirani preko Cdk inhibitora (CKI, eng. *Cdk inhibitory protein*). CKI podijeljeni su u dvije proteinske obitelji: INK4 (inhibitor Cdk4) i Cdk interakcijski protein/kinaza inhibirajući protein (CIP/KIP, eng. *Cdk interacting protein/kinaze inhibitory protein*). INK4 obitelj sastoji se od p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} i p19^{INK4D}. Proteini iz obitelji INK4 vežu se za slobodne Cdk 4/6, sprečavajući njihovu kinaznu aktivnost ometajući povezivanje s ciklinom tipa D, što uzrokuje zaustavljanje staničnog ciklusa u G1 fazi. U CIP/KIP obitelj ubrajaju se p21^{CIP21} (Cdk interakcijski proteini 1), p27^{KIP1} (kinaza inhibirajući proteini 1) i p57^{KIP2} (kinaza inhibirajući proteini 2). Članovi obitelji CIP/KIP vežu se na već formirane ciklin/CDK komplekse. Kako kompleksi uključuju ciklin A-E/CDK2, ciklin D/CDK4-6 i ciklin A-B/Cdk1, aktivnost obitelji CIP/KIP odražava se na mogućnost inhibicije svih faza staničnog ciklusa (40, 43, 44).

1.5. PI3K/Akt/mTOR put

PI3K/Akt/mTOR put (fosfatidil-inozitol-3 kinaza / serin/treonin kinaza / ciljna molekula rapamicina u sisavaca) jedan je od najčešće krivo reguliranih signalnih putova u preživljenju tumorskih stanica zbog višestrukih genskih aberacija (45). PI3K/Akt/mTOR signalni put ima ključnu ulogu u reguliranju različitih staničnih funkcija (slika 8.) uključujući veličinu stanice/rast, proliferaciju, preživljavanje, metabolizam glukoze, stabilnost genoma, transkripciju i sintezu proteina (46, 47). Aktivacijom PI3K/Akt/mTOR puta u tumorskim stanicama dolazi do poremećaja u kontroli rasta i preživljenju stanica, što dovodi do kompetitivne prednosti u rastu, metastatskih sposobnosti, angiogeneze i otpornosti na terapiju. Zbog toga se PI3K/Akt/mTOR put uzima kao jedan od najzanimljivijih ciljeva za izučavanje razvoja novih protutumorskih lijekova (48).

PI3K pripada obitelji lipidnih kinaza s karakterističnom sposobnošću fosforilacije inozitolnih prstena na 3'-OH grupu u inozitolfosfolipidima. Klasa I PI3K heterodimeri sastavljeni su od katalitičke domene p110 i adapterske/regulacijske podjedinice p85 (48). Dodatna podjela klase I jest na podrazred IA (PI3K α , β i δ), koji se aktivira preko proteinskog receptora tirozin kinaze, i podrazred IB (PI3K γ), koji se aktivira od strane receptora povezanih s G proteinima. Autofosforilacijom tirozidnog ostatka dolazi do direktnog vezanja PI3K na fosfotireozidni dio receptora za rast stanica kako bi stupio u kontakt s membranom ili vezanja na adaptorsku podjedinicu što vodi do alosteričke aktivacije katalitičke domene. Aktivacijom PI3K dovodi do stvaranja sekundarnog glasnika fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfata (PI3,4,5-P₃) iz

supstrata fosfatidilinozitol-4,5-difosfata (PI4,5-P₂). PI3,4,5-P₃ potiče protein serin/treonin kinazu (PDK1, eng. *protein serin/threonin kinase-3'-phosphoinositide-dependent kinase 1*) putem plekstrinske homologne (PH, eng. pleckstrin homology) domene i Akt/proteinsku kinazu B (PKB, eng. *Akt/protein kinase B*) (48). Aktivirana PDK1 fosforilira i aktivira Akt, koji se slobodno nalazi unutar stanice.



Slika 8. PI3K/Akt/mTOR put signalizacije (djelomično izmijenjena slika) (46)

Nizvodni efektor PI3K jest Akt, poznat i kao protein kinaza B (PKB) koja se javlja u tri izoformna oblika, Akt1, Akt2 i Akt3. Akt1 i Akt2 sveprisutno su izraženi u organizmu, za razliku od Akt3 koji je pretežno pronađen u mozgu, srcu i bubrezima. Jedna od glavnih funkcija Akt-a promicanje je faktora rasta u smjeru stanične proliferacije i inhibicija apoptoze preko inaktivacije proapoptotskih proteina kao što je Bad i MDM2 (eng. *Mouse double minute 2*

homolog) koji uzrokuje degradaciju p53. Akt je strukturalno izgrađen od PH domene, središnje kinazne domene i karboksil-terminalno regulatorne domene (46). Akt aktiviran od strane PI3K prenosi signal na mTORC djelujući kao glavni posrednik u moduliranju staničnog preživljenja (49).

mTOR je sastavljen od dva slična kompleksa, mTORC1 i mTORC2. mTORC1 sastoji se od mTOR, Raptor, mLST8 i PRAS40 molekula. Za ulogu ima aktivaciju ribosomalnog proteina S6 kinaze (S6K) i inaktivaciju 4EBP1, te sudjeluje u proteinskoj translaciji i staničnom rastu. mTORC2 sastavljen je od mTOR, Rictor, Sin1 i mLST8 molekula. mTORC2 aktivira Akt osiguravajući staničnu proliferaciju i preživljenje. Kompleks mTORC1 osjetljiviji je na rapamicin od mTOR2 kompleksa; sukladno tome prva generacija mTOR inhibitora usmjerena je prema mTORC1 kompleksu (48).

1.6. Hipoksijom inducirani faktori

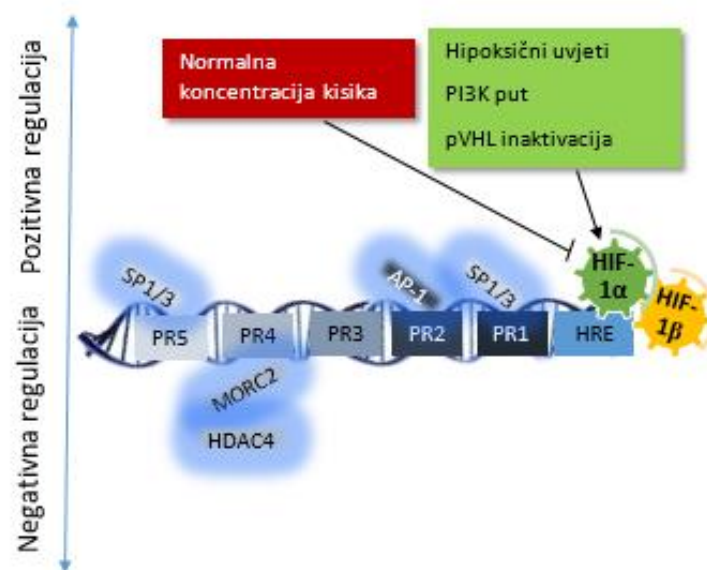
Hipoksični uvjeti vode do snažnih promjena u ponašanju stanica raka kao što su promjene u ekspresiji gena, metabolizmu, genskoj stabilnosti, proliferaciji i preživljenju. Zbog ograničene dostupnosti kisika, stanice raka preusmjeravaju svoj energetski metabolizam od oksidativne fosforilacije prema anaerobnoj glikolizi, čime se stvaraju velike količine mliječne kiseline i CO₂, koji doprinose snižavanju izvanstaničnog pH (pHe, eng. *extracellular pH*), a što dovodi do zakiseljene mikrookoline u tumorima. Stalni unutarstanični pH (pHi, eng. *intracellular pH*) važan je za održavanje vitalnih bioloških funkcija u stanici. Preživljenje stanica raka ovisi o njihovoj sposobnosti prilagodbe prema ograničenim uvjetima koji ih okružuju (29).

Transkripcijski hipoksijom inducirani faktor 1 (HIF-1, eng. *hypoxia-induced factor 1*) heterodimer je koji se sastoji od dvije podjedinice: inducibilne HIF-1 α i konstitutivno eksprimirane HIF-1 β . Pri normalnim koncentracijama kisika HIF-1 α se ubikvitinira uz posredstvo pVHL-a (eng. *tumor supresor protein von Hippel-Lind*) i postupno razgrađuje u proteosomima (29, 50). Proces ovisi o prepoznavanju hidroksiliranih prolinskih ostataka koji se nalaze u HIF-1 α domeni ovisnoj o kisiku. U prolil-4-hidroksilaznoj domeni (PHD, eng. *prolyl-hydroxylase domain*) ostatci su prolila u hidroksiliranom obliku pri uvjetima normalne koncentracije kisika (29). U hipoksičnim uvjetima HIF-1 postiže stabilizaciju i/ili ekspresiju α -podjedinice sniženom hidroksilacijom prolinskih ostataka, što dovodi do neaktivnosti PHD domene u odsutnosti kisika. Kao takva, HIF-1 α domena stabilizirana je i nije prepoznata od strane pVHL-a. Udruživanje α s β podjedinicom dovodi do stvaranja HIF-1 i ekspresije ciljanih gena koji sadrže hipoksične odgovorne elemente (HRE, eng. *hypoxia responsive element*), uključujući transportere glukoze (GLUT-1 i GLUT-3), faktore vaskularnog endotelnog rasta koji uključuje neoangiogenezu i na kraju CA IX koji je uključen u regulaciju staničnog pH. Naime, osim hipoksičnih uvjeta signalni putovi PI3K/Akt/mTOR i mitogen-aktivirani protein kinaze (MAPK, eng. *mitogen-activated protein kinase*) također mogu dovesti do aktivacije HIF-1 (51).

1.6.1. Aktivacija ugljične anhidraze CA IX

HRE se nalazi uzvodno od početka transkripcije CA IX promotora koji je glavni za regulaciju ekspresije CA IX. Identificirano je pet dodatnih regulatornih DNK sekvenci zaštićenih regija 1-5 (PR 1-5, eng. „*protected regions*“). PR-1 i PR-5 regije u interakciji su s transkripcijskim

faktorima SP1/SP3 (specifični faktori 1 i 3); PR2 je vezan za transkripcijski faktor AP-1 (aktivatorski protein 1) i PR3 je u interakciji sa staničnim proteinom. PR-1 i PR-2 regije esencijalne su za prepisivanje CA IX. Nasuprot tome, PR-4 regija, koja je negativni regulacijski element koji djeluje kao prigušivač ekspresije CA IX, vezana je s represorskim kompleksom koji sadrži proteine MORC2 (*Microchidia 2*) i HDAC4 (histonsku deacetilazu 4). Na slici 9. prikazan je predloženi mehanizam djelovanja koji sugerira MORC2 prepoznavanje od strane PR4 regije i katalizu deacetilacije histona H3 u CA IX promotorskoj regiji pomoću HDAC4 proteina. Na taj način remeti se aktivacija transkripcije (29).



Slika 9.: Promotorska regija za CA IX (djelomično izmijenjeno, 29)

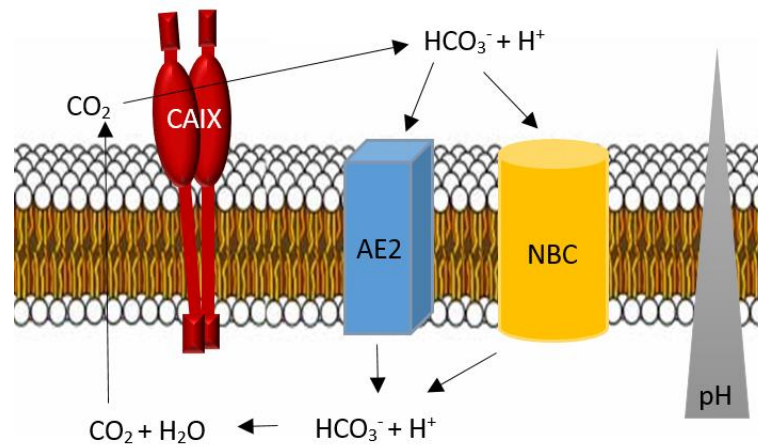
Obitelj enzima ugljične anhidraze (CA) katalizira jednostavnu fiziološku reakciju interkonverzije ugljičnog dioksida (CO_2) i bikarbonatnog iona (HCO_3^-) te tako sudjeluju u ključnim fiziološkim procesima povezanim s disanjem i transportom CO_2 /bikarbonata. Ključnu ulogu u procesu adaptacije ima enzim CA IX čija je osnovna aktivnost neutralizacija pHi u kiselom okruženju. CA IX ograničeno je raspodijeljena među normalnim tkivima gotovo isključivo u epitelu gastrointestinalnog trakta, odnosno u žlijezdama želučane sluznice, epitelu žučnog mjehura i kriptičnim enterocitima u dvanaesniku, jejunu i ileumu. Ekspresija CA IX povećana je u mnogim tumorima kao što su glioma/ependimiomi, mezoteliomi (tumor pleure), papilarni/folikularni karcinom, karcinomi mokraćnog mjehura, vrata maternice, bubrega, jednjaka, pluća, dojki, mozga, vulve, karcinom bazalnih pločastih stanica i drugi. Neke

stanice raka imaju mutiran VHL gen što dovodi do pojačane regulacije CA IX, odnosno aktivacije HIF-a. Ekspresija CA IX povećana je u stanjima hipoksije, a potiskuje ju divlji tip pVHL-a (29, 52).

Većina tumorskih tkiva nalazi se u hipoksičnim uvjetima pa sukladno tome dolazi i do neravnoteže u pH vrijednostima s pHe vrijednosti od oko 6,5 za razliku od normalnih stanica koje imaju karakterističnu pHe vrijednost oko 7,4 (53). Niska pHe vrijednost povezana je s tumorigenom transformacijom, kromosomskom pregradnjom, razgradnjom izvanstaničnog matriksa, migracijom i invazijom, ekspresijom čimbenika rasta stanica i aktivacijom proteaza. Tumorskim stanicama za rast pogoduju niže pH vrijednosti, za razliku od normalnih stanica za koje je kisela sredina izrazito nepovoljna. Snižene pH vrijednosti uzrokuju prekid u sintezi ATP-a i alternativno spajanje različitih proteina za p53 posredovanu apoptozu kroz aktivaciju kaspaza. Uz to nizak pH pogoduje invazivnom ponašanju stanica raka povećavajući njihovu sposobnost metastaziranja, inducira angiogenezu povišenom ekspresijom faktora rasta vaskularnog endotela (VGEF, eng. *vascular, endothelial growth factor*) u stanicama raka (29).

Kako bi se održali kiseli uvjeti koji pogoduju tumorskim stanicama, hidratacija CO₂ katalizirana je s CA IX na način da CO₂ difundira u izvanstanični prostor. Bikarbonatni ion transportira se u stanicu preko Na⁺/HCO₃⁻ kotransportera (NBC, eng. *sodium/bicarbonate cotransporter*), Na⁺ ovisnog Cl⁻/HCO₃⁻ izmjenjivača (NDCBE, eng. *sodium dependent chloro/bicarbonate exchanger*) i anion izmjenjivačem (AE, eng. *anion exchanger*) obitelji (slika 10.). Enzim CA IX izgrađen je od više proteinskih domena spojenih u jednu cjelinu, gdje N-terminalna regija čini izvanstaničnu domenu, a C-terminalna regija transmembranski dio odgovoran za pričvršćivanje CA IX u staničnu membranu. Izvanstanična domena sadrži signalni peptid, proteoglikansku (PG, eng. *proteoglycan-like domain*) i katalitičku (CA, eng. *catalytic domain*) domenu. Transmembranski dio proteina izgrađen je od hidrofobne uzvijene strukture i C-terminalne domene koja ulazi u citosol u obliku unutarstaničnog repa izgrađenog od 25 aminokiselinskih ostataka. Karakteristična reakcija hidratacije postiže se deprotoniranjem molekule vode koja se nalazi u aktivnom mjestu CA domene. Optimalna vrijednost pH za hidraznu aktivnost CA IX jest 6,5, koja je karakteristična u hipoksičnim solidnim tumorima. Katalitička domena CA IX optimalno radi pri pH oko 7. Pretpostavlja se kako PG domena bogata aminokiselinskim ostacima djeluje kao unutarnji pufer enzima, olakšavajući reakciju

hidratacije CO_2 s kiselim pH vrijednosti, što je jedna od glavnih značajki intratumorske hipoksije (29).



Slika 10.: Mehanizam održavanja staničnog pH (29)

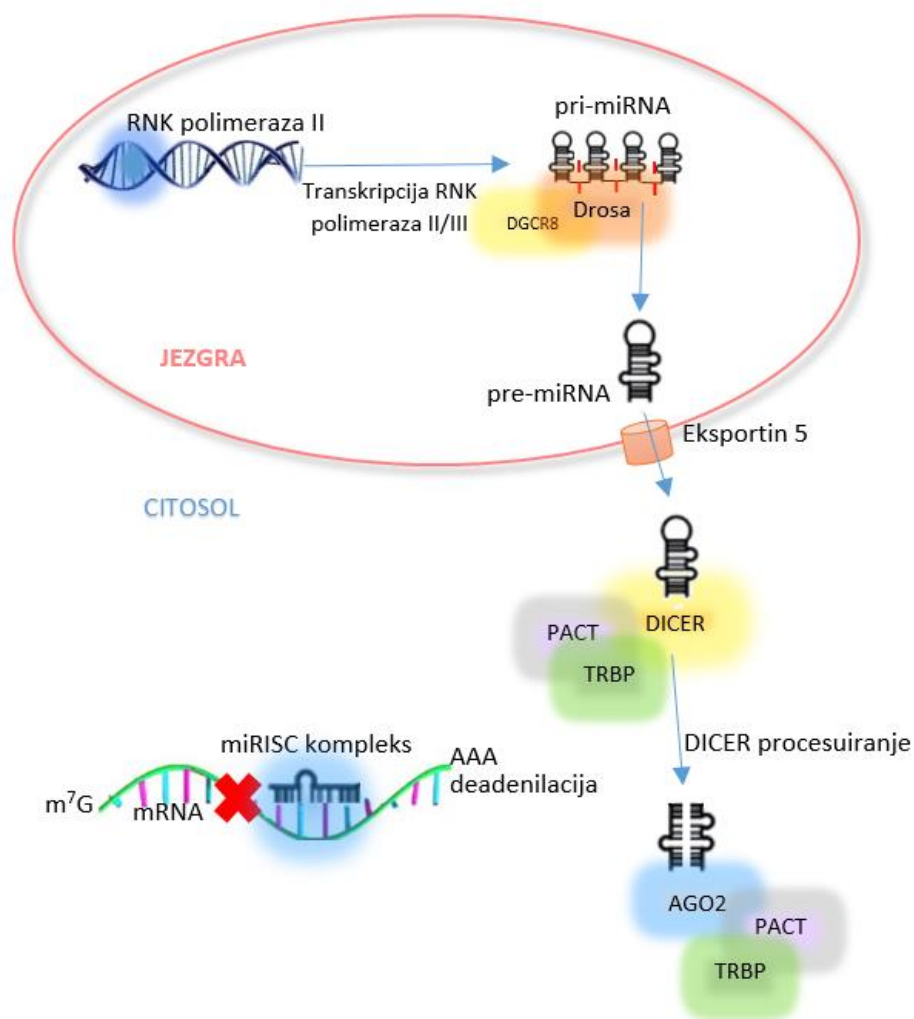
Zbog izuzetno značajne uloge enzima CA IX u tumorskim stanicama istraživanje specifičnih inhibitora ovog enzima ima velik potencijal u novim pristupima terapije tumorskih bolesti. Kao molekule specifično dizajnirane za ciljno djelovanje na CA IX, koristili su se fluorescentni sulfonamidi za vizualizaciju i određivanje uloge CA IX u zakiseljavanju. Pozitivno ili negativno nabijeni spojevi koji zbog svog naboja ne mogu proći plazminu membranu koristili su se za selektivnu inhibiciju izvanstanične ugljične anhidraze, među kojima je i ugljična anhidraza CA IX, dok su supstituirani benzensulfonamidi sa snažnim protutumorskim učinkom korišteni za proučavanje primarnih tumora i metastaza na životinjskim modelima. Raznovrsni kemoterapeutici sintetizirani su od sulfonamida i njihovih bioizostera, kao što je kumarin, koji su pokazali značajnu inhibiciju rasta primarnog tumora i narušavanje metastatskih tvorbi u životinjskim modelima za hipoksične tumore (29, 31, 54, 55).

1.7. MiRNA

MiRNA nekodirajuće su jednolančane RNK molekule izgrađene od ~ 22 nukleotida. Iako se miRNA ne prepisuju u proteine, sudjeluju u postranslacijskoj ekspresiji gena (56, 57). U ljudskom organizmu postoji oko 2000 različitih miRNA koje sudjeluju u reguliranju 30 % svih gena dajući im značajnu ulogu u svim biološkim procesima (58). MiRNA imaju važnu ulogu u razvoju i progresiji tumora ciljajući na tumorske supresore u smjeru promicanja tumorigeneze (onkomir), dok tumor supresor miR-ne djeluju na onkogene u smjeru sprečavanja razvoja tumora (56, 59, 60).

MiRNA kodirajuće gene prepisuje RNK polimeraza II/III stvarajući primarnu miRNA (pri-miRNA, eng. *primary miRNA*). Enzim Drosu unutar jezgre sintetizira prekursore pre-miRNA organizirane u obliku ukosnice veličine do 70 – 80 nukleotida. Pre-miRNA se transportira u citoplazmu, gdje ribonukleaza DICER u suradnji s proteinskim aktivatorom interferon inducirajućom protein kinazom (PACT, eng. *protein activator of the interferon induced protein kinase*) i HIV trans-aktivirajućim odgovorom RNK-vezujućim proteinom-2 (TRBP, eng. HIV transactivating response RNA-binding protein-2) cijepa dvostruku uzvojnici pre-mRNA. MiRNA biva vođena Argonat 2 (AGO2, eng. *argonaute 2*) proteinom do ciljno specifične mRNA sekvence. AGO2 proteini aktiviraju dodatne proteine: glicin(g)-triptofan(w) protein od 182 kDa (GW182, eng. *glycine(g)-tryptophan(w) repeat-containing protein of 182 kDa*), poli(A)vezujući protein (PABP, eng. *poly(A)binding protein*), stanični deadenilatni kompleks CCR4-NOT, poly(A) nukleaza 2 i 3 (PAN2-PAN3, eng. poly(A) nucleases 2 and 3) tvoreći miRNA-inducirajući utišani kompleks (miRISC, eng. *miRNA-induced silencing complex*) (slika 11.) (58, 61, 62).

MiRISC – posredovan gen provodi utišavanje na tri različita načina: (I) Argonaut protein jest RNaza koja katalizira cijepanje ciljne mRNA, vezanjem miRNA na specifičnu sekvencu; (II) GW182 inhibira inicijacijsku translaciju sprečavajući stvaranje ribosomalnog kompleksa; miRISC također može blokirati translaciju u post-inicijacijskom koraku ometanjem ribosomalnog produljivanja; (III) CCR4-NOT i PAN2-PAN3 olakšavaju deadenilaciju poli(A) repa (AAA). Degradaciju mRNA završava egzonukleaza nakon čega slijedi uklanjanje 5-terminacijske kape (m⁷G) (58).



Slika 11.: Mehanizam djelovanja miRNA (58)

1.7.1. MiR-21

MikroRNA 21 (miR-21) jedna je od prvih humanih miRNA genoma koja je detaljno proučavana. Gen koji kodira pri-miR-21 nalazi se na 17. kromosomu u intronskoj regiji *TMEM49* gena (63). MiR-21 jedna je od najčešće povišeno reguliranih miRNA u mnogim tumorima uključujući rak dojke, želuca debelog crijeva, pluća, gušterače i jajnika. Može pospješiti staničnu proliferaciju i smanjiti apoptozu te tako povećati pojavnost tumora. Kao prognostički biomarker povišena razina miR-21 povezuje se s lošom prognozom u mnogim tumorima (56). Antiapoptotska funkcija miR-21 temelji se na aktiviranju proapoptotskih gena uključujući proteine programirane stanične smrti 4 (PDCD4, eng. *programed cell death protein 4*), PTEN, tropomiozin 1 (63). Vjeruje se kako miR-21 ima važnu ulogu u preživljenju tumorskih

stanica u hipoksični/anoksičnom mikrookolišu, sprečavajući hipoksijom induciranu apoptozu inhibirajući PDCD4 (64, 65).

1.7.2. MiR-34

Obitelj miR-34 sastoji se od miR-34a koja je smještena na 1p36 kromosomu, dok se miR-34b/c nalazi na 11q23 kromosomu. Na mišjem modelu miR-34a izražena je u svim tkivima, dok su miR-34b/c dominantno izraženi u plućima i testisima (66). Ekspresija miR-34a ovisi o vrsti tumora. U skladu s tim, smanjena izraženost miR-34a uočena je kod karcinoma gušterače, debelog crijeva i pluća (67). MiR-34(a) izravna je meta tumor-supresorskog gena *p53* te pri povišenoj ekspresiji uzrokuje apoptozu, zastoj staničnog ciklusa i senescenciju (66, 68). MiR-34 djeluje na ciklin D1, ciklin E2, Cdk4, c-Met, c-Myc, BCL-2, Snail i Sirt1 (69).

1.7.3. MiR-210

Mir-210 je HIF1 α ovisna molekula koja sudjeluje u regulaciji mitohondrijskog metabolizma, angiogenezi, DNK popravku i preživljenju stanica. MiR-210 može se ponašati kao tumor supresor ili kao onkogen, ovisno o opsegu i trajanju hipoksičnih uvjeta u stanici. Kao tumor supresor miR-210 djeluje u cilju regulacije stanične proliferacije preko E3F3, FGFR1, PTPN2 i apoptoze preko BCL-2. Onkogeno djelovanje miR-210 u vezi sa staničnom proliferacijom vrši se ciljnim djelovanjem na MNT i E2F3, dok se regulacija apoptoze provodi preko Casp8ap8 i PTBP3/ROD1 (70 – 72).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada odrediti je mehanizam inhibicije staničnog rasta djelovanjem *N*-9-sulfonilpurinskih derivata na panelu humanih tumorskih stanica i normalnim staničnim linijama. U skladu s tim postavljeni su sljedeći ciljevi u istraživanju:

1. Odrediti inhibicijski učinak 16 novosintetiziranih *N*-9-sulfonilpurina (SPD1-16) na različite humane tumorske stanice i normalne stanice *in vitro*.
2. Odrediti postoji li razlika u inhibicijskom učinku između stanica karcinoma i stanica leukemija.
3. Usporediti citotoksičan učinak odabranih novosintetiziranih spojeva u 2D kulturi i 3D kulturi stanica karcinoma.
4. Odrediti učinak odabranih *N*-9-sulfonilpurina na stanični ciklus.
5. Ispitati promicanje apoptoze odabranih novosintetiziranih derivata narušavanjem mitohondrijskog potencijala i aktivacijom kaspaza.
6. Ispitati kako utječu odabrani novosintetizirani derivati na Akt, CA IX i p53 signalne putove.
7. Istražiti učinak odabranih derivata na ekspresiju miR-21, miR-34 i miR-210 u leukemijskim stanicama i stanicama karcinoma.

3. HIPOTEZA

Polazna je hipoteza da *N*-9-sulfonilpurini djeluju inhibicijski na rast tumorskih stanica s minimalnim učinkom na normalne stanice. Očekuje se veća osjetljivost leukemijskih stanica i limfoma na djelovanje *N*-9-sulfonilpurinskih derivata u odnosu na stanice karcinoma u 3D i 2D kulturi stanica. Pretpostavka je da spojevi uzrokuju promjene u staničnom ciklusu i narušavaju mitohondrijski potencijal u smjeru aktivacije kaspazno neovisne apoptoze dovodeći stanicu u programiranu smrt. Dodatni mehanizam djelovanja koji se pretpostavlja specifični je inhibicijski utjecaj na Akt, CA IX i p53 signalne putove, te promjene u ekspresiji miR-21, miR-34 i miR-210.

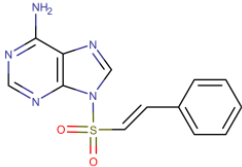
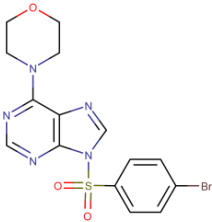
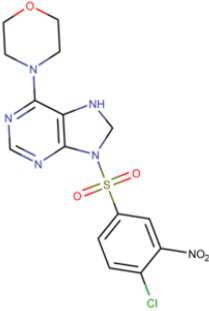
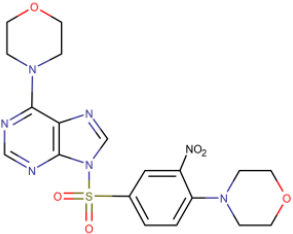
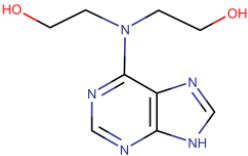
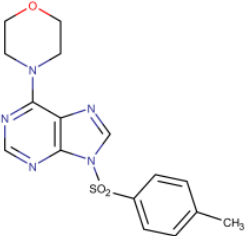
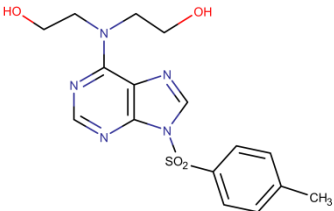
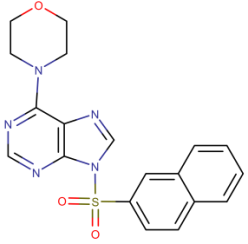
4. MATERIJALI I METODE

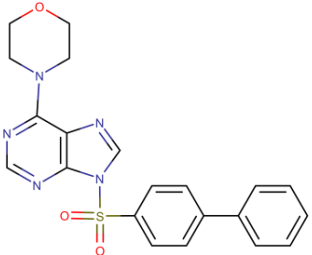
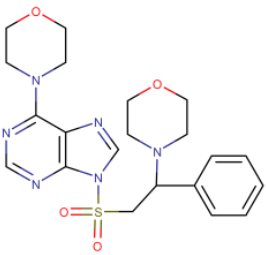
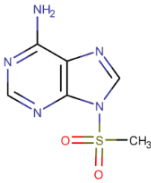
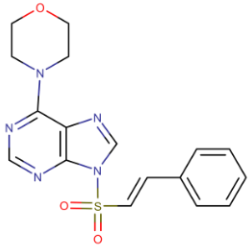
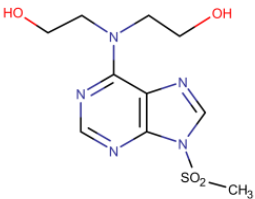
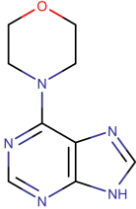
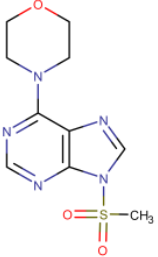
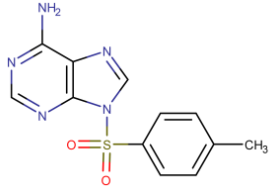
4.1. Korištene kemikalije

Za izvođenje eksperimentalnog dijela doktorske disertacije korištene su kemikalije i reagensi različitih proizvođača: Dulbecco modificirani Eagleov medij (DMEM, Lonza, Basel, Switzerland), Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640, Lonza, Basel, Switzerland), fetalni goveđi serum (FBS, GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), 0,25 % tripsin EDTA (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), Na-piruvat (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), penicilin/streptomycin 100 x (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), Tripansko plavilo 0,4 % (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), MTT - (4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), L-glutamin 200 mM (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), HEPES - 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), SDS - natrij dodecil sulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), DMSO - dimetil sulfoksid (Acros Organics, New Jersey, SAD), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Fosfatni pufer (PBS, eng. Phosphate Buffered Saline) pripremljen je od 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4, doksorubicin (Invitrogene, Paisley, Velika Britanija), SDS (Invitrogene, Paisley, Velika Britanija), Tris i NaCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska), Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD), glicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), MEt-OH (New Jersey, SAD), Tween20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), nemasno mlijeko u prahu (Kalifornija, SAD), 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), goveđi serumski albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD).

4.2. Ispitivani spojevi

Novi spojevi prikazani na slici 12. sintetizirani su i analizirani u Laboratoriju za supramolekularnu i nukleozidnu kemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Spojevi su pripremljeni otapanjem u DMSO-u, u koncentraciji od 10^{-2} M (mol/L). Neposredno prije upotrebe spojevi su razrijeđeni u sterilnoj vodi ili mediju do željene koncentracije.

			
<p>SPD1 : (E)-9-(stirilsulfonyl)-9H-purin-6-amin</p>	<p>SPD2: 9-(4-bromfenilsulfonyl)-6-morfolino-9H-purin</p>	<p>SPD3: 9-(4-klor-3-nitrofenilsulfonyl)-6-morfolino-9H-purin</p>	<p>SPD4: 6-morfolino-9-(4-morfolino-3-nitrofenilsulfonyl)-9H-purin</p>
			
<p>SPD5: 6-[N,N-bis(2-hidroksietil)amino]-purin</p>	<p>SP6: S6-morfolino-9-tosil-9H-purin</p>	<p>SPD7: 6-[N,N-bis(2-hidroksietil)amino]-9-tosil-9H-purin</p>	<p>SPD8: 6-morfolino-9-(naftalen-2-ilsulfonyl)-9H-purin</p>

			
<p>SPD9: 6-morfolino-9-(4-fenilbenzensulfonil)-9H-purin</p>	<p>SPD10: 6-morfolino-9-(2-morfolino-2-feniletilsulfonil)-9H-purin</p>	<p>SPD11: 9-(metilsulfonil)-9H-purin-6-amin</p>	<p>SPD12: (E)-6-morfolino-9-(stirilsulfonil)-9H-purin</p>
			
<p>SPD13: 9-(metilsulfonil)-6-[N,N-bis(2-hidroksietil)amino]-9H-purin</p>	<p>SPD14: 6-morfolino-9H-purin</p>	<p>SPD15: 9-(metilsulfonil)-6-morfolino-9H-purin</p>	<p>SPD16: 9-tosil-9H-purin-6-amin</p>

Slika 12.: Strukturne formule N-9-sulfonilpurinskih derivata

4.3. Stanične linije

Učinci SPD1-16 istraženi su na panelu humanih tumorskih i normalnih staničnih linija.

Normalne stanične linije:

BJ – humani fibroblasti

MDCK1 – epitelne stanice bubrega psa

Stanične linije karcinoma:

HeLa – adenokarcinom vrata maternice

CaCo-2 – karcinom debelog crijeva

NCI-H358 – bronhioalveolarni karcinom

Stanične linije leukemija i limfoma:

K562 – kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi

JURKAT – leukemija T-stanica

THP-1 – akutna monocitna leukemija

MOLT-4 – akutna limfoblastična leukemija

CCR-CEM – akutna limfoblastična leukemija

Raji – Burkittov limfom

HuT-78 – limfom T-stanica

Suglasnost etičkog povjerenstva nije potrebna jer su stanične linije dostupne na tržištu.

4.4. Uzgoj i održavanje kulture stanica *in vitro*

Adherentne stanice

Stanice BJ, MDCK1, HeLa i CaCo-2 uzgajaju se u DMEM mediju obogaćenom s 10 % temperaturom inaktiviranim FBS-om, 2 mM glutaminom i 100 U/0,1 mg penicilinom/streptomycinom.

NCI-358 stanična linija uzgajana je u RPMI mediju s 10 % FBS-om, 2 mM glutaminom, 1 mM natrijevim piruvatom, 10 mM HEPES-om. Stanice se inkubiraju u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pri 37 °C / 5 % CO₂ uz visoku vlažnost.

Stanice u suspenziji

Stanice K562, JURKAT, THP-1, MOLT-4, CCRF-CEM, Raji i Hut-78 kultivirane su u RPMI 1640 mediju s 10 % FBS-om, 2 mM glutaminom, 1 mM natrijevim piruvatom, 10 mM HEPES-om. Subkultivirane su svakih 48 h sa svježim medijem u CO₂ inkubatoru na 37 °C / 5 % CO₂ s visokom vlagom.

4.5. 3D kultura stanica

Stanice uzgojene u monosloju (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358) odvojene su od podloge pomoću Tripsina i resuspendirane u odgovarajućem mediju za uzgoj stanica. Stanice su nasađene u koncentraciji od 1×10^4 stanica/ml na ploču s 96 jažica slabo prijanjajućeg konusnog dna. Ploča sa stanicama centrifugirana je 10 min, na sobnoj temperaturi pri 1000 rpm. Stanični sferoidi formirani su u CO₂ inkubatoru tijekom 72 h pri 37 °C. Po isteku vremena stanični sferoidi izloženi su tretmanu odabranih supstanci. Tretirani stanični sferoidi koristili su se dalje u određivanju antiproliferativne aktivnosti MTT testom, aktivnosti kaspaze 3 i CA IX, genske ekspresije RT-PCR-om kao i detekcije proteina Western blot metodom.

4.6. Procjena učinka spojeva na staničnu proliferaciju MTT testom

Kolorimetrijskim MTT testom mjeri se aktivnost grupe enzima dehidrogenaza u živim stanicama. Mitohondrijska dehidrogenaza cijepa žuti MTT-tetrazolni prsten (dimetiltiazol difenil tetrazol bromid) u crveno-ljubičasti formazan. Formazanski precipitat otapa se u DMSO-u ili 10 % SDS-u u HCL-u (0,01 M). Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je broju živih stanica pri valnim duljinama od 595 nm.

Adherentne stanice

Stanice su nasadene na ploču s 96 jažica ravnog dna (Greiner, Frickenhausen, Austria) u koncentraciji od 2×10^4 stanica/ml. Broj živih stanica određen je bojenjem stanica tripan plavilom prije svakog testa. Stanice su inkubirane na 37 °C kroz 24 sata u CO₂ inkubatoru. Prvi dan testa stanice su tretirane sa SPD1-16 u finalnom koncentracijskom rasponu od 1×10^{-4} do 1×10^{-7} M. Po završetku vremena inkubacije od 24, 48 ili 72 sata, medij je uklonjen sa stanica i na stanice je dodano 5 mg/ml MTT otopine. Nakon inkubacije od 4 sata na 37 °C MTT-formazan kristalići otopljeni su u DMSO-u. Intenzitet nastalog obojenja izmjeren je na ELISA čitaču mikroploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) na 595 nm. Svi eksperimenti izvedeni su tri puta u triplikatu.

Stanice u suspenziji

Stanice su nasadene na ploču s 96 jažica ravnog dna (Sarsted, Newton, USA) u koncentraciji od 1×10^5 stanica/ml. Broj živih stanica prije svakog testa određen je bojenjem stanica Tripan plavilom. Stanice su tretirane sa SPD1-16 isti dan u finalnom koncentracijskom rasponu od 1×10^{-4} do 1×10^{-7} M. Nakon završene inkubacije od 24, 48 ili 72 sata na stanice se dodaje 5 mg/ml MTT i inkubira kroz 4 sata. Formirani MTT-formazan kristalići otapaju se u 10 % SDS-a s 0,01 mol/L HCl preko noći u CO₂ inkubatoru. ELISA čitač mikroploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) koristi se za mjerenje apsorbance na 595 nm. Svi pokusi izvedeni su tri puta u triplikatu.

Postotak stanične proliferacije određuje se prema formuli:

$$\% = \frac{A_{uzorka} - A_{slijepa\ proba}}{A_{kontrola} - A_{slijepa\ proba}} \times 100$$

Slijepa proba kod adherentnih stanica jest MTT i DMSO; Slijepa je proba kod stanica u suspenziji medij, MTT i 10 % SDS u 0,01 M HCl.

4.7. Laktat dehidrogenaza (LDH) test

Laktat dehidrogenaza (LDH) stabilni je citoplazmatski enzim koji služi za kolorimetrijsku procjenu integriteta plazmine membrane kao pokazatelja citotoksičnosti neke tvari. Oštećena plazmina membrana otpušta LDH u medij za uzgoj stanica. Izvanstanični LDH kvantificira se enzimskom reakcijom u kojoj LDH katalizira pretvorbu laktata u piruvat gdje se NAD^+ reducira u NADH. Enzim diaforaza dalje koristi koenzim NADH za redukciju tetrazolnih soli INT (2-(4-jodfenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazoli) u crveno obojeni produkt formazan čija se apsorbanacija mjeri na 490 nm. Intenzitet nastalog crvenog obojenja direktno je proporcionalan koncentraciji LDH u mediju što ukazuje na postotak citotoksičnosti.

HeLa stanice nasađene su na ploču s 96 jažica u koncentraciji od 2×10^4 stanica/ml u DMEM mediju obogaćenim s 1 % FBS-om i 2 mM glutaminom. HeLa stanice inkubirane su na 37 °C kroz 24 sata u CO_2 inkubatoru. K562 i Raji stanice nasađene su u koncentraciji od 1×10^5 stanica/ml u RPMI mediju obogaćenim s 1 % FBS-om, 2 mM glutaminom, 1 mM natrijevim piruvatom, 10 mM HEPES-om. Stanice su tretirane sa SPD1 i SPD12 u konačnim koncentracijama od 5×10^{-6} M za K562 i Raji stanice, i u koncentraciji 1×10^{-5} M za HeLa stanice. Po isteku vremena inkubacije (3, 6, 10 i 24 sata) ploče s uzorcima centrifugirane su na 250 x g, 10 minuta pri 24 °C. Sa stanica je prikupljen supernatant u sterilne tubice koji se čuvao na +4 °C do trenutka analize. Na dan analize 100 μl supernatanta preneseno je na ploču s 96 jažica i inkubirano kroz 4 sata u CO_2 inkubatoru sa 100 μl otopine C koja je pripremljena miješanjem otopine A (katalizator diaforeza/ NAD^+) i otopine B (INT boja) prema uputama proizvođača (LDH Cytotoxicity Detection Kit, TAKARA BIO INC.). Po završetku inkubacije apsorbanca je izmjerena na čitaču mikroploča Viktor 3V 1420 (Perking Elmer) na 490 nm. Svi pokusi izvedeni su u triplikatu.

Postotak citotoksičnosti određuje se prema formuli:

$$\% \text{ citotoksičnost} = \frac{A_{\text{uzorka}} - A_{\text{niska kontrola}}}{A_{\text{visoka kontrola}} - A_{\text{niska kontrola}}} \times 100$$

Kontrolne stanice uzgajane su sa svježim medijem te se stanice kao takve koriste za nisku LDH aktivnost. Za visoku LDH aktivnost stanice su tretirane s 1 % Triton X.

4.8. Stanični ciklus

Mjerenje sadržaja DNK u stanici temelji se na bojenju svake stanice fluorescentnom propidi jodid (PI) bojom koja se veže na DNK dajući točnu količinu prisutne DNK. Intenzitet fluorescencije daje omjer stanice koje su u jednoj od faza staničnog ciklusa (S, G₁, G₂ i M) pomoću protočnog citometra. Stanice koje su u G₀/G₁ fazi imaju normalan sadržaj DNK, u G₂ i M fazi stanica sadrži dvostruku količinu DNK, dok se tijekom S faze količina DNK nalazi između normalne i udvostručene količine DNK. Kako se PI veže na dvolančane nukleinske kiseline, prije bojenja stanice je potrebno inkubirati s RNazom kako bi se razgradile dvolančane RNK. Zbog nemogućnosti ulaska PI u žive stanice, stanice se fiksiraju u etanolu. Fluorescencija PI crvena je koja se pobuđuje na 488 nm.

Stanice su nasađene na ploče sa 6 jažica u koncentraciji od 5×10^5 stanica/jažici za K562 i 3×10^5 stanica/jažici za HeLa stanice. Stanice su tretirane sa SPD1 i SPD12 u finalnim koncentracijama od 5×10^{-6} M za K562 i Raji stanice te 1×10^{-5} M za HeLa stanice tijekom 24 sata. Po isteku vremena stanice su zajedno s uzgajanim medijem pokupljene u epruvete od 15 ml. HeLa stanice prethodno su bile tripsinizirane kako bi se odlijepile od podloge. Stanice su centrifugirane na 3000 rpm, kroz 5 min kako bi se spustile na dno. Sa stanica je uklonjen supernatant i stanice su resuspendirane u 200 μ L PBS-a. Na stanice se uz stalno miješanje dodaje 3 ml hladnog 70 % etanola. Fiksirane stanice bile su pohranjene u hladnjaku na -20 °C do trenutka analize. Na dan analize stanice su centrifugirane i ispirane s 1 ml PBS-a. Sa stanica je uklonjen supernatant, a stanice su resuspendirane u 350 μ L PBS-a. Na stanice je dodano RNaze A u finalnoj koncentraciji od 0,2 μ g/ μ L, te su se stanice inkubirale 5 min na RT. Stanice su obojene sa 150 μ L PI u finalnoj koncentraciji od 15 μ g/ml kroz 30 min pri RT. Nakon bojenja stanice su prebačene u epruvete za protočni citometar i analizirane su na protočnom citometru (FascCanto II, BD Bioscience) korištenjem *Flowlogic softwarea* (Imviva Technologies).

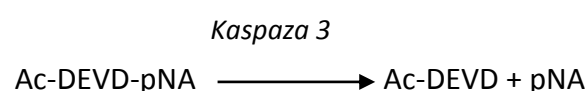
4.9. Apoptoza

Annexin V-FITC i propidi jodid (PI) fluorescentne su boje koje se koriste za određivanje apoptoze na protočnom citometru. Annexin V-FITC veže se za fosfatidil-serin (PS) koji se normalno nalazi samo s unutarnje strane membrane dajući zeleni signal. Prva promjena u apoptotičnim stanicama okretanje je PS prema van. PI ulazi samo u nekrotične stanice i veže se za DNK dajući crveni signal. Ekscitacijski/emisijski je signal za Annexin V-FITC na 488/530 nm, a za PI je na 535/617 nm.

Nasađene HeLa stanice u koncentraciji od 3×10^5 stanica/jažici na ploče sa 6 jažica ostavljene su preko noći u CO₂ inkubatoru. K562 i Raji stanice nasađene su u koncentraciji od 5×10^5 stanica/jažici te isti dan tretirane. Stanice su tretirane sa SPD1 i SPD12 u finalnim koncentracijama od 5×10^{-6} M za K562 i Raji stanice te 1×10^{-5} M za HeLa stanice, kroz period od 24 sata. Paralelno su stanice inkubirane s doxorubicinom kao pozitivnom kontrolom u finalnoj koncentraciji za HeLa stanice od 3×10^{-6} M i 1×10^{-7} M za K562 i Raji stanice. Po isteku vremena stanice su zajedno s uzgajanim medijem pokupljene u epruvete od 15 ml. HeLa stanice prethodno su bile tripsinizirane kako bi se odlijepile od podloge. Stanice su centrifugirane na 3000 rpm, kroz 5 min kako bi se spustile na dno. Stanice su resuspendirane u 500 µl 1 x puferu iz kita *Annexin V-FITC apoptosis detection kit* (abcam, UK, EU), te je dodano 5 µl Annexin V-FITC i 5 µl PI. Analiza stanica obavljena je na protočnom citometru (FascCanto II, BD Bioscience) korištenjem *Flowlogic softwarea* (Imviva Technologies).

4.10. Određivanje katalitičke aktivnosti kaspaze 3

Kolorimetrijskom metodom određena je aktivnost enzima kaspaza 3, koja se temelji na hidrolizi peptidnog supstrata acetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilin (Ac-DEVD-pNA) kaspazom 3, rezultirajući otpuštanjem žuto obojenog p-nitroanilinskog (pNA) ostatka. Intenzitet nastalog obojenja pNA-om proporcionalan je aktivnosti enzima kaspaze 3, a očitava se apsorbancu pNA pri 405 nm. Koncentracija oslobođenog pNA izračunava se preko kalibracijske krivulje pripremljene s definiranom pNA otopinom.



Stanice su nasađene na ploče sa 6 jažica u koncentraciji od $1,7 \times 10^5$ stanica/ml (K562 i Raji stanice), 1×10^5 stanica/ml za 2D kulturu stanica i 1×10^4 stanica/ml za 3D kulturu stanica. HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 stanice uzgajane su u 2D i 3D kulturi stanica. Stanice su tretirane sa SPD1 i SPD12 u finalnim koncentracijama od 5×10^{-6} M za K562 i Raji stanice, odnosno 1×10^{-5} M za HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 stanice. Nakon inkubacije od 24 sata stanice su pokupljene zajedno s medijem u kojemu su uzgajane, centrifugirane na 600 g, 4 min pri 4 °C. Po završetku testa nakon 24 sata adherentne stanice tripsinom su odlijepljene od podloge i prenesene u sterilnu tubicu zajedno s medijem u kojem su uzgajane. Stanični sferoidi i stanice u suspenziji prenesene su u sterilnu tubicu zajedno s medijem u kojemu su kultivirane. Centrifugiranjem (600 x g, 5 min pri 4 °C) sa stanica je uklonjen medij i stanice su dodatno isprane u PBS-u. Na stanice se dodaje 1 x pufer za lizu stanica iz kita i stanice se inkubiraju 15 – 20 minuta na ledu. Po isteku vremena inkubacije stanice se centrifugiraju pri 16 000 x g, 10 – 15 min, na 4 °C. Centrifugirani supernatant-stanični lizat koristio se za daljnju analizu prema uputama proizvođača (Caspasa 3 Assay Kit, Colorimetric, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Reakcijska smjesa sastojala se od reakcijskog pufera, staničnog lizata i Ac-DEVD-pNA supstrata. Pozitivna i negativna kontrola za kaspazu 3 dolaze zajedno s kitom. Ploča s reakcijskim otopinama inkubirana je 70 min u CO₂ inkubatoru pri 37 °C. Po isteku vremena inkubacije apsorbancija je izmjerena na optičkom čitaču mikroploča (Viktor 3V 1420, Perking Elmer) na valnoj duljini 405 nm.

4.11. Određivanje promjena mitohondrijskog potencijala

Boja JC-1 (tetraetilbenzimidazolilkarbocianin jodid) koristi se za određivanje promjene potencijala mitohondrijske membrane. Mitohondrijska membrana pod naponom nakuplja kationsku JC-1 boju. Kod sniženih koncentracija (zbog niskog potencijala mitohondrijske membrane) JC-1 pretežno je u monomernom stanju koji daje zelenu fluorescenciju s emisijom od 530 ± 15 nm. Pri visokim koncentracijama (zbog visokog potencijala mitohondrijske membrane) stvaraju se nakupine boje dajući crveno-narančastu fluorescenciju s emisijom od $590 \pm 17,5$ nm. Smanjenje ukupne fluorescencije indicira na depolariziranu mitohondrijsku membranu, dok je kod povišene fluorescencije hiperpolarizirana mitohondrijska membrana.

Stanice su nasađene na ploče sa 6 jažica u koncentraciji od 5×10^5 stanica/jažici za K562 i Raji te 3×10^5 stanica/jažici za HeLa stanice. Sljedećeg dana stanice su tretirane sa SPD1 i SPD12

u finalnim koncentracijama od 5×10^{-6} M za K562 i Raji, odnosno 1×10^{-5} M za HeLa stanice. Nakon 24 sata inkubacije stanice su pokupljene zajedno s medijem u kojemu su uzgajane, centrifugirane na 600 g, 4 min pri 4 °C. Sa stanica je uklonjen supernatant i na stanice je dodan 1 ml kompletiranog medija. Na resuspendirane stanice u mediju dodaje se 1 ml JC-1 otopine za bojenje koja je pripremljena prema uputama proizvođača (Mitochondria staining kit for mitochondrial potential changes detection, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Stanice s JC-1 bojom inkubirane su 20 minuta u CO₂ inkubatoru. Po završetku inkubacije sa stanica je uklonjena JC-1 boja centrifugiranjem na 600 x g, 4 min pri 4 °C. Hladnim JC-1 puferom stanice su isprane i resuspendirane u volumenu od 1 ml. Analiza stanica obavljena je na protočnom citometru korištenjem *Flowlogic softwarea*.

4.12. Određivanje unutarstaničnih slobodnih kisikovih radikala (ROS)

Stanice HeLa, K562 i Raji resuspendirane su u koncentraciji od 5×10^5 stanica/ml u PBS-u. Testne stanice inkubirane su 1 sat u inkubatoru pri 37 °C / 5 % CO₂ sa SPD1 i SPD12 derivatima u koncentraciji od 1×10^{-5} M (HeLa stanice) i 5×10^{-6} M (K562 i Raji stanice). Po isteku vremena inkubacije na stanice je dodan reagens za detekciju ROS-ova prema uputama proizvođača iz kita *Fluorometric Intracellular Ros Kit* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) te se stanice naknadno inkubiraju 30 minuta u inkubatoru pri 37 °C / 5 % CO₂. Analiza stanica obavljena je na protočnom citometru (FascCanto II, BD Bioscience) korištenjem *Flowlogic softwarea* (Imviva Technologies).

4.13. Određivanje katalitičke aktivnosti CA IX

Katalitička aktivnost humane CA IX određena je ELISA enzimsko-imunokemijskom metodom koja se temelji na specifičnom prepoznavanju antigena i antitijela iz staničnog supernatanta. Stanice su nasađene na ploču s 96 jažica u koncentraciji od 1×10^5 st/ml za HeLa stanice uzgojene u 2D kulturi, 1×10^4 st/ml za HeLa stanice uzgojene u 3D kulturi i 3×10^5 st/ml za K562 stanice. HeLa stanice inkubirane su na 37 °C kroz 24 sata u CO₂ inkubatoru, a zatim izložene ispitivanim spojevima. Stanice su tretirane sa SPD1 i SPD12 derivatima kroz 24 sata u koncentraciji od 1×10^{-5} M za HeLa stanice u 2D i 3D kulturi te 5×10^{-6} M za K562 stanice. Po

isteku zadanog vremena inkubacije sa stanica je prikupljen medij te centrifugiran 6 min pri 1100 rpm. Daljnja analiza medija provedena je prema uputama proizvođača (Human Carbonic Anhydrase IX ELISA kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

4.14. Kvantifikacija ekspresije gena u stvarnom vremenu

Stanice su nasađene u bočice za uzgoj stanica u koncentraciji od 5×10^6 stanica za K562 stanice i 1×10^6 stanica za HeLa 2D kulturu stanica; 3D kultura HeLa stanica nasađena je na ploču sa 96 jažica u koncentraciji od 1×10^4 stanica/ml. Stanice su tretirane sa SPD1 i SPD12 u finalnim koncentracijama od 2×10^{-6} M za K562 stanice, odnosno 5×10^{-6} M za HeLa stanice. Nakon inkubacije od 24 sata stanice su pokupljene zajedno s medijem u kojemu su uzgajane, centrifugirane na $600 \times g$, 4 min pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Stanični sferoidi prikupljeni su iz 96 jažica za RNK izolaciju. Na stanice je dodan pufer za lizu stanica i daljnja izolacija RNK pripremljena je prema uputama proizvođača (RNeasy Mini kit, Qiagen). Izolirana RNK iz stanica dalje se koristila za analizu ekspresije gena PCR metodom u stvarnom vremenu. Izolirana RNK dalje se koristila za RT-PCR kvantifikaciju i ekspresiju mikroRNA.

Ukupna RNK prepisana je korištenjem kita *PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit* (TAKKARA BIO INC) koristeći nasumične početnice. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu napravljena je na *QuantStudio5* (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) uređaju upotrebom kemikalija iz kita *GoTaq® Flexi DNA Polymerase Protocol* (Promega) na bazi fluorescentne boje i specifičnih početnica za gene *p53*, *kaspazu 3*, *citokrom C*, *Akt*, i *CA IX*, te kao kontrolni gen *GAPDH* (tablica 1.).

Tablica 1. Sljedovi početnica korištenih u kvantitativnom RT-PCR eksperimentu. Oznaka F označava „forward“, odnosno $5' \rightarrow 3'$ smjer sekvence gena, dok je R „revers“, odnosno $3' \rightarrow 5'$ smjer sekvence gena.

Naziv početnice	Nukleotidni slijed	Referenca
GAPDH (F)	5`-CCA TCA ATG ACC CCT TCA TTG ACC-3`	(73)
GAPDH (R)	5`-GAA GGC CAT GCC AGT GAG CTT CC-3`	(73)
p53 (F)	5`-GAT GCT GTC CGC GGA CGA TAT-3`	(73)
p53 (R)	5`-CGT GCA AGT CAC AGA CTT GGC-3`	(73)

Kaspaza 3 (F)	5`-TCG GTC TGG TAC AGA TGT CG-3`	(73)
Kaspaza 3 (R)	5`-CAT ACA AGA AGT CGG CCT CC-3`	(73)
Citokrokrom C (F)	5`-AGA ACA AAG GCA TCA TCT GGG-3`	NBCI/primer-BLAST
Citokrokrom C (R)	5`-TCA GCT GTA GCC GAG AGT CA-3`	NBCI/primer-BLAST
Akt1 (F)	5`-CTT CCT CAC AGC CCT GAA GT-3`	NBCI/primer-BLAST
Akt1 (R)	5`-TAA TGT GCC CGT CCT TGT CC-3`	NBCI/primer-BLAST
CA IX (F)	5`-TGA GGA AGG CTC AGA GAC TCA-3`	NBCI/primer-BLAST
CA IX (R)	5`-TCA GCT GTA GCC GAG AGT CA-3`	NBCI/primer-BLAST

Specifični odsječci umnoženi su u volumenu od 20 µl PCR reakcijske smjese (0,2 mM dNTP, 3mM MgCl₂, 1,25 U Taq polimeraza i 1X Sybre Green boja), sa 0,5 µM specifičnih početnica i 1µl cDNA kalupa. Početna denaturacija odvijala se 2,5 minuta na 95 °C, a denaturacija u svakom ciklusu na 95 °C trajala je 30 sekundi. Vežanje početnica u svakom ciklusu trajalo je 1,5 minuta s time da je korištena odgovarajuća temperatura vežanja za svaki par početnica (*GAPDH* – 68 °C, *p53* – 61 °C, *kaspaza 3*, *citokrom C*, *Akt* i *CA IX* – 57 °C). Elongacija na 72 °C trajala je 1 minutu u svakom ciklusu. Sve rađene PCR reakcije imale su 40 ciklusa.

4.15. Ekspresija mikroRNA

Ukupna RNK prepisana je korištenjem kita *TaqMan Advanced miRNA cDNA synthesis Kit* prema uputama proizvođača. Lančana reakcija polimeraze napravljena je na *QuantStudio5* uređaju (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) TaqMan metodom sa specifično dizajniranim probama koje su navedene u tablici 2.

Tablica 2. Osnovne specifikacije korištenih TaqMan proba.

Vrsta miRNA	TaqMan probe	Validacija
Kontrolna	hsa-miR-25-3p	(74)
Kontrolna	hsa-miR-93-5p	(74)
Ciljna	hsa-miR-21-5p	miRTarBase
Ciljna	hsa-miR-34a-5p	miRTarBase
Ciljna	hsa-miR-210-3	miRTarBase

4.16. Western blot analiza proteina

Analiza prisutnih pojedinih proteina u ukupno izoliranim proteinima iz tretiranih stanica utvrđena je Western blot metodom. Metoda se temelji na specifičnom prepoznavanju i ostvarivanju kompleksa između antigena vezanog za membranu i protutijela. Primarno protutijelo visoko je specifično za traženi protein na koji se veže. Položaj traženog proteina na membrani određuje se vezanjem sekundarnog protutijela obilježenog enzimom na primarno protutijelo. Sekundarno protutijelo obilježeno peroksidazom iz hrena pogodno je za kolorimetrijsku ili kemiluminiscencijsku reakciju. Dodavanjem kromogenog supstrata za enzim dolazi do stvaranja obojenog produkta na mjestu vezanja protutijela. Dodavanjem kemiluminiscencijskog supstrata dolazi do stvaranja signala u obliku tamne pruge na filmu za autoradiografiju.

4.16.1. Izolacija proteina

Stanice su nasade u bočice za uzgoj stanica u koncentraciji od 5×10^6 stanica (K562 i Raji stanice) i 1×10^6 stanica za 2D kulturu stanica; 3D kultura stanica nasadena je na ploču sa 96 jažica u koncentraciji od 1×10^4 stanica/ml. HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 stanice uzgajane su u 2D i 3D kulturi stanica. Stanice su tretirane sa SPD1 i SPD12 u finalnim koncentracijama od 2×10^{-6} M za K562 i Raji stanice, odnosno 5×10^{-6} M za HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 stanice. Nakon inkubacije od 24 sata stanice su pokupljene zajedno s medijem u kojemu su uzgajane, centrifugirane na 600 g, 4 min pri 4 °C. Stanični sferoidi prikupljeni su iz 96 jažica za izolaciju proteina. Sa stanica je uklonjen supernatant i stanice su dodatno isprane u PBS-u. Na stanice je dodan pufer za lizu (50 mM Tris pH = 7, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA i 1 % SDS) i PMSF kao inhibitor proteaza u finalnoj koncentraciji od 2 mg/ml. Stanice su lizirane kroz 1 sat na ledu. Po isteku vremena inkubacije stanice su centrifugirane na 16 000 rpm, 15 min pri 4 °C. Proteinski lizat alikvotiran je i spremljen na -80 °C do trenutka analize.

4.16.2. Natrij dodecil sulfat poliakrilamidna elektroforeza (SDS-PAGE)

Proteinski lizat stanica pomiješan je s *Laemmli* puferom za nanošenje uzoraka (50 mM Tris pH 6,5, 10 % glicerol, 0,5 mg/ml bromfenol plavila, 1 % β -merkaptoetanol i 2 % SDS) u omjeru 1 : 3. Uzorci su grijani 10 min pri 70 °C nakon čega su ukupni stanični proteini nanoseni na SDS poliakrilamidni gel koji je pripremljen iz dva dijela: 8 % donjeg gela za razdvajanje i 5 % gornjeg gela za sabijanje. Vertikalna SDS elektroforeza izvedena je pomoću Mini-PROTEAN Electrophoresis System jedinice (BIO-RAD, US). Elektroforeza se provela pri 150 V dok proteini nisu prešli u gel za razdvajanje, a potom pri 100 V tijekom 60 – 90 minuta.

4.16.3. Prijenos proteina na membranu

Odmah po završetku gel elektroforeze gel je ekvilibriran u puferu za prijenos (25 mM Tris, 192 mM glicin i 10 % metanola) tijekom 15 minuta. Za to vrijeme pripremljeni su transfer papiri i poliviniliden difluorid (PVDF) membrane koje su nakratko namočene u puferu za prijenos, a membrana je bila prethodno namočena u 100 % metanolu. Razdvojeni proteini preneseni su na PVDF membranu pomoću Mini-PROTEAN Electrophoresis System jedinice (BIO-RAD, US). Prijenos proteina na membranu provodio se 90 min kod konstantnih 200 mA.

4.16.4. Prikaz proteina na membrani

PVDF membrana isprana je u TBST puferu (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0,1 % Tween 20) 3 puta po 5 minuta. Nespecifično vezanje protutijela blokirano je otopinom za blokiranje (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 5 % nemasnog mlijeka u prahu ili 5 % BSA) u trajanju od 1 sata na sobnoj temperaturi. Membrana je isprana 3 puta po 5 minuta u TBST puferu kako bi se uklonili ostatci otopine za blokiranje. Membrana je zatim inkubirana s otopinom primarnog protutijela (tablica 3.) preko noći na +4 °C, nakon čega je isprana 3 puta po 5 minuta s TBST puferom. Nakon ispiranja membrana je inkubirana sa sekundarnim protutijelom IgG, konjugiranim s peroksidazom iz hrena, 1 sat pri sobnoj temperaturi, a potom ispiranim 3 puta po 5 minuta u TBST puferu. Na kraju je membrana inkubirana tijekom 5 minuta u otopini diaminobenzidina i H₂O₂ (DAB tablete) u destiliranoj vodi.

Tablica 3. Opće karakteristike korištenih antitijela

	Uzgojeno u:	Proizvođač:	Razrjeđenje
1°Antitijelo			
p53	Zecu	Cell signalling Technology	1:1000 u 5% w/v BSA, 1xTBS, 0,1% Tween20
kaspaza 3	Zecu	Cell signalling Technology	1:1000 u 5% mlijeko prahu, 1xTBS, 0,1% Tween20
citokrom C	Zecu	Cell signalling Technology	1:1000 u 5% w/v BSA, 1xTBS, 0,1% Tween20
Akt	Zecu	Cell signalling Technology	1:1000 u 5% w/v BSA, 1xTBS, 0,1% Tween20
GAPDH	Zecu	Cell signalling Technology	1:5000 u 5% mlijeko prahu, 1xTBS, 0,1% Tween20
2°Antitijelo			
IgG-HRP obilježeno	Zecu	Cell signalling Technology	1:2000 u 5% mlijeko prahu, 1xTBS, 0,1% Tween20

4.16.5. Kvantifikacija količine proteina na membrani

Pomoću Programa ImageJ napravljena je relativna kvantifikacija dobivenih vrpca proteinskih uzoraka na membrani.

4.17. Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja stanične proliferacije analizirani su primjenom statističkog programa *Statistica for Windows v. 13.1*. Rezultati su prikazani u obliku tabličnog ili grafičkog prikaza srednjih vrijednosti sa standardnim devijacijama (\pm SD) rezultata od tri nezavisna ponavljanja u triplicatu. Za analizu statističke značajnosti između tretiranih i kontrolnih stanica u kulturi korištena je neparametrijska analiza primjenom Kolmogorov-Smirnov testa, a za obradu podataka staničnog ciklusa, apoptoze i mitohondrijskog potencijala korištena je jednosmjerna analiza varijanci (ANOVA) s Bonferoni korekcijama u XSTAT programu. Svi podatci prikazani su sa statističkom značajnošću od $P < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Utjecaj *N*-9-sulfonilpurinskih derivata na proliferaciju stanica

Antiproliferativni učinak spojeva SPD 1 - 16 ispitan je na stanicama karcinoma (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358), leukemijskim stanicama (K562, CCRF-CEM i MOLT4), stanicama limfoma (Raji i HuT-78), te na normalnim staničnim linijama (BJ i MDCK1). Rezultati procjene antiproliferativnog učinka SPD prikazani su kao $\log IC_{50}$ vrijednosti, gdje je IC_{50} koncentracija (μM) derivata pri kojoj je inhibirano 50 % staničnog rasta (tablica 4.). Dobiveni rezultati prikazuju ovisnost učinka SPD o vrsti testiranih stanica, kemijskoj strukturi, kao i o apliciranoj koncentraciji i mehanizmu djelovanja derivata. SPD pokazuju različiti učinak na inhibiciju staničnog rasta tumorskih stanica u odnosu na normalne stanice.

Rezultati testiranja SPD na normalnim staničnim linijama BJ i MDCK1 pokazuju slabiji učinak na MDCK1 stanice u odnosu na BJ. Primjetan antiproliferativni učinak testiranih derivata prema BJ stanicama ostvaren je djelovanjem SPD1 sa IC_{50} $15,0 \pm 6,6 \mu M$, SPD3 sa IC_{50} $17,4 \pm 11,3 \mu M$, SPD4 sa IC_{50} $22,4 \pm 9,3 \mu M$, SPD9 sa IC_{50} $37,3 \pm 17,3 \mu M$, SPD10 sa IC_{50} $9,0 \pm 6,5 \mu M$ i SPD12 sa IC_{50} $14,3 \pm 10,6 \mu M$. Stanična linija BJ pokazala je potpunu neosjetljivost prema SPD 11, SPD15 i SPD16 gdje je $IC_{50} > 100 \mu M$. Preostali testirani derivati pokazali su $IC_{50} > 50 \mu M$. Poštedni učinak pokazuje većina testiranih derivata na MDCK1 staničnu liniju sa $IC_{50} > 50 \mu M$. Djelovanje na stanični rast MDCK1 stanice pokazali su SPD1 sa IC_{50} $18,0 \pm 6,5 \mu M$, SPD10 $33,7 \pm 16,8 \mu M$, i SPD12 $5,5 \pm 2,7 \mu M$.

Stanice karcinoma relativno su otporne na djelovanje testiranih derivata s visokom IC_{50} vrijednošću. Inhibicijski učinak na rast HeLa stanica pokazuju SPD1 sa IC_{50} $34,6 \pm 8,8 \mu M$ i SPD3 sa IC_{50} $33,0 \pm 5,0 \mu M$, s nižom IC_{50} jesu SPD10 ($28,6 \pm 7,1 \mu M$) i SPD12 ($22,3 \pm 2,1 \mu M$). SPD1 ($6,6 \pm 3,2 \mu M$), SPD10 ($6,3 \pm 2,4 \mu M$) i SPD12 ($10,6 \pm 1,8 \mu M$) djeluju snažnije na CaCo-2 staničnu liniju u odnosu na HeLa stanice, dok ostali derivati odražavaju $IC_{50} > 50 \mu M$. Od testiranih karcinoma NCI-H358 stanična linija pokazala se osjetljivijom prema testiranim derivatima u usporedbi s HeLa i CaCo-2 stanicama. Derivati s najjačim učinkom pokazali su najnižu IC_{50} prema NCI-H358 stanicama, koja iznosi $3,8 \pm 0,7 \mu M$ za SPD1, $3,8 \pm 1,3 \mu M$ za SPD3, $3,7 \pm 0,9 \mu M$ za SPD10 i $3,0 \pm 0,3 \mu M$ za SPD12.

Leukemijske stanice nisu bile osjetljive na djelovanje SPD2, SPD 4-6, SPD11, SPD 13-16 sa $IC_{50} > 50 \mu M$. Primjetno djelovanje SPD u IC_{50} koncentraciji podjednako se odražava među K562, CCRF-CEM i MOLT4 leukemijskim stanicama. SPD1 svoju IC_{50} aktivnost pokazuje prema

K562 stanicama pri $2,4 \pm 0,4 \mu\text{M}$, za CCRF-CEM je $0,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ i MOLT4 $1,5 \pm 1,4 \mu\text{M}$. IC_{50} djelovanje SPD10 za sve testirane leukemijske stanice u rasponu je od 1,2 do 3,6 μM . Učinak SPD12 na inhibicijski rast 50 % K562 stanica jest pri $1,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$, za CCRF-CEM je $0,6 \pm 0,28 \mu\text{M}$ i MOLT4 $1,7 \pm 1,8 \mu\text{M}$.

Inhibicija staničnog rasta limfoma najjače je inhibirana od strane SPD1, SPD10 i SPD12 pri podjednakim IC_{50} od $2\mu\text{M}$ za Raji i HuT-78, gdje HuT-78 pokazuje veću osjetljivost prema SPD1 ($0,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$). Ostali testirani derivati svoju aktivnost u inhibiciji 50 % staničnog rasta ostvaruju pri koncentracijama višim od 15 μM prema Raji i HuT-78 stanicama.

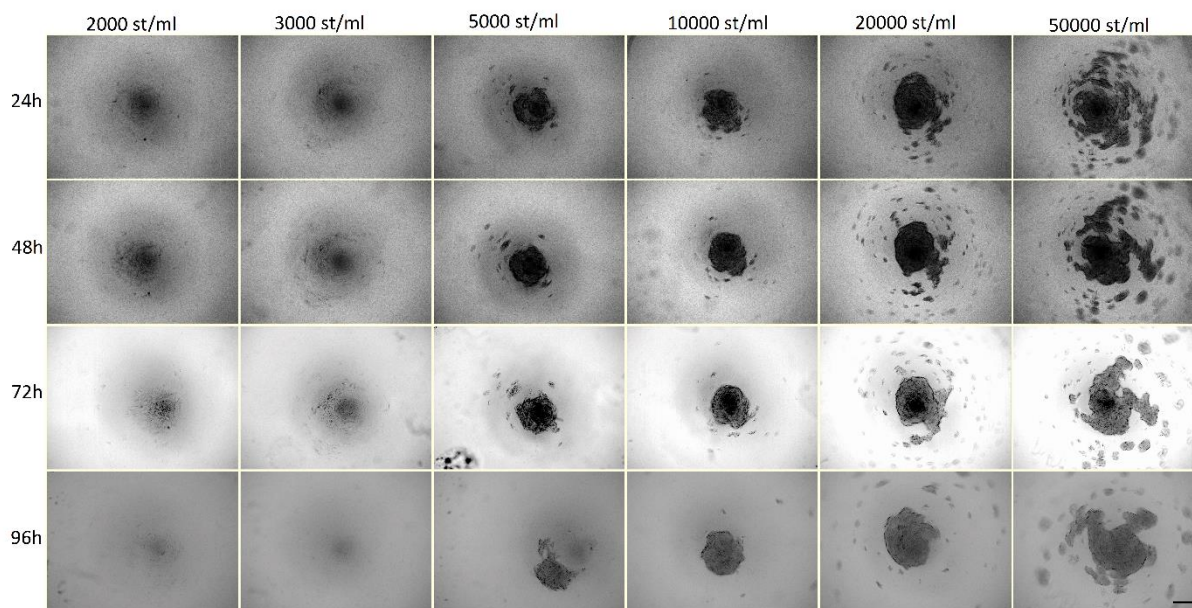
Tablica 4. Antiproliferativan učinak *N*-9-sulfonilpurinskih derivata (SPD 1 - 16) na testiranim staničnim linijama

Derivati:	log IC ₅₀ (μM)									
	BJ	MDCK1	HeLa	CaCo-2	NCI-H358	Raji	K562	Hut78	CCRF-CEM	MOLT4
SPD1	15,0 ±6,6	18,0 ±6,5	34,6 ±8,8	6,6 ±3,2	3,8 ±0,7	2,4 ±1,5	2,4 ±0,4	0,9 ±0,4	0,5 ±0,3	1,5 ±1,4
SPD2	>50	>50	>50	>50	>50	35,9 ±1,9	>50	51,0 ±2,6	>50	>50
SPD3	17,4 ±11,3	63,0 ±14,8	33,0 ±5,0	51,4 ±12,4	3,8 ±1,3	24,6 ±1,3	14,8 ±3,5	79,2 ±33,1	6,3 ±1,0	14,2 ±14,0
SPD4	22,4 ±9,3	>50	>50	>50	>50	54,1 ±5,9	>50	>50	>50	>50
SPD5	82,6 ±18,9	>100	>100	>100	75,0 ±18,8	64,4 ±35,0	>100	63,5 ±18,6	>100	>100
SPD6	>50	>50	>50	>50	>50	21,6 ±1,0	51,8 ±2,1	35,4 ±1,1	>50	>50
SPD7	83,3 ±19,7	>100	>100	>100	82,2 ±14,8	55,2 ±25,1	>100	70,2 ±22,3	12,6 ±0,4	42,2 ±15,8
SPD8	>50	>50	>50	>50	>50	23,9 ±1,6	28,4 ±2,8	26,5 ±3,2	>50	>50
SPD9	37,3 ±17,3	>50	>50	>50	22,1 ±1,9	17,5 ±1,3	16,5 ±1,4	19,2 ±4,2	19,2 ±2,8	25,3 ±2,6
SPD10	9,0 ±6,5	33,7 ±16,8	28,6 ±7,1	6,3 ±2,4	3,7 ±0,9	2,3 ±0,4	2,0 ±0,5	2,2 ±1,3	1,2 ±0,5	3,6 ±0,8
SPD11	>100	>100	>100	>100	>100	81,4 ±28,8	>100	>100	76,6 ±14,0	>100
SPD12	14,3 ±10,6	5,5 ±2,7	22,3 ±2,1	10,6 ±1,8	3,0 ±0,3	2,9 ±0,4	1,3 ±0,1	2,4 ±0,0	0,6 ±0,28	1,7 ±1,8
SPD13	87,7 ±11,9	>100	>100	>100	83,9 ±21,8	>100	>100	80,9 ±8,9	74,2 ±28,8	>100
SPD14	92,7 ±27,8	>100	>100	>100	73,3 ±16,4	56,2 ±15,2	73,9 ±6,8	55,0 ±5,6	59,9 ±15,0	>100
SPD15	>100	>100	>100	>100	>100	66,5 ±26,5	80,9 ±17,6	53,6 ±12,6	44,9 ±9,1	>100
SPD16	>100	>100	>100	>100	96,6 ±18,2	63,5 ±11,1	70,7 ±2,8	67,9 ±12,6	30,2 ±10,0	94,5 ±57,4

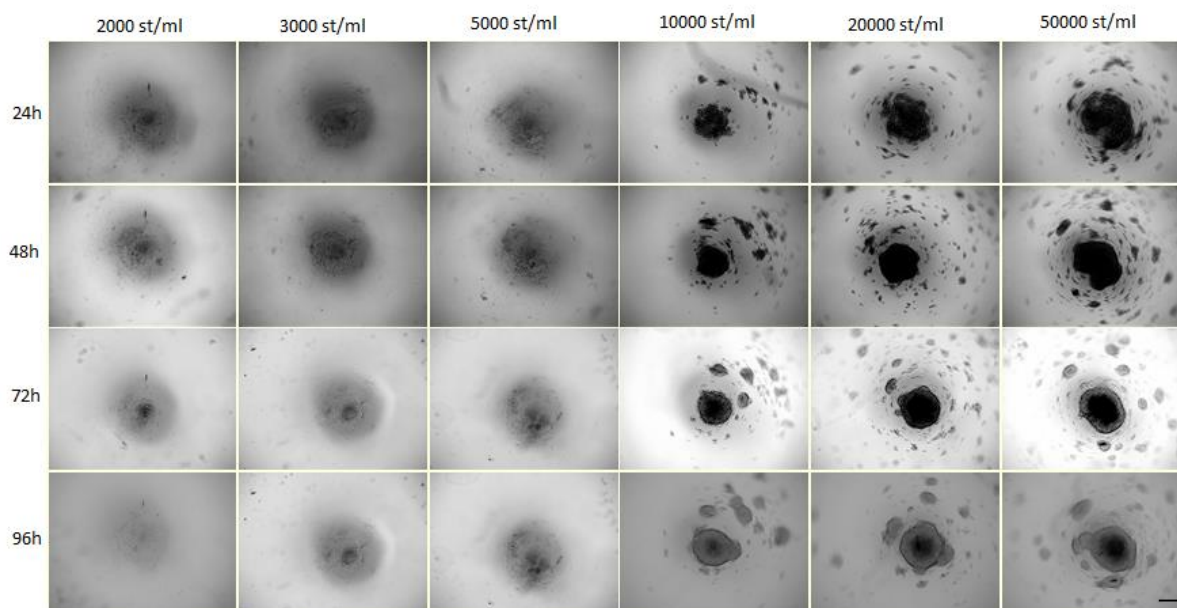
Rezultati prikazuju koncentraciju *N*-9-sulfonilpurinskih derivata pri kojoj je inhibirano 50 % staničnog rasta (IC₅₀). Procjena stanične proliferacije određena je MTT testom nakon inkubacije od 72 h. Rezultati predstavljaju srednju logaritamsku IC₅₀ ± SD vrijednost triju nezavisnih ponavljanja u triplikatu.

5.2. Uspostavljanje 3D kulture stanica

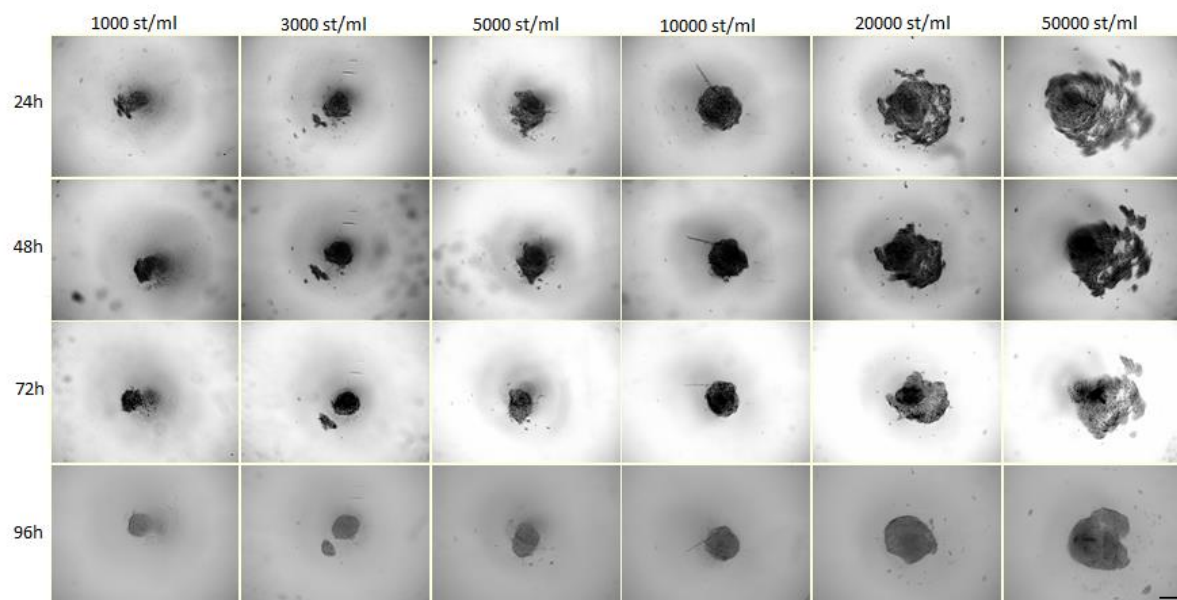
Optimalna koncentracija stanica CaCo-2, HeLa i NCI-H358 za 3D kulturu stanica određena je uzgojem staničnih sferoida u različitom koncentracijskom nizu od 2×10^3 do 5×10^4 st/ml (slika 13., 14. i 15.). Formiranje sferoida u 3D kulturi zabilježeno je nakon 24, 48, 72 i 96 sati, gdje je nakon 96 sata bio zamijenjen medij za uzgoj. Pri koncentracijama od 2×10^3 st/ml i 3×10^3 st/ml sferoidi su se formirali samo od NCI-H358 stanica, dok pri istim koncentracijama HeLa i CaCo-2 stanice nisu formirale sferoide. Koncentracija stanica veća od 1×10^4 st/ml uzrokuje formiranje nepravilne kuglaste strukture, s popratnim manjim sferoidima u sve tri stanične linije. CaCo-2 i NCI-H358 stanice pri koncentraciji od 5×10^3 st/ml formirale su prihvatljive sferoidne strukture, za razliku od HeLa stanica kod kojih nije došlo do stvaranja sferoida. Optimalna koncentracija za formiranje pravilnih sferoidnih struktura za sve tri stanične linije pokazala se koncentracija od 1×10^4 st/ml, gdje je struktura formiranih sferoida ostala cjelovita nakon promjene medija za uzgoj stanica (slika 16.).



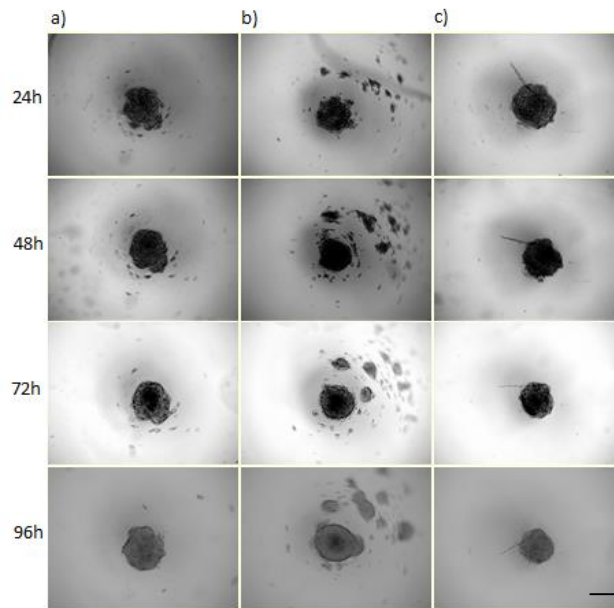
Slika 13.: Formiranje sferoida od CaCo-2 stanica. CaCo-2 stanice nasađene su u jažice konusnog dna slabo prijanjajuće plastike, u koncentracijskom nizu od 2×10^3 do 5×10^4 st/ml. Sferoidi su slikani pod povećanjem od 50 x na mikroskopu Axiovert 200M, Zeiss. Skala predstavlja 400 μm .



Slika 14.: Formiranje sferoida od HeLa stanica. HeLa stanice nasađene su u jažice konusnog dna slabo prijanjajuće plastike, u koncentracijskom nizu od 2×10^3 do 5×10^4 st/ml. Sferoidi su slikani pod povećanjem od 50 x na mikroskopu Axiovert 200M, Zeiss. Skala predstavlja 400 μm .



Slika 15.: Formiranje sferoida od NCI-H358 stanica. NCI-H358 stanice nasađene su u jažice konusnog dna slabo prijanjajuće plastike, u koncentracijskom nizu od 2×10^3 do 5×10^4 st/ml. Sferoidi su slikani pod povećanjem od 50 x na mikroskopu Axiovert 200M, Zeiss. Skala predstavlja 400 μm .



Slika 16.: Formirani stanični sferoidi u koncentraciji od 1×10^4 st/ml. a) CaCo-2 stanice, b) HeLa stanice i c) NCI-H358 stanica. Sferoidi su slikani pod povećanjem od 50 x na mikroskopu Axiovert 200M, Zeiss. Skala predstavlja 400 μm .

5.3. Usporedba utjecaja *N*-9-sulfonilpurinskih derivata na stanice uzgojene u 2D i 3D kulturi stanica

Usporedba učinka SPD1 i SPD12 derivata na rast stanica karcinoma uzgojenih u 2D ili 3D kulturi stanica napravljena je tako da su odabrani spojevi aplicirani na stanice HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 u rasponu konačnih koncentracija od 1×10^{-4} M do 1×10^{-7} M. Stanični rast određen je MTT testom nakon inkubacije tijekom 24, 48 i 72 sata.

HeLa stanice uzgojene u klasičnoj 2D kulturi stanica nakon inkubacije s 1×10^{-4} M SPD1 pokazuju statistički ($P < 0,001$) značajno sniženje staničnog rasta (> 70 %), a pojačani učinak vidljiv je kroz produženo vrijeme inkubacije od 48 i 72 sata. Pri istoj koncentraciji SPD1 HeLa stanice uzgojene u 3D kulturi stanica pokazuju povišen stanični rast od 48,1 % ($\pm 3,3$) nakon 24 sata u odnosu na stanice u 2D kulturi, koji se lagano smanjuje na 34,4 % ($\pm 10,4$) nakon 48 sata i na 25,4 % ($\pm 2,4$) nakon 72 sata s $P < 0,001$. Formirani sferoidi od HeLa stanica odražavaju otpornost od 20 % na SPD1 u odnosu na 2D kulturu stanica kroz sva tri vremena inkubacije.

Učinak SPD12 na HeLa stanice u 2D kulturi ovisan je o koncentraciji primijenjenog spoja i vremenu inkubacije (slika 17.). Stanični rast bio je gotovo u potpunosti inhibiran pri koncentraciji od 1×10^{-4} M nakon inkubacije tijekom 48 i 72 sata sa statističkom značajnošću od $P < 0,001$. Djelovanje spojeva na stanice u 2D kulturi vidljivo je nakon 72 sata inkubacije kad je rast usporen za više od 90 % pri svim testiranim koncentracijama. Nasuprot tome, stanični rast formiranih HeLa sferoida u 3D kulturi pri svim testiranim koncentracijama SPD12 derivata od 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M i 1×10^{-7} M nije usporen i veći je od 100 % u odnosu na kontrolu neovisno o vremenu inkubacije. HeLa stanice u 3D kulturi stanica tijekom inkubacije od 24, 48 i 72 sata pokazuju stanični rast od 32,4 % ($\pm 1,7$), 28,7 % ($\pm 5,1$) i 23,1 % ($\pm 2,2$), što je za 20 % više u odnosu na rast stanica u 2D kulturi.

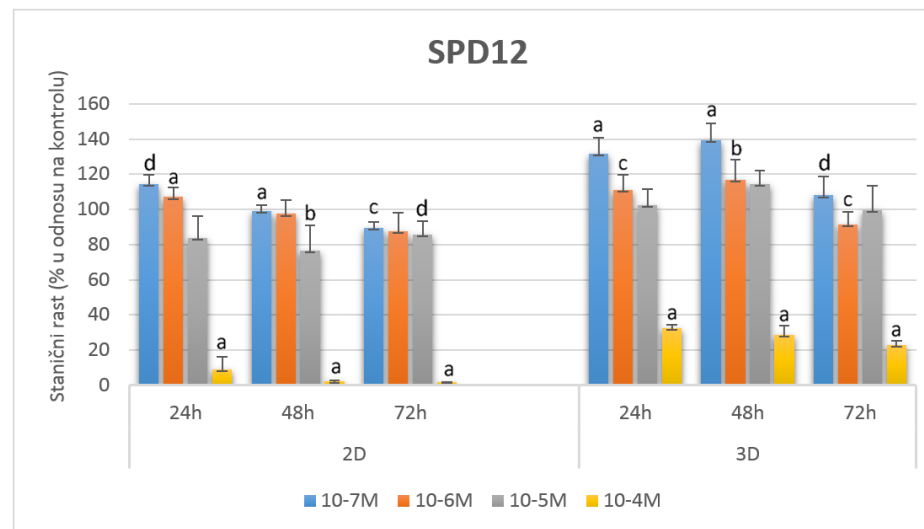
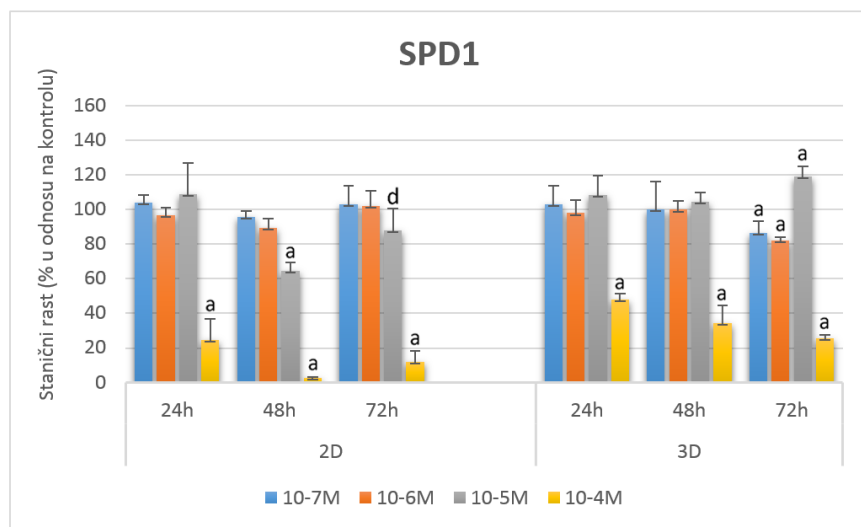
SPD1 smanjuje rast CaCo-2 stanica uzgojenih u 2D kulturi pri koncentracijama od 1×10^{-5} M i 1×10^{-4} M nakon sva tri vremena inkubacije ($P < 0,001$). Naime, koncentracija SPD1 od 1×10^{-5} M nije znatno utjecala na smanjen rast CaCo-2 staničnih sferoida gdje je rast stanica viši od 80 % u odnosu na kontrolne stanice. Najveća otpornost sferoida vidljiva je nakon aplikacije SPD1 derivata u najvećoj koncentraciji gdje je stanični rast 49,2 % ($\pm 10,9$), 31,0 % ($\pm 3,8$) i 28,5 % ($\pm 5,9$) u vremenskim intervalima od 24 sata (slika 18.).

Stanice CaCo-2 uzgojene u 2D kulturi stanica najosjetljivije su na 1×10^{-4} M SPD12 s potpuno inhibiranim rastom nakon tretmana od 48 sata ($P < 0,001$). Usporedno djelovanje

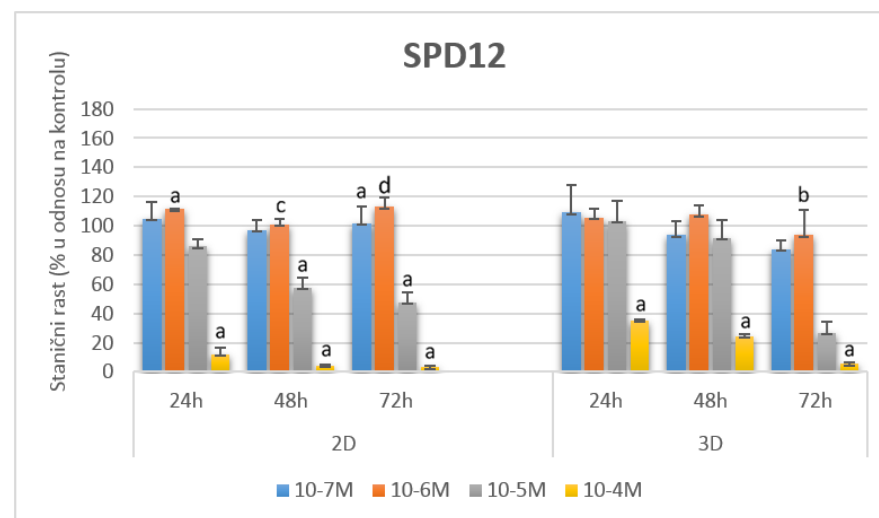
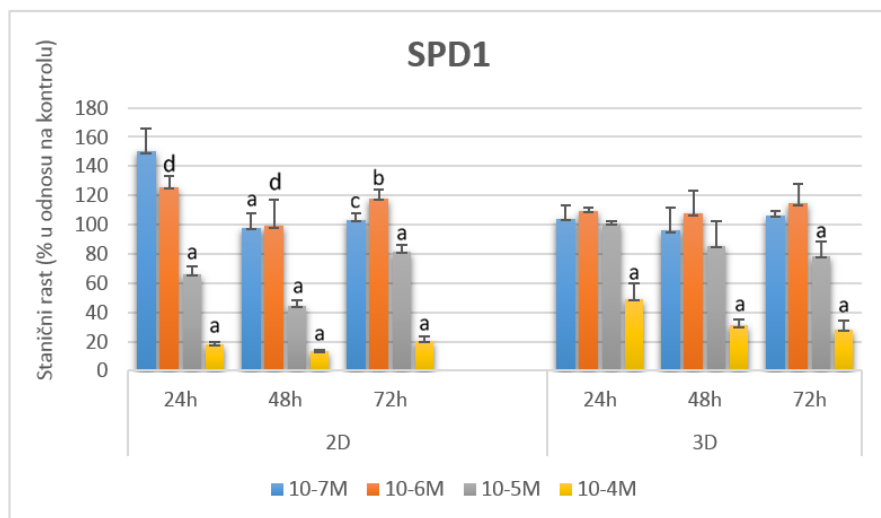
SPD12 na CaCo-2 sferoide pokazuje stanični rast od 24,7 % ($\pm 1,2$) nakon 48 sata, koji se u vremenu inkubacije od 72 sata smanjuje na 5,5 % ($\pm 0,8$) što je identično staničnom rastu u monosloju u istom vremenu inkubacije ($P < 0,001$).

Graduirano inhibicijsko djelovanje SPD1 na rast NCI-H358 stanice u 2D kulturi povećanjem aplicirane koncentracije vidljivo je nakon inkubacije od 24 sata, koje se kontinuirano nastavlja produženim vremenom inkubacije (slika 19.). Statistički značajan učinak od $P < 0,001$ SPD1 derivata na rast stanica u monosloju odražava se već pri koncentraciji od 1×10^{-5} M sa 61,5 % ($\pm 5,4$) staničnog rasta nakon 24 sata, koji se snižava na 38,6 % ($\pm 1,2$) nakon 48 sati te dostiže rast od 22,3 % ($\pm 2,9$) nakon 72 sata. Usporedan rast NCI-H358 stanica u 3D kulturi pri istoj koncentraciji viši je od 85 % kroz sva tri vremena inkubacije. Evidentna razlika u staničnom rastu NCI-H358 sferoida nakon tretmana s 1×10^{-4} M SPD1 derivatom viša je od 60 %, za razliku od stanica u monosloju gdje je staničan rast u potpunosti inhibiran ($P < 0,001$).

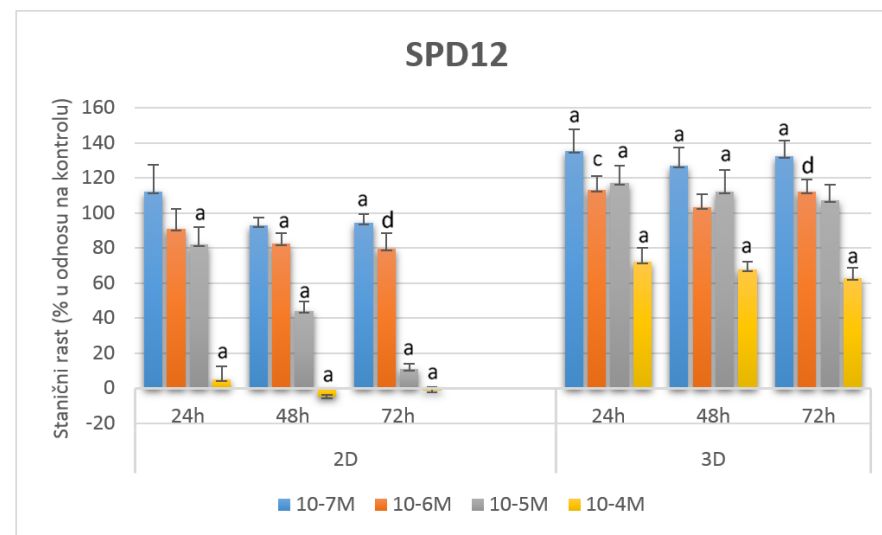
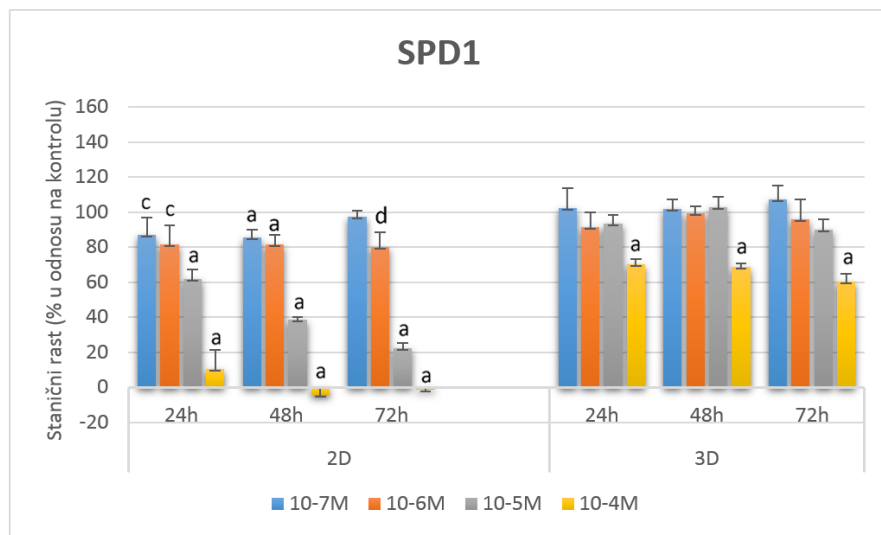
Spoj SPD12 u koncentraciji od 1×10^{-5} M uzrokuje smanjen rast NCI-H358 stanica u 2D kulturi od 82,0 % ($\pm 9,7$) nakon 24 sata, koji progresivno opada produženim vremenom inkubacije što dovodi do rasta stanica od svega 10,7 % ($\pm 3,2$) nakon 72 sata ($P < 0,001$). Vidljiv je suprotan obrazac djelovanja SPD12 derivata na 3D kulturu stanica u odnosu na 2D kulturu, pri istoj koncentraciji izazivajući rast stanica veći od 100 %. Nadalje, vidljiva je i razlika u značajno većoj otpornosti NCI-H358 formiranih sferoida sa staničnim rastom od 62,8 % ($\pm 5,9$) nakon 72 sata u odnosu na potpunu inhibiciju staničnog rasta u 2D kulturi pri koncentraciji od 1×10^{-4} M SPD12.



Slika 17.: Usporedni učinak SPD1 i SPD12 u 2D i 3D kulturi HeLa stanica. HeLa stanice tretirane su sa SPD1 i SPD12 u rasponu finalnih koncentracija od 1×10^{-4} M do 1×10^{-7} M. Procjena staničnog rasta određena je MTT testom nakon inkubacije od 24, 48 i 72 sata. Rezultati predstavljaju srednju aritmetičku vrijednost sa \pm SD vrijednosti triju nezavisnih ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna P vrijednost definirana je $P < 0,05$ gdje je: (a) $P < 0,001$, (b) $P < 0,01$, (c) $P < 0,025$ i (d) $P < 0,05$.



Slika 18.: Usporedni učinak SPD1 i SPD12 u 2D i 3D kulturi CaCo-2 stanica. CaCo-2 stanice tretirane su sa SPD1 i SPD12 u rasponu finalnih koncentracija od 1×10^{-4} M do 1×10^{-7} M. Procjena staničnog rasta određena je MTT testom nakon inkubacije od 24, 48 i 72 sata. Rezultati predstavljaju srednju aritmetičku vrijednost sa \pm SD vrijednosti triju nezavisnih ponavljanja u triplicatu. Statistički značajna P vrijednost definirana je $P < 0,05$ gdje je: (a) $P < 0,001$, (b) $P < 0,01$, (c) $P < 0,025$ i (d) $P < 0,05$.



Slika 19.: Usporedni učinak SPD1 i SPD12 u 2D i 3D kulturi NCI-H358 stanica. NCI-H358 stanice tretirane su sa SPD1 i SPD12 u rasponu finalnih koncentracija od 1×10^{-4} M do 1×10^{-7} M. Procjena staničnog rasta određena je MTT testom nakon inkubacije od 24, 48 i 72 sata. Rezultati predstavljaju srednju aritmetičku vrijednost sa \pm SD vrijednosti triju nezavisnih ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna P vrijednost definirana je $P < 0,05$ gdje je: (a) $P < 0,001$, (b) $P < 0,01$, (c) $P < 0,025$ i (d) $P < 0,05$.

5.4. Osjetljivost stanica na ispitivane spojeve ovisno o postotku seruma u mediju

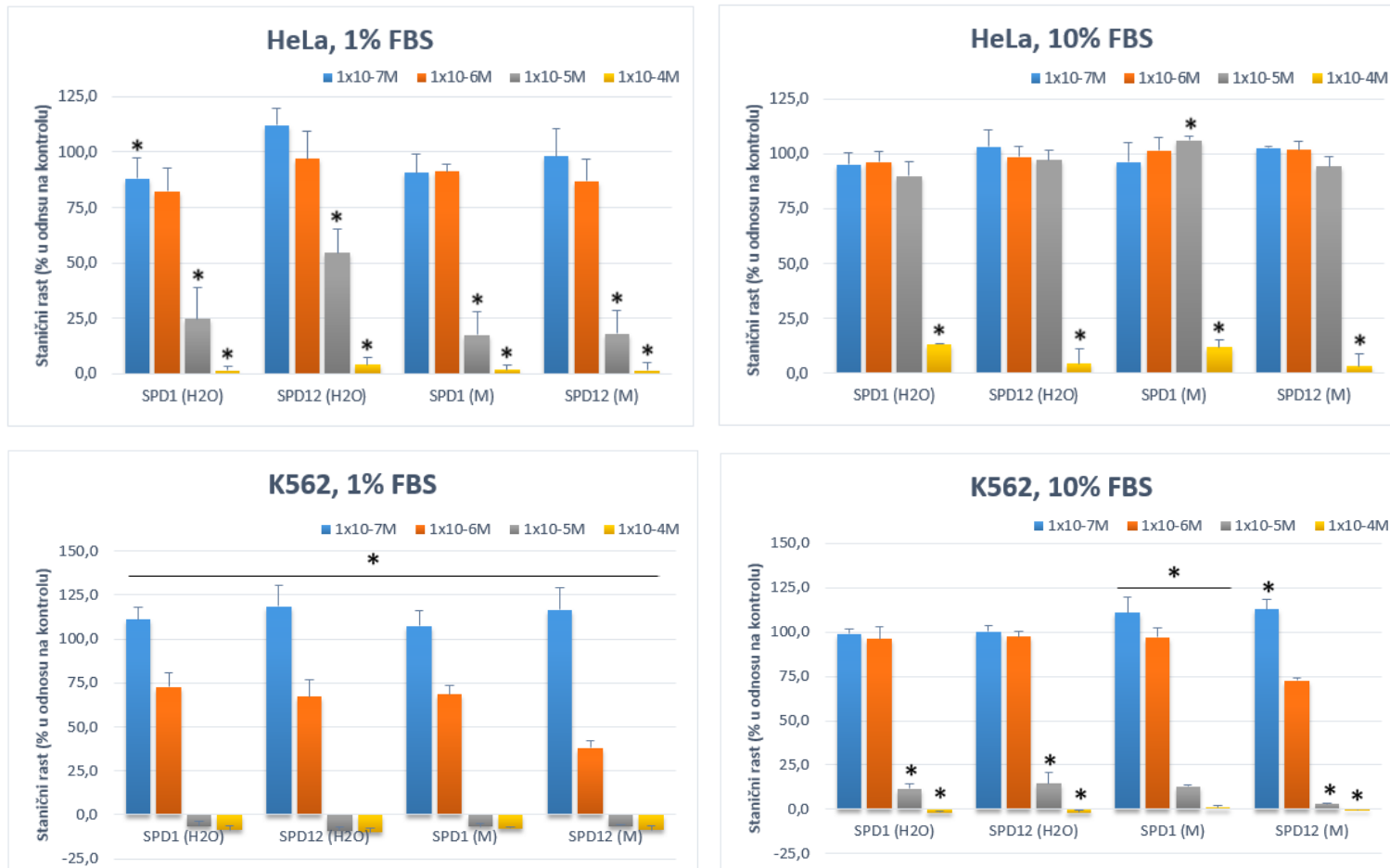
Osjetljivost stanica na tretman ovisno o postotku seruma u mediju za uzgoj stanica određena je uzgojem HeLa i K562 stanica u klasičnom mediju za uzgoj stanica s 10 % FBS-a i mediju sa smanjenim udjelom FBS-a od 1 %. Stanični rast tretiranih HeLa i K562 stanica sa SPD1 i SPD12 otopljenim u vodi ili mediju za uzgoj određen je MTT testom nakon inkubacije od 24 sata (slika 20.).

Rezultati pokazuju statistički značajno veću osjetljivost HeLa stanica na primijenjene odabrane derivate u mediju sa smanjenim udjelom FBS-a u odnosu na stanice s preporučenim udjelom FBS-a. Iako se zamjećuje snižen stanični rast pri svim testnim koncentracijama derivata SPD1 i SPD12, najveća razlika zabilježena je pri koncentracijama ispitivanih spojeva od 1×10^{-5} M i 1×10^{-4} M. U HeLa stanicama uzgajanim u mediju s 1 % FBS-a zabilježen je inhibirani stanični rast za više od 70 % stanica tretiranih sa SPD1 u koncentraciji od 1×10^{-5} M. Derivat SPD12 djeluje na inhibiciju staničnog rasta HeLa stanica uzgajanih u mediju s 1 % FBS-a više od 45 %. S druge strane, HeLa stanice uzgajane u mediju s 10 % FBS-a pokazale su se kao neosjetljive na testne spojeve.

Različito otapalo, voda ili medij, za pripremu radnih otopina SPD1 i SPD12 derivata nije se odrazilo na stanični rast HeLa stanica uzgajanih u mediju s 10 % FBS-a. Vrsta primijenjenog otapala za pripremu SPD1 i SPD12 derivata pokazala je djelomičnu promjenu u učinku na rast stanica koja ide u prilog otapanju derivata u mediju.

K562 stanice uzgajane u mediju s 1 % FBS-a pokazuju statistički značajno smanjeni stanični rast nakon tretmana sa SPD1 i SPD12 derivatima za razliku od stanica uzgajanih u mediju s 10 % FBS-om. Stanice u mediju s 1 % FBS-om pokazale su najveću osjetljivost pri koncentraciji od 1×10^{-6} M u odnosu na stanice uzgajane u mediju s 10 % FBS-a, iako se razlika uočava i pri koncentraciji od 1×10^{-5} M i 1×10^{-4} M za oba derivata.

Značajna razlika u inhibiciji staničnog rasta nije zamijećena tretmanom stanica sa SPD1 i SPD12 otopljenim u vodi ili mediju.

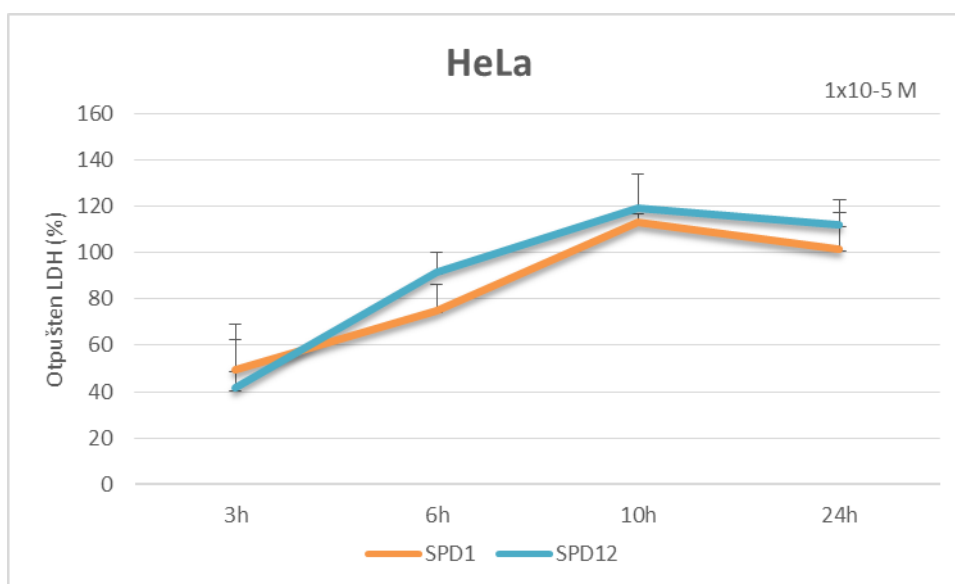


Slika 20.: Stanični rast HeLa i K562 stanica ovisno o postotku seruma u mediju za uzgoj. HeLa i K562 stanice uzgajane u mediju obogaćenim s 1 % FBS-om ili u mediju obogaćenim s 10 % FBS-om. Stanice su tretirane SPD1 i SPD12 derivatima otopljenim u vodi (H₂O) ili mediju za uzgoj (M). Stanični rast određen je MTT testom nakon inkubacije od 24 sata. Rezultati predstavljaju srednju aritmetičku vrijednost sa ± SD vrijednosti triju nezavisnih ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna P vrijednost definirana je P < 0,05 (*) u odnosu na kontrolne stanice

5.5. Procjena citotoksičnog učinka SPD1 i SPD12 mjerenjem otpuštenog LDH u mediju

Citotoksični učinak spojeva SPD1 i SPD12 na HeLa, K562 i Raji stanice praćen je mjerenjem otpuštenog LDH u staničnom mediju tijekom perioda od 3, 6, 10 i 24 sata. Postotak otpuštenog LDH u mediju povećava se u skladu s produženim vremenom inkubacije stanica s derivatima. Postotak otpuštenog LDH iz stanica pokazuje podjednak obrazac ponašanja nakon aplikacije s oba testirana derivata.

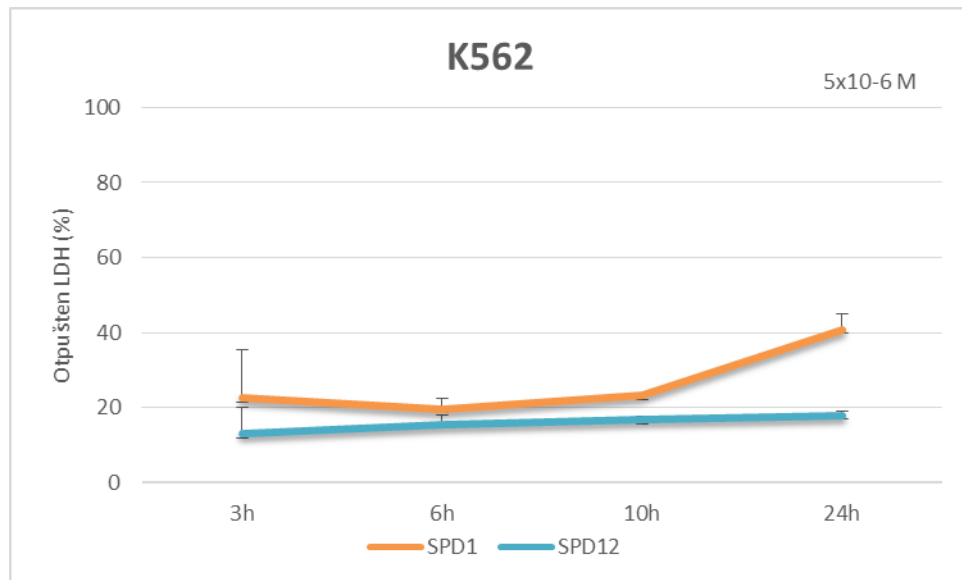
Citotoksično djelovanje SPD1 i SPD12 derivata na HeLa stanicama uočava se već nakon 3 sata gdje je otpušteno $49,4 \pm 19,6$ % LDH za SPD1 i $41,4 \pm 20,8$ % LDH za SPD12. Povećanje prisutnog LDH u mediju za uzgoj od $74,9 \pm 11,3$ % (SPD1) i $91,5 \pm 8,3$ % (SPD12) vidljivo je nakon 6 sati. Postotak LDH povećava se kroz vrijeme inkubacije te svoj maksimum dostiže već nakon 10 sati kada je otpušteno više od 100 % LDH u mediju za oba derivata (slika 21.).



Slika 21.: Otpušten LDH nakon tretiranja HeLa stanica SPD1 i SPD12 spojevima u finalnoj koncentraciji od 1×10^{-5} M. Apsorbanca otpuštenog LDH u mediju određena je nakon 3, 6, 10 i 24 sata mjerenjem na čitaču mikroploča Viktor 3V 1420 (Perking Elmer) pri 490 nm. Rezultati predstavljaju srednju postotnu vrijednost izraženu sa \pm SD izvedenu u triplikatu.

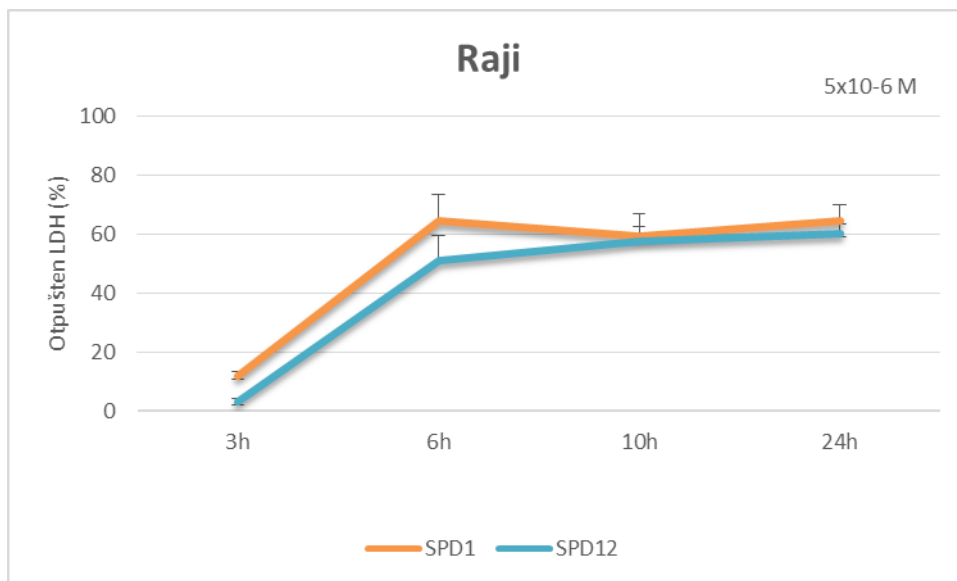
Stanice K562 smanjeno otpuštaju LDH u okolni medij (< 50 %). SPD1 nakon 3 sata inkubacije utječe na otpuštanje LDH u postotku od $22,6 \pm 12,9$, koje se održava kroz period od 6 i 10 sati. Povećana zastupljenost LDH od $40,7 \pm 4,2$ % uočava se nakon tretmana sa SPD1

kroz 24 sata. Učinak SPD12 na K562 stanice djeluje na blago povišenje otpuštenog LDH tijekom vremena koje je slabije u odnosu na SPD1. Aplikacija SPD12 na K562 stanice djeluje na otpuštanje $13,1 \pm 7,1$ % LDH nakon 3 sata, što s produženim vremenom inkubacije od 24 sata utječe na povišenje otpuštenog LDH od $17,9 \pm 1,0$ % (slika 22.).



Slika 22.: Otpušten LDH nakon tretiranja K562 stanica SPD1 i SPD12 spojevima u finalnoj koncentraciji od 5×10^{-6} M. Apsorbanca otpuštenog LDH u mediju određena je nakon 3, 6, 10 i 24 sata mjerenjem na čitaču mikroploča Viktor 3V 1420 (Perking Elmer) pri 490 nm. Rezultati predstavljaju srednju postotnu vrijednost izraženu sa \pm SD izvedenu u triplikatu.

Značajno otpuštanje LDH vidljivo je nakon djelovanja testiranih derivata na Raji stanice. Nakon 6 sati tretmana sa SPD1 otpušteno je $64,6 \pm 8,8$ %, a nakon tretmana sa SPD12 $61,2 \pm 8,1$ %. Nakon 10, odnosno 24 sata SPD1 i SPD12 dostižu maksimum svog djelovanja što je vidljivo s otpuštanjem $64,5 \pm 5,3$ % i $60,0 \pm 9,7$ % LDH u medij za uzgoj stanica (slika 23.).

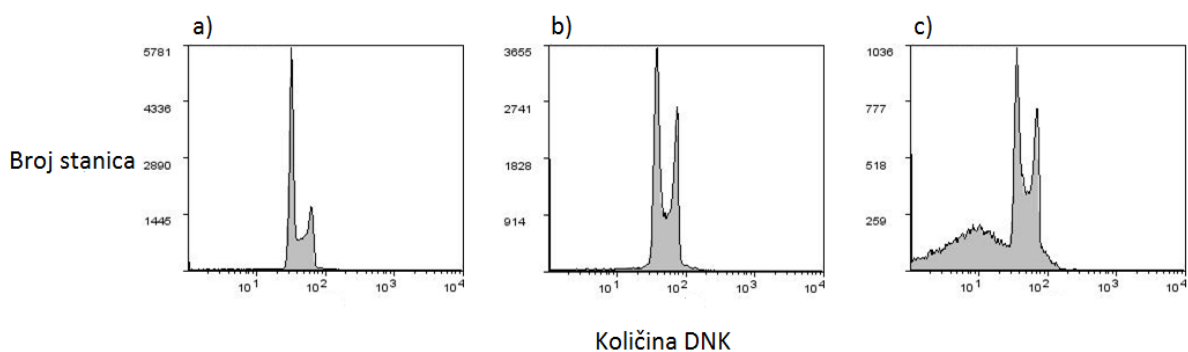


Slika 23.: Otpušten LDH nakon tretiranja Raji stanica SPD1 i SPD12 spojevima u finalnoj koncentraciji od 5×10^{-6} M. Apsorbanca otpuštenog LDH u mediju određena je nakon 3, 6, 10 i 24 sata mjerenjem na čitaču mikroploča Viktor 3V 1420 (Perking Elmer) pri 490 nm. Rezultati predstavljaju srednju postotnu vrijednost izraženu sa \pm SD izvedenu u triplikatu.

5.6. Utjecaj SPD1 i SPD12 na stanični ciklus

Utjecaj SPD1 i SPD12 derivata na stanični ciklus praćen je na HeLa, K562 i Raji stanicama. Na temelju nastalog intenziteta fluorescentne PI boje ovisno o količini DNK, stanice su podijeljene na subG₀, G₀/G₁, S i G₂/M faze staničnog ciklusa. Stanice su bile izložene djelovanju SPD1 i SPD12 derivata u finalnim koncentracijama za HeLa stanice 1×10^{-5} M, te za K562 i Raji 5×10^{-6} M tijekom 24 sata.

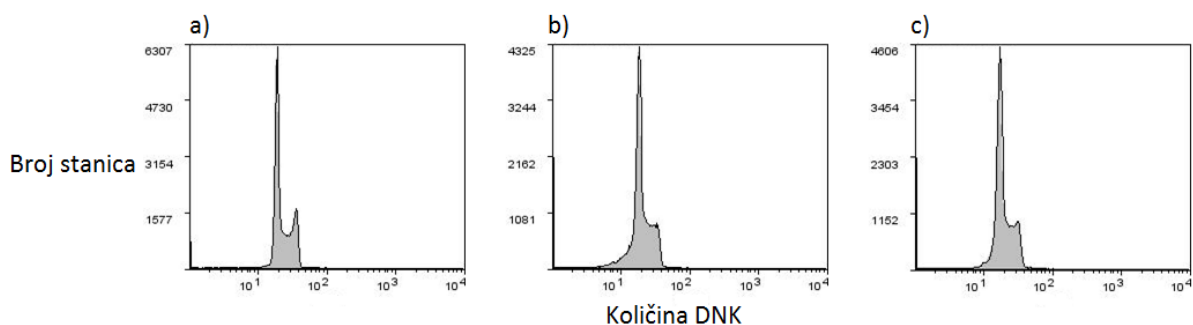
Analizom staničnog ciklusa, HeLa kontrolne stanice najvećim su udjelom u G₀/G₁ fazi, od $61,1 \pm 2,12$ %. Izloženost HeLa stanica djelovanju SPD1 derivata dovodi do smanjenog broja stanica u fazi S s $5,5 \pm 1,91$ % i G₀/G₁ s $37,7 \pm 2,55$ % u odnosu na kontrolne stanice. Smanjeni dio stanica praćen je povećanjem stanica u subG₀ fazi od $31,0 \pm 0,07$ %. Uočava se blago povećanje stanica u G₂/M fazi staničnog ciklusa od 7 % u odnosu na netretirane stanice. Djelovanje SPD12 derivata dovodi do značajnog nakupljanja stanica od $69,9 \pm 4,81$ % u subG₀ fazi, sa smanjenim udjelom stanica u preostalim fazama staničnog ciklusa (slika 24.).



Stanični ciklus	Kontrola	SPD1	P vrijednost	SPD12	P vrijednost
subG ₀	1,9 ±0,21	31,0 ±0,07	0,003	69,6 ±4,81	0,000
G ₀ /G ₁	61,1 ±2,12	37,7 ±2,55	0,003	12,5 ±2,05	0,000
S	18,1 ±0,07	5,5 ±1,91	0,003	6,7 ±0,99	0,005
G ₂ /M	18,7 ±2,12	25,2 ±0,35	0,045	11,2 ±1,77	0,030

Slika 24.: Analiza staničnog ciklusa HeLa stanica. HeLa stanice izložene su djelovanju SPD1 i SPD12 derivata u vremenu inkubacije od 24 sata. Slika prikazuje a) netretirane stanice, b) stanice tretirane sa SPD1 u koncentraciji od 1×10^{-5} M i c) stanice tretirane sa SPD12 u koncentraciji od 1×10^{-5} M. Grafički prikaz slika prikazan je tablično u obliku srednje aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama. Statistički značajna P vrijednost definirana je $P < 0,05$.

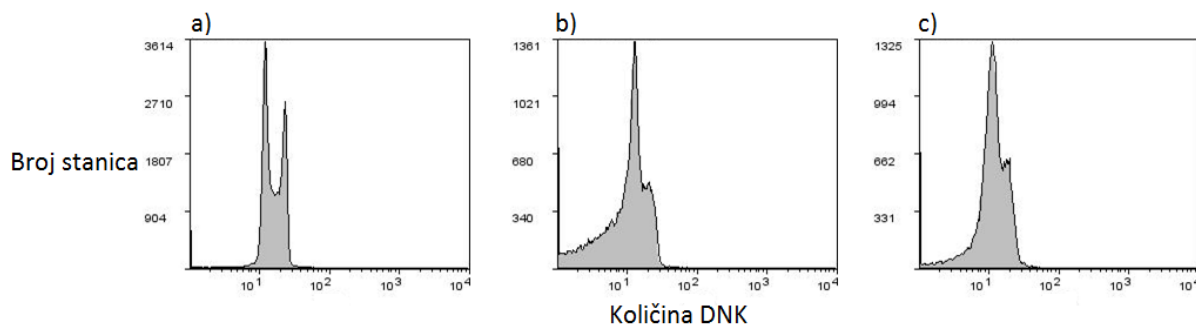
Derivati SPD1 i SPD12 pokazuju sličan obrazac djelovanja na K562 staničnu liniju s blago povišenim zaustavljanjem stanica u subG₀ fazi od $11,4 \pm 0,00$ % i $6,6 \pm 1,06$ %. Neznatno snižena količina DNK nakon tretmana sa SPD1 i SPD12 vidljiva je u G₀/G₁ i S fazi staničnog ciklusa u odnosu na kontrolne stanice. Najveća promjena vidljiva je u sniženoj količini DNK u G₂/M fazi od $11,1 \pm 0,06$ za SPD1 i $11,1 \pm 0,071$ % za SPD12 (slika 25.).



Stanični ciklus	Kontrola	SPD1	P vrijednost	SPD12	P vrijednost
subG ₀	2,1 ±0,14	11,4 ±0,00	0,001	6,6 ±1,06	0,009
G ₀ /G ₁	58,4 ±0,07	51,4 ±0,92	0,002	56,0 ±0,14	0,036
S	17,5 ±0,42	13,8 ±0,07	0,002	16,3 ±0,28	0,04
G ₂ /M	18,9 ±0,28	11,7 ±0,06	0,002	11,1 ±0,71	0,001

Slika 25.: Analiza staničnog ciklusa K562 stanica. K562 stanice izložene su djelovanju SPD1 i SPD12 derivata tijekom 24 sata. Slika prikazuje a) netretirane stanice, b) stanice tretirane sa SPD1 u koncentraciji od 5×10^{-6} M i c) stanice tretirane sa SPD12 u koncentraciji od 5×10^{-6} M. Grafički prikaz slika prikazan je tablično u obliku srednje aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama. Statistički značajna P vrijednost definirana je $P < 0,05$.

Djelovanje derivata SPD1 i SPD12 na Raji stanice vidljivo je u pomaku staničnog ciklusa u smjeru nakupljanja stanica u subG₀ fazi više od 14 % u odnosu na kontrolne stanice. Sukladno tome, dolazi do sniženog zastoja stanica u G₀/G₁ i S fazi staničnog ciklusa. Količina DNK u Raji stanicama najmanje je zastupljena u G₂/M fazi s $11,0 \pm 3,61$ % za SPD1 i $6,3 \pm 0,85$ % za SPD12 (slika 26.).

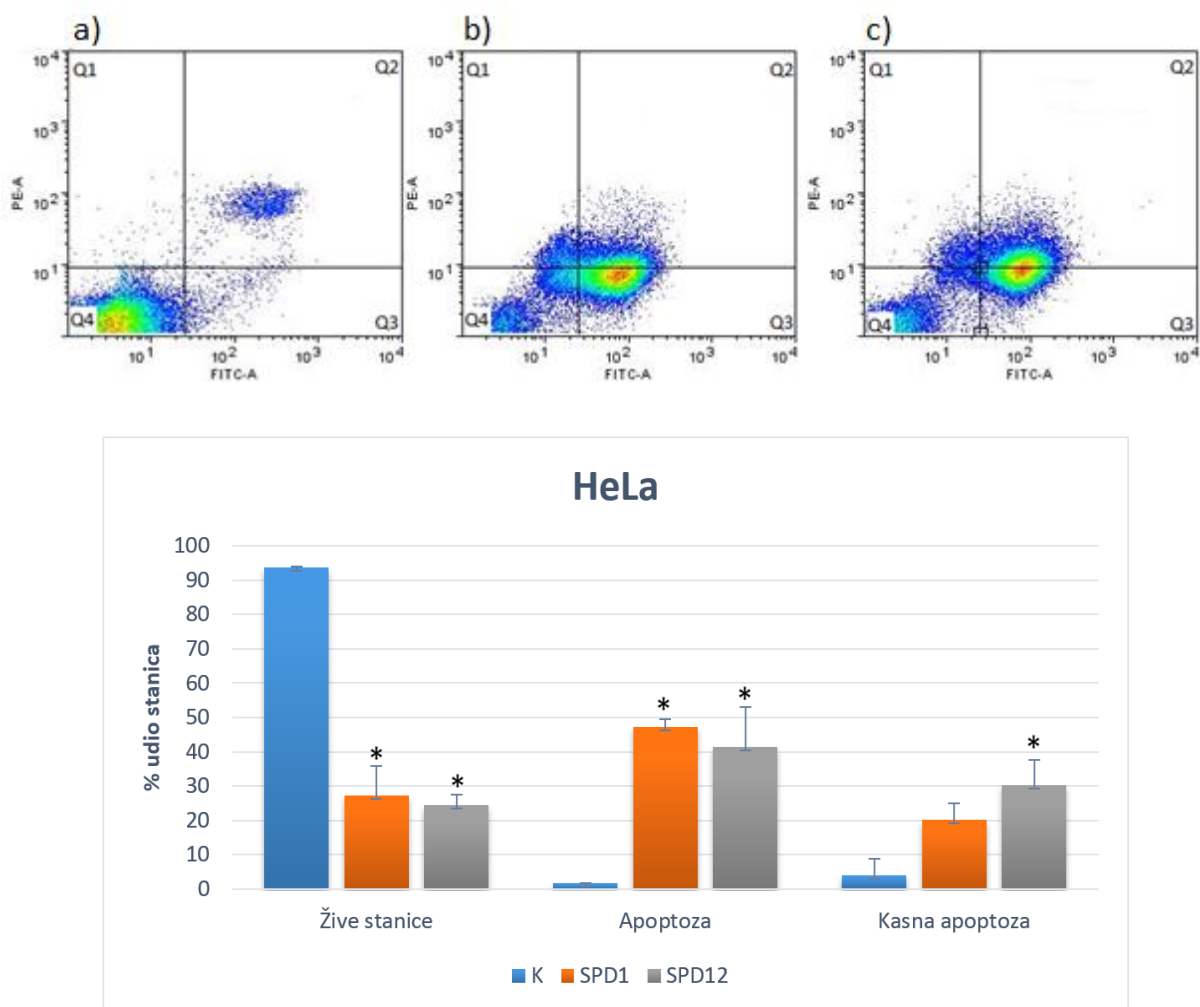


Stanični ciklus	Kontrola	SPD1	P vrijednost	SPD12	P vrijednost
subG ₀	2,15 ±0,07	16,2 ±2,40	0,003	18,3 ±0,21	0,002
G ₀ /G ₁	45,0 ±1,84	38,9 ±1,20	0,045	40,4 ±1,48	0,091
S	24,1 ±3,32	17,3 ±0,78	0,074	17,5 ±0,99	0,081
G ₂ /M	26,9 ±0,57	11,0 ±3,61	0,009	6,3 ±0,85	0,004

Slika 26.: Analiza staničnog ciklusa Raji stanica. Raji stanice izložene su djelovanju SPD1 i SPD12 derivata tijekom 24 sata. Slika prikazuje a) netretirane stanice, b) stanice tretirane sa SPD1 u koncentraciji od 5×10^{-6} M i c) stanice tretirane sa SPD12 u koncentraciji od 5×10^{-6} M. Grafički prikaz slika prikazan je tablično u obliku srednje aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama. Statistički značajna P vrijednost definirana je $P < 0,05$.

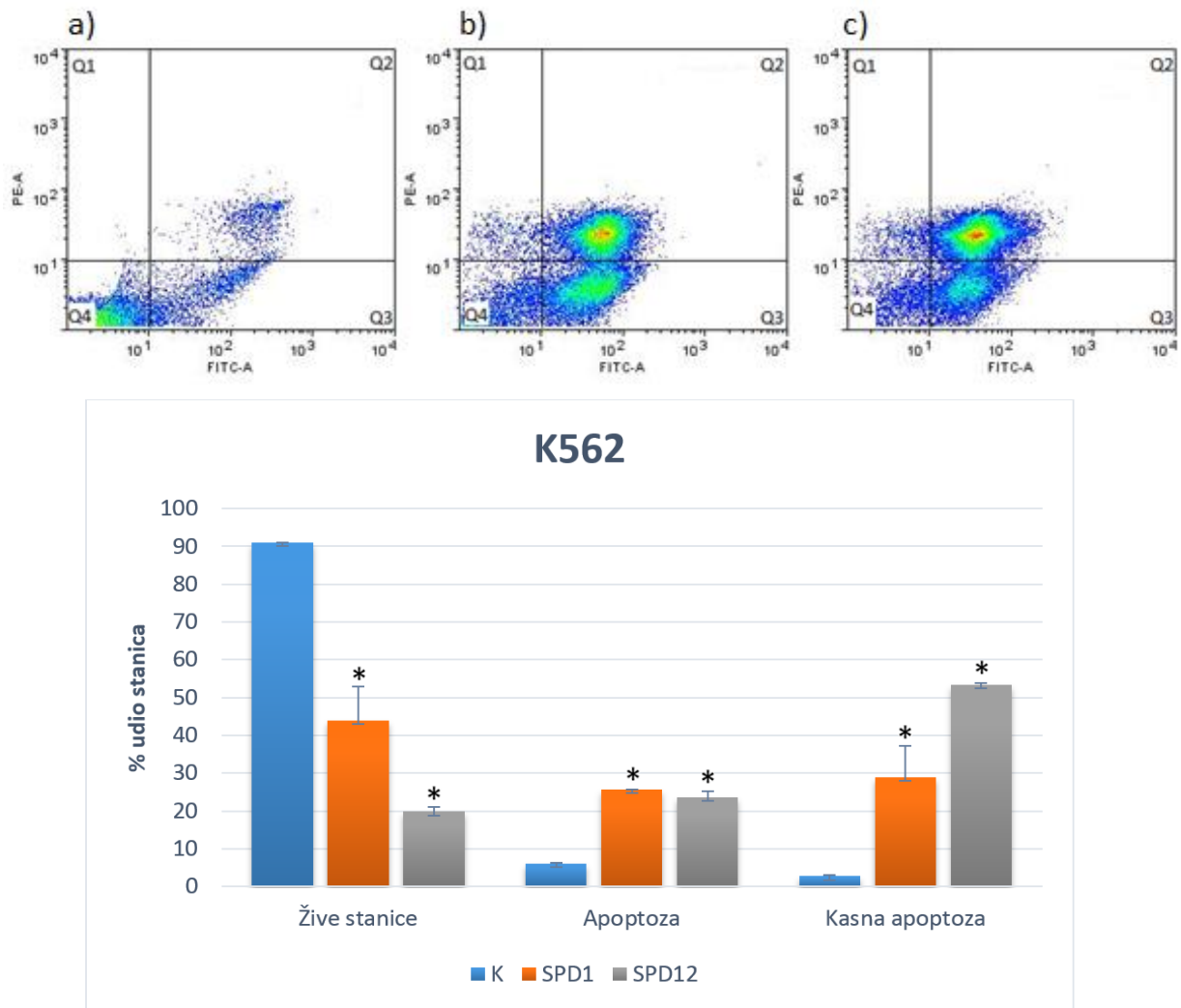
5.7. Određivanje apoptoza

Djelovanje SPD1 i SPD12 derivata u smjeru promicanja apoptoze u stanicama HeLa, K562 i Raji utvrđeno je analizom stanica na protočnom citometru nakon inkubacije s izdvojenim derivatima u trajanju od 24 sata. Mjerenje nastalog fluorescentnog signala omogućava identifikaciju stanica u ranoj apoptozu koje daju zeleni signal zbog vezanja aneksina V za PS ili stanica u kasnoj apoptozu/nekrozi koje daju crveni signal vezanjem PI na DNK.



Slika 27.: Indukcija apoptoze u HeLa stanicama tretiranih sa SPD1 i SPD12. HeLa stanice izložene su djelovanju SPD1 i SPD12 derivata u vremenu inkubacije od 24 sata. Slika prikazuje a) netretirane stanice, b) stanice tretirane sa SPD1 u koncentraciji od 1×10^{-5} M i c) stanice tretirane sa SPD12 u koncentraciji od 1×10^{-5} M, gdje su stanice u Q1 dvostruko pozitivne, u Q2 pozitivne na PI, u Q3 pozitivne na aneksin V i u Q4 dvostruko negativne. Udio stanica u pojedinom kvadrantu prikazan je grafički u obliku stupaca formiranih od aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama. Statistički značajna P vrijednost definirana je $P < 0,05$ (*).

Mehanizam djelovanja SPD1 na HeLa stanice indukcija je apoptoze u $47,3 \pm 2,33$ % stanica i kasne apoptoze određene u $20,3 \pm 4,75$ % stanica. Potaknuta apoptoza od strane SPD12 derivata vidljiva je u $41,4 \pm 11,6$ % HeLa stanica sa zastupljenošću $30,3 \pm 7,42$ % u kasnoj apoptozi. Populacija stanica s induciranom apoptozom homogena je s izraženom gustoćom u području rane apoptoze, odnosno stanica pozitivnih na aneksin V (slika 27.).

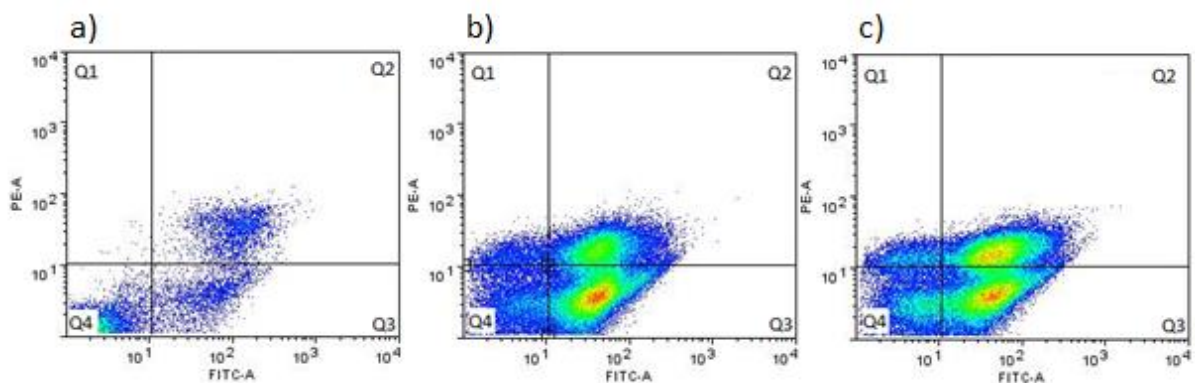


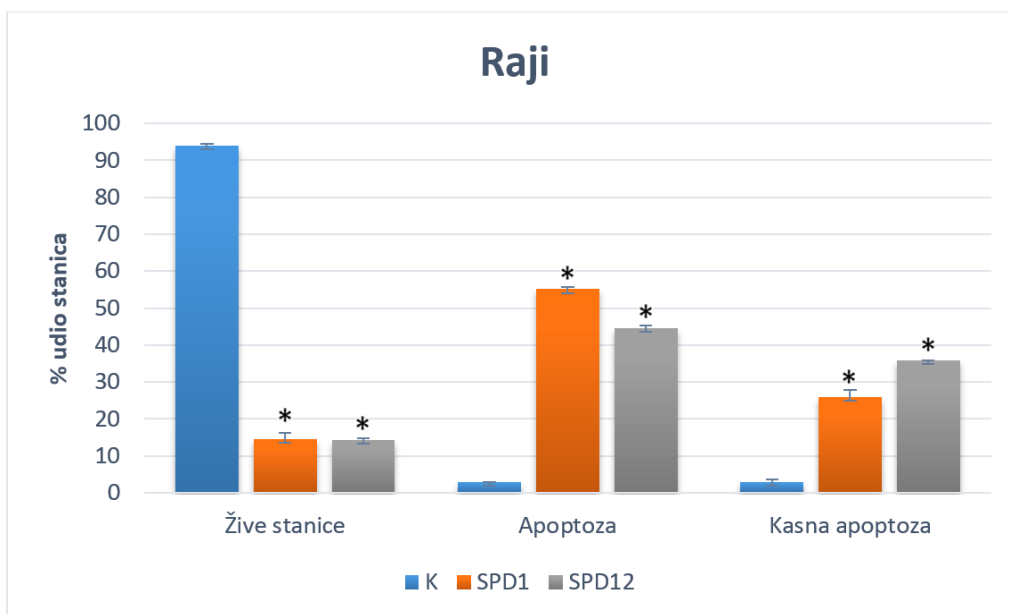
Slika 28.: Indukcija apoptoze u K562 stanicama tretiranih sa SPD1 i SPD12. K562 stanice izložene su djelovanju SPD1 i SPD12 derivata u vremenu inkubacije od 24 sata. Slika prikazuje a) netretirane stanice, b) stanice tretirane sa SPD1 u koncentraciji od 5×10^{-6} M i c) stanice tretirane sa SPD12 u koncentraciji od 5×10^{-6} M, gdje su stanice u Q1 dvostruko pozitivne, u Q2 pozitivne na PI, u Q3 pozitivne na aneksin V i u Q4 dvostruko negativne. Udio stanica u pojedinom kvadrantu prikazan je

grafički u obliku stupaca formiranih od aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama. Statistički značajna P vrijednost definirana je $P < 0,05$ (*).

Djelovanje SPD1 i SPD12 derivata na K562 stanice ostvaruje se indukcijom apoptoze dovodeći do nakupljanja stanica u kvadrant pozitivan na aneksin V (Q3) odnosno u kvadrant pozitivan na PI (Q4). SPD1 promiče apoptozu u $25,8 \pm 0,07$ % stanica s $29,0 \pm 8,34$ % stanica u kasnoj apoptozi/nekrozi, dok u preostalim stanicama nije zabilježena apoptoza. Indukcija apoptoze SPD12 derivatom vidljiva je u $23,7 \pm 1,48$ % stanica s najvećim udjelom stanica u kasnoj apoptozi/nekrozi ($53,4 \pm 0,42$ %) (slika 28.).

Aktivacija apoptoze u Raji stanicama tretiranim sa SPD1 i SPD12 derivatima uočena je u gotovo svim stanicama; samo u oko 10 % tretiranih stanica nije zabilježena apoptotska aktivnost. Najveći udio stanica od $55,2 \pm 0,49$ % u ranoj je apoptozi, a $26,0 \pm 1,91$ % stanica u kasnoj apoptozi/nekrozi kao posljedica djelovanja SPD1 derivata. Derivat SPD1 djeluje u smjeru aktiviranja apoptoze u $44,6 \pm 0,71$ % stanica i kasne apoptoze/nekroze u $35,8 \pm 0,14$ % stanica (slika 29.).



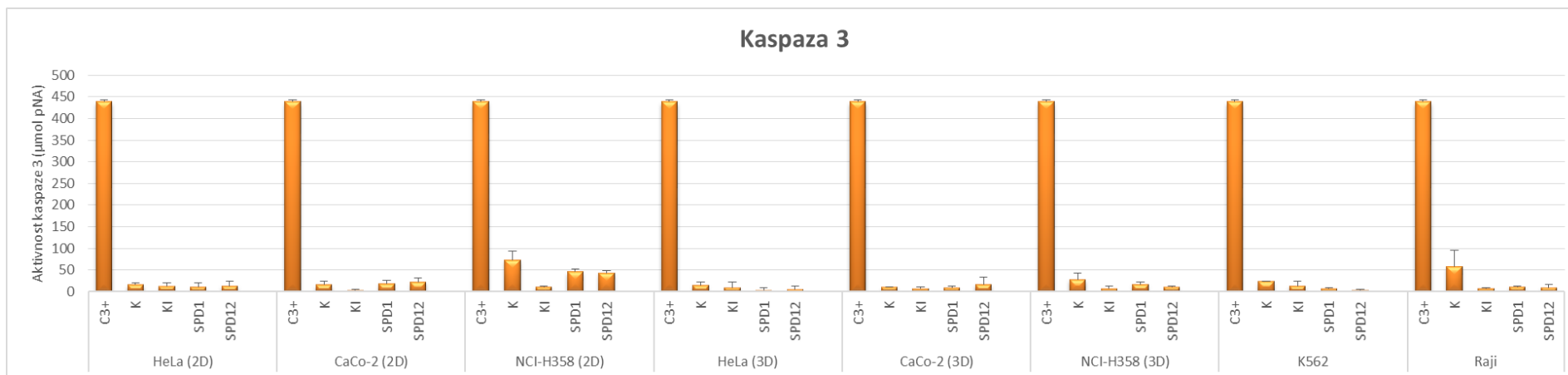


Slika 29.: Indukcija apoptoze u Raji stanicama tretiranim sa SPD1 i SPD12. Raji stanice izložene su djelovanju SPD1 i SPD12 derivata u vremenu inkubacije od 24 sata. Slika prikazuje a) netretirane stanice, b) stanice tretirane sa SPD1 u koncentraciji od 5×10^{-6} M i c) stanice tretirane sa SPD12 u koncentraciji od 5×10^{-6} M, gdje su stanice u Q1 dvostruko pozitivne, u Q2 pozitivne na PI, u Q3 pozitivne na aneksin V i u Q4 dvostruko negativne. Udio stanica u pojedinom kvadrantu prikazan je grafički u obliku stupaca formiranih od aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama. Statistički značajna P vrijednost definirana je $P < 0,05$ (*).

5.8. Određivanje katalitičke aktivnosti kaspaze 3

Katalitička aktivnost izvršne kaspaze 3 određena je nakon 24 satne inkubacije sa SPD1 i SPD12 kolorimetrijskom metodom u staničnom lizatu stanica karcinoma uzgojenih u 2D i 3D kulturi stanica, te u K562 leukemijskoj staničnoj liniji i Raji stanicama limfoma. Katalitička aktivnost kaspaze 3 određena je prema pNA standardnoj krivulji u odnosu na komercijalno dostupnu pozitivnu kontrolu kaspaze 3.

Aktivacija kaspaze 3 kao unutarstaničnog odgovora na djelovanje SPD1 i SPD12 derivata nije zamijećena u testiranim stanicama po isteku vremena inkubacije od 24 sata (slika 30.). Pozitivna kontrola pokazuje daleko veću koncentracijsku izraženost u odnosu na stanice koje su tretirane sa SPD1 i SPD12 derivatima. Ne postoji značajna razlika u aktivnosti kaspaze 3 između testiranih stanica. NCI-H358 stanice uzgojene u 2D kulturi pokazuju povišenu aktivnost kaspaze 3 u odnosu na ostale stanice, koja je daleko ispod aktivnosti C3+. Sama aktivnost kaspaze 3 u tretiranim NCI-H358 stanicama jednaka je kao i u kontrolnim netretiranim stanicama.

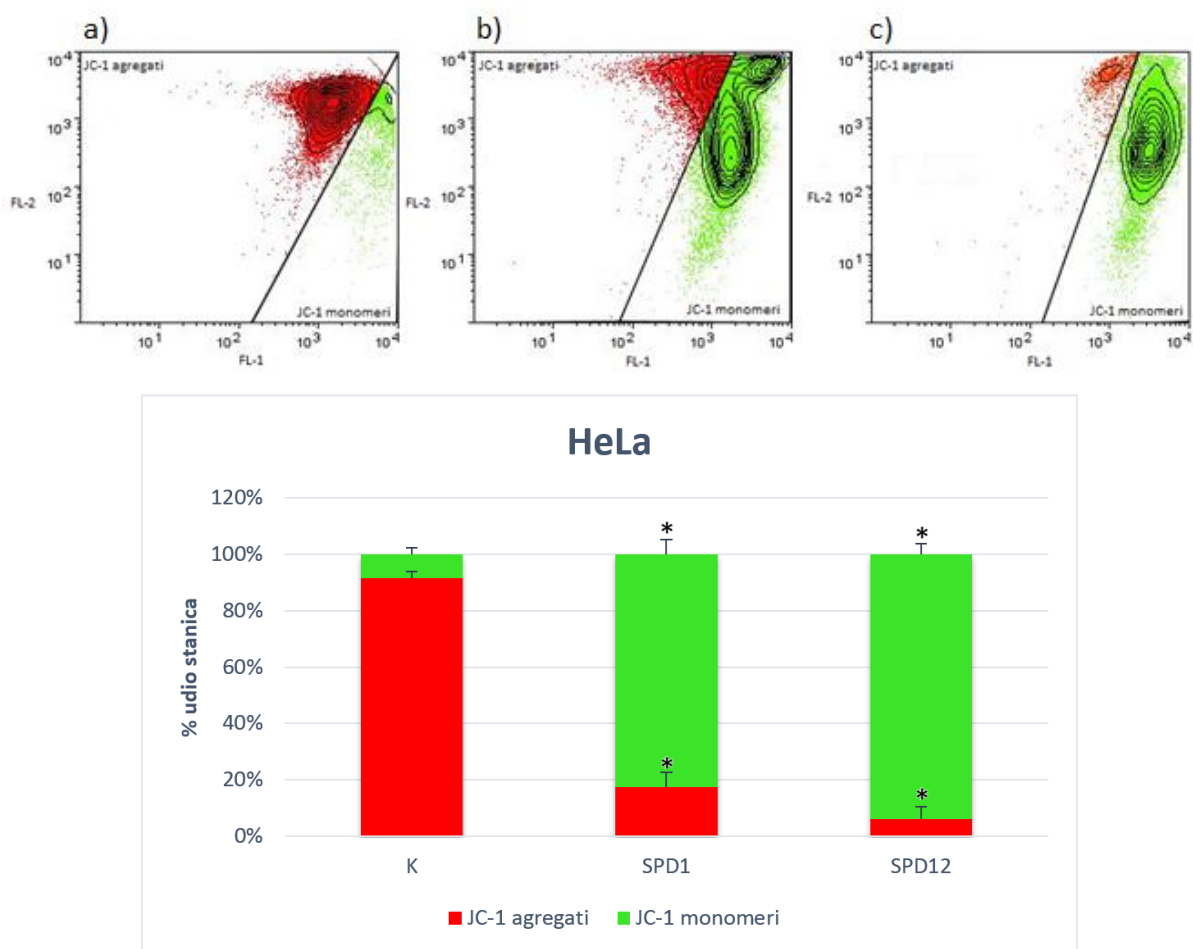


Slika 30.: Katalitička aktivnost kaspaze 3 u staničnom lizatu stanica karcinoma (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358) uzgojenih u 2D i 3D kulturi stanica, te u leukemijskim K562 stanicama i Raji stanicama limfoma. Stanice su izložene djelovanju SPD1 i SPD12 derivata u koncentracijama od 1×10^{-5} M za karcinome i 5×10^{-6} M za stanice limfoma i leukemija kroz 24 sata. Pozitivna (C3+) i negativna (KI) komercionalno su dostupna u kitu, dok kontrolne (K) stanice predstavljaju netretirane stanice. Rezultati predstavljaju srednju aritmetičku vrijednost sa \pm SD vrijednosti triju ponavljanja

5.9. Određivanje promjene u mitohondrijskom potencijalu

Promjena mitohondrijskog potencijala ($\Delta\Psi_m$) u stanicama HeLa, K562 i Raji izloženim derivatima SPD1 i SPD12 određena je mjerenjem fluorescencije JC-1 boje ovisno o promjeni mitohondrijskog potencijala. U netaknutim stanicama s visokim $\Delta\Psi_m$, JC-1 stvara agregate koji daju crveni signal. Za razliku od njih, u stanicama u kojima je narušen integritet mitohondrijske membrane i nizak je $\Delta\Psi_m$, JC-1 stvara monomere koji daju zeleni signal.

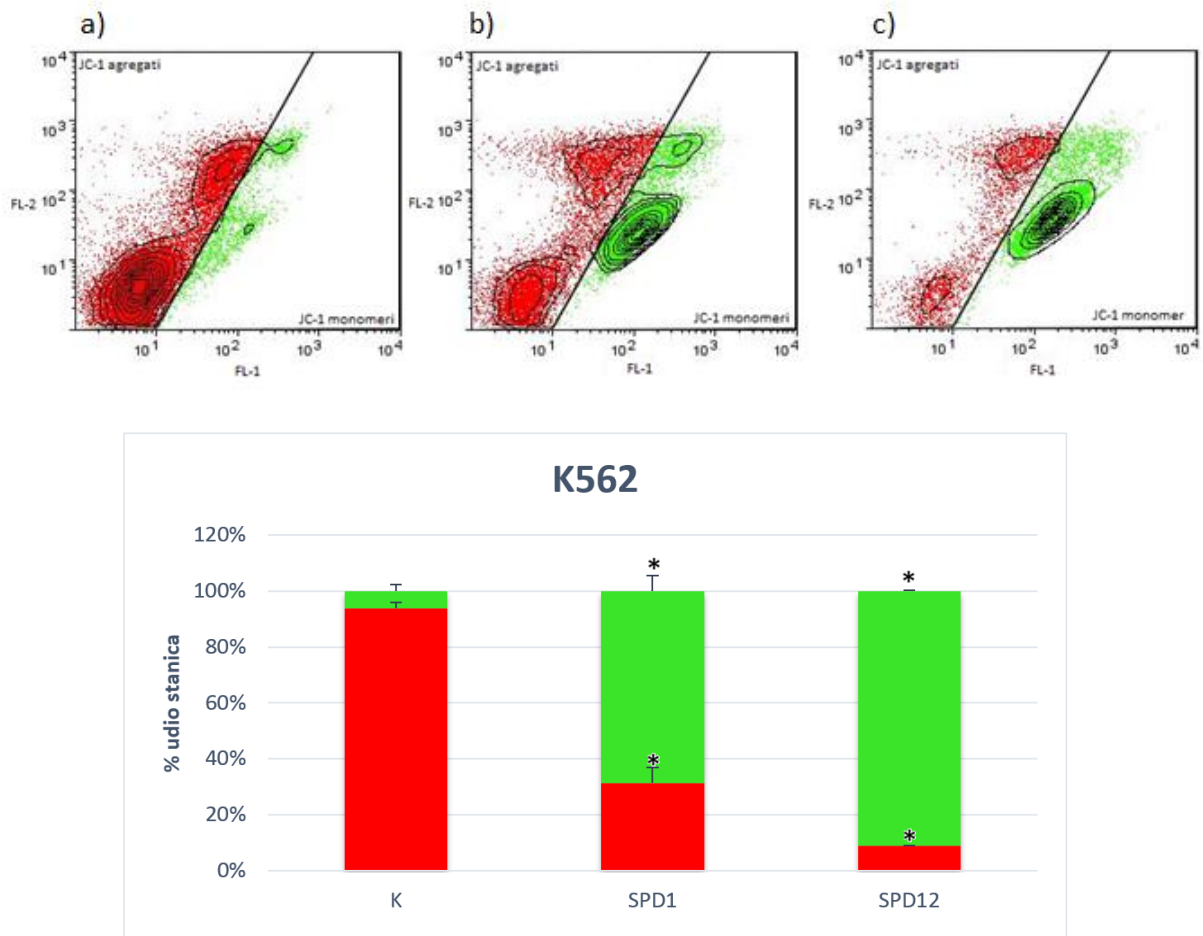
SPD1 derivat uzrokuje promjenu $\Delta\Psi_m$ u $82,7 \pm 5,37$ % HeLa stanica, s poštednim učinkom na $17,4 \pm 5,44$ % stanica. Jači učinak uočava se djelovanjem SPD12 kada je u većini HeLa stanica došlo do promjene u $\Delta\Psi_m$ ($93,9 \pm 3,82$ %) (slika 31.).



Slika 31.: Određivanje promjene u mitohondrijskom potencijalu ($\Delta\Psi_m$) HeLa stanica tretiranih sa SPD1 i SPD12 derivatima nakon inkubacije od 24 sata. Slika prikazuje a) netretirane stanice, b) stanice tretirane sa SPD1 u koncentraciji od 1×10^{-5} M i c) stanice tretirane sa SPD12 u koncentraciji od 1×10^{-5} M. JC-1 agregati s crvenom fluorescencijom predstavljaju netaknute mitohondrije (FL-2 kanal) i JC-1 monomeri sa zelenom fluorescencijom predstavljaju narušene mitohondrije (FL-1 kanal). Raspodjela

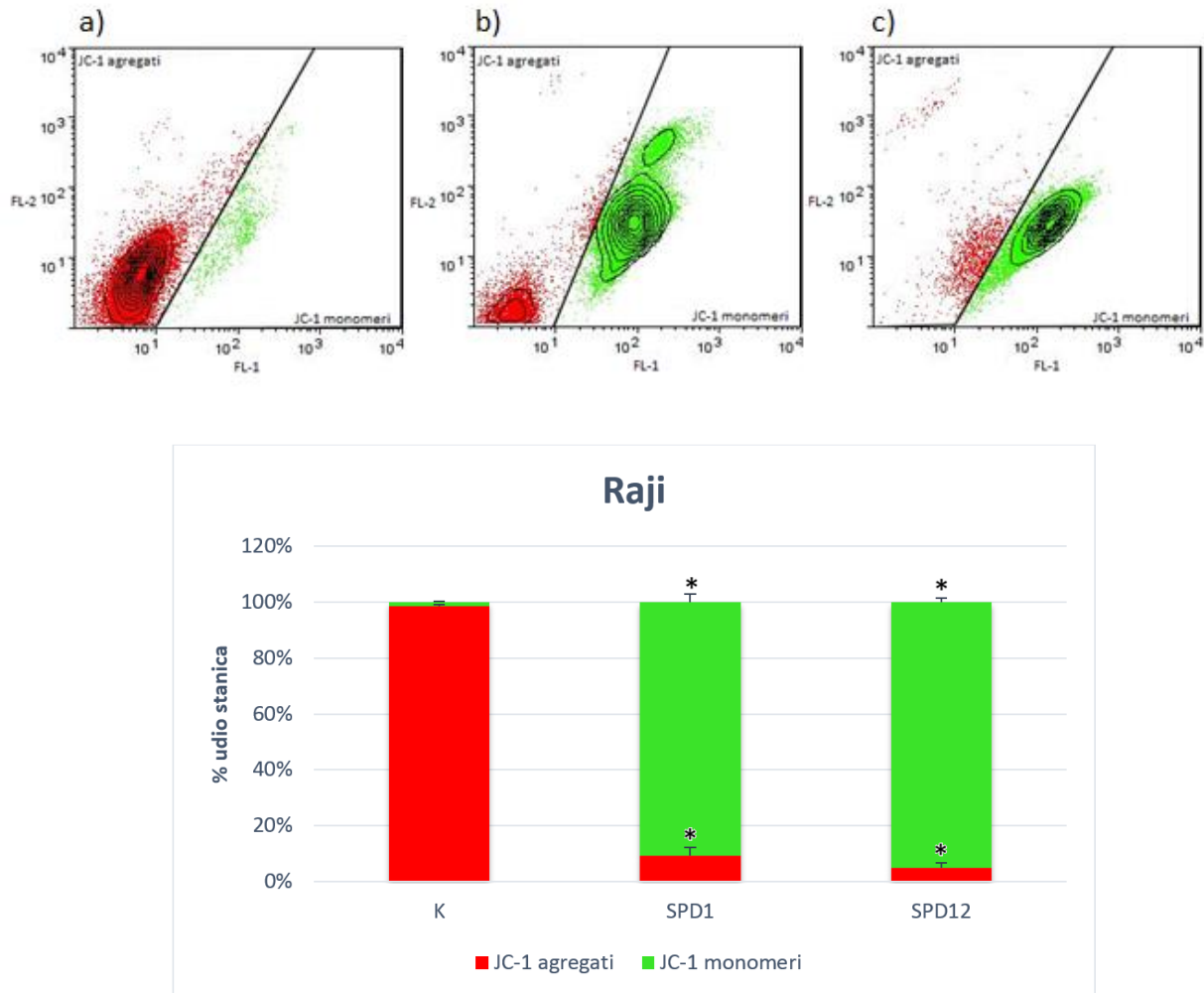
stanica između JC-1 agregata i JC-1 monomera prikazana je u grafičkom obliku. Statistički značajna P vrijednost definirana je $P < 0,05$ (*).

Uočava se narušen ($\Delta\Psi_m$) od $68,6 \pm 5,44$ % u K562 stanicama djelovanjem SPD1 derivata, s pošteđim učinkom na $31,5 \pm 5,44$ % stanica. Derivat SPD12 pokazuje znatno veći učinak s $91,2 \pm 0,21$ % narušenim ($\Delta\Psi_m$) u stanicama (slika 32.).



Slika 32.: Određivanje promjene u mitohondrijskom potencijalu ($\Delta\Psi_m$) K562 stanica tretiranih sa SPD1 i SPD12 derivatima nakon inkubacije od 24 sata. Slika prikazuje a) netretirane stanice, b) stanice tretirane sa SPD1 u koncentraciji od 5×10^{-6} M i c) stanice tretirane sa SPD12 u koncentraciji od 5×10^{-6} M. JC-1 agregati s crvenom fluorescencijom predstavljaju netaknute mitohondrije (FL-2 kanal) i JC-1 monomeri sa zelenom fluorescencijom predstavljaju narušene mitohondrije (FL-1 kanal). Raspodjela stanica između JC-1 agregata i JC-1 monomera prikazana je u grafičkom obliku. Statistički značajna P vrijednost definirana je $P < 0,05$ (*).

U Raji stanicama nakon aplikacije SPD1 derivata dolazi do narušavanja ($\Delta\Psi_m$) u $95,1 \pm 2,97\%$, sa sličnim djelovanjem SPD12 derivata kada je u $90,1 \pm 1,41\%$ stanica narušen ($\Delta\Psi_m$). Manje od 10% stanica nepromijenjenog je potencijala ($\Delta\Psi_m$) (slika 33.).

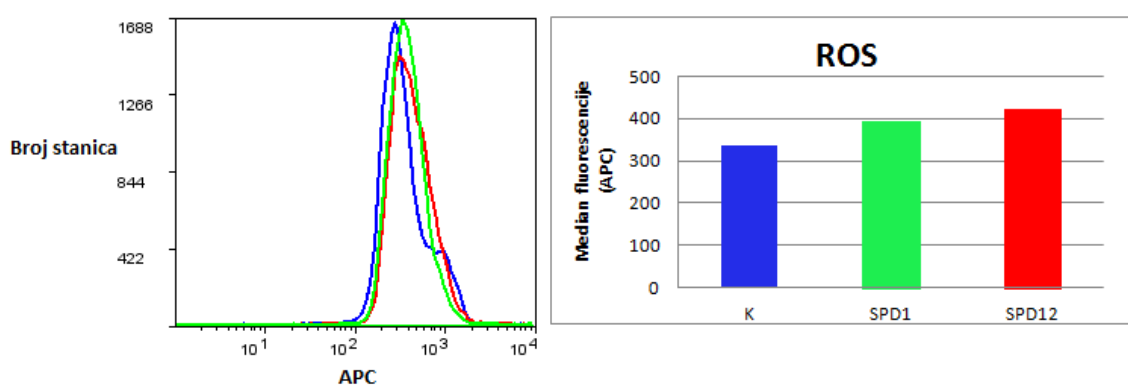


Slika 33.: Određivanje promjene u mitohondrijskom potencijalu ($\Delta\Psi_m$) Raji stanica tretiranih sa SPD1 i SPD12 derivatima nakon inkubacije od 24 sata. Slika prikazuje a) netretirane stanice, b) stanice tretirane sa SPD1 u koncentraciji od 5×10^{-6} M i c) stanice tretirane sa SPD12 u koncentraciji od 5×10^{-6} M. JC-1 agregati s crvenom fluorescencijom predstavljaju netaknute mitohondrije (FL-2 kanal) i JC-1 monomeri sa zelenom fluorescencijom predstavljaju narušene mitohondrije (FL-1 kanal). Raspodjela stanica između JC-1 agregata i JC-1 monomera prikazana je u grafičkom obliku. Statistički značajna P vrijednost definirana je $P < 0,05$ (*).

5.10. Određivanje unutarstaničnog stresa

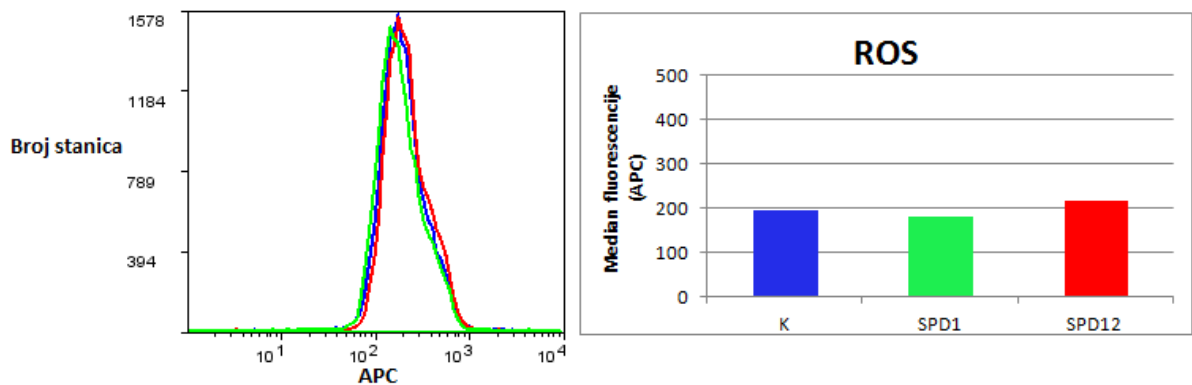
Unutarstanično nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) koje je proporcionalno stresu u stanici određeno je nakon izlaganja HeLa, K562 i Raji stanica derivatima SPD1 i SPD12 tijekom 1 sata.

Tretirane HeLa stanice sa SPD1 i SPD12 derivatima odražavaju jaču fluorescenciju što ujedno predstavlja povećano nakupljanje ROS unutar stanice u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. U stanicama izloženim SPD12 veće su koncentracije ROS u odnosu na stanice izložene SPD1 derivatu (slika 34.).



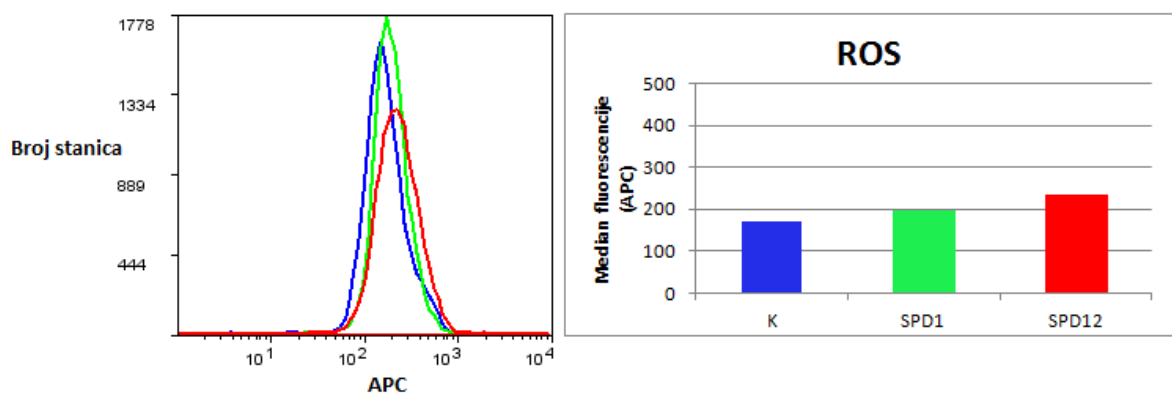
Slika 34.: Određivanje unutarstaničnog stresa u HeLa stanicama izloženim djelovanju SPD1 i SPD12 derivata. Derivati su testirani u koncentraciji od 1×10^{-5} M za HeLa stanice koje su nasađene u koncentraciji od 5×10^5 stanica/ml u PBS-u. Histogram fluorescencije prikazan je u grafičkom obliku median vrijednosti gdje su plavom bojom označene kontrolne (netretirane) stanice, zelenom stanice tretirane sa SPD1 i crvenom stanice tretirane sa SPD12.

Uočava se blagi porast ROS-a unutar K562 stanica nastao djelovanjem SPD12 u odnosu na kontrolne stanice, dok je niža koncentracija ROS-a uočena u stanicama izloženim SPD1 (slika 35.).



Slika 35.: Određivanje unutarstaničnog stresa u K562 stanicama izloženim djelovanju SPD1 i SPD12 derivata. Derivati su aplicirani u koncentraciji od 5×10^{-6} M na K562 stanice koje su nasađene u koncentraciji od 5×10^5 stanica/ml u PBS-u. Histogram fluorescencije prikazan je u grafičkom obliku median vrijednosti gdje su plavom bojom označene kontrolne (netretirane) stanice, zelenom stanice tretirane sa SPD1 i crvenom stanice tretirane sa SPD12.

Kao i u stanicama HeLa i K562, u stanicama Raji uočeno je veće nakupljanje ROS-a nakon aplikacije SPD12 u odnosu na stanice izložene SPD1 (slika 36.).



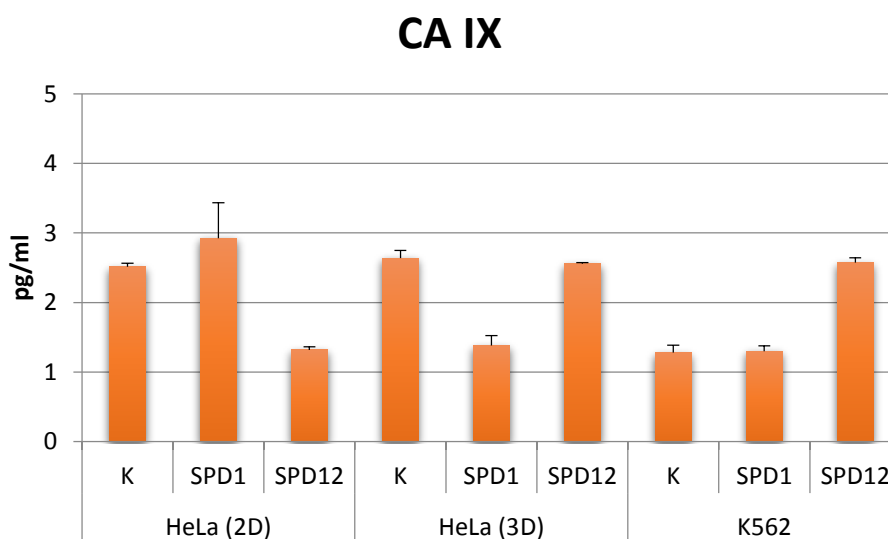
Slika 36.: Određivanje unutarstaničnog stresa u Raji stanicama izloženim djelovanju SPD1 i SPD12 derivata. Derivati su aplicirani u koncentraciji od 5×10^{-6} M za Raji stanice koje su nasađene u koncentraciji od 5×10^5 stanica/ml u PBS-u. Histogram fluorescencije prikazan je u grafičkom obliku median vrijednosti gdje su plavom bojom označene kontrolne (netretirane) stanice, zelenom stanice tretirane sa SPD1 i crvenom stanice tretirane sa SPD12.

5.11. Određivanje katalitičke aktivnosti ugljične anhidraze CA IX

Katalitička aktivnost CA IX određena je ELISA metodom u supernatantu HeLa stanične kulture uzgojene u 2D i 3D kulturi stanica te K562 staničnoj kulturi. Stanice su inkubirane kroz 24 sata sa SPD1 i SPD12 derivatima.

Katalitička aktivnost CA IX različita je i ovisna o staničnoj liniji. Tako je izmjerena katalitička aktivnost u netretiranim kontrolnim HeLa stanicama viša od 2 pg/ml za razliku od netretiranih kontrolnih K562 stanica s aktivnošću CA IX od 1,3 pg/ml. Nije uočena razlika u katalitičkoj aktivnosti CA IX između HeLa stanica uzgojenih u 2D i u 3D kulturi (slika 37.).

Odabarani SPD1 i SPD12 različito utječu na katalitičku aktivnost CA IX u HeLa stanicama uzgojenim u 2D i 3D kulturi. U stanicama tretiranim s derivatom SPD1 uočena je blago povišena katalitička aktivnost CA IX u HeLa (2D) stanicama od 2,9 pg/ml u odnosu na kontrolne netretirane stanice, za razliku od stanica tretiranih sa SPD12 derivatom kod kojih je za oko 50 % smanjena katalitička aktivnost ovog enzima 1,3 pg/ml. HeLa stanični sferoidi pokazuju smanjenu aktivnost CA IX 1,4 pg/ml nakon tretmana sa SPD1 derivatom, dok djelovanje SPD12 derivata ne doprinosi promjeni u aktivnosti CA IX u odnosu na kontrolne stanice. Učinak odabranih derivata na K562 stanice uočava se nakon tretmana sa SPD12 derivatom, dovodeći do značajno povišene katalitičke aktivnosti CA IX (gotovo 100 %).

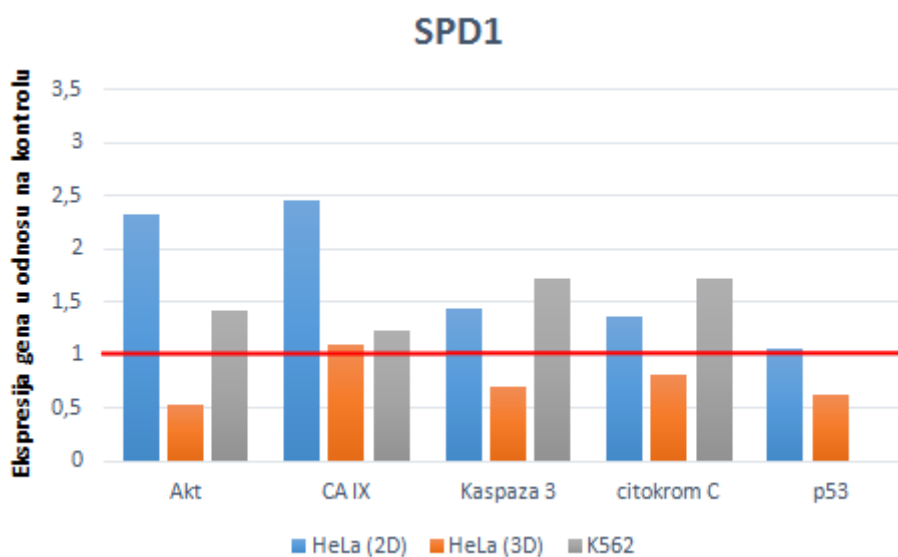


Slika 37.: Identifikacija katalitičke aktivnosti CA IX u HeLa i K562 stanicama nakon tretmana sa SPD1 i SPD12 derivatima. Derivati su aplicirani u koncentraciji od 1×10^{-5} M za HeLa stanice uzgojene u 2D i 3D kulturi, te za K562 stanice u koncentraciji od 5×10^{-6} M u periodu od 24 sata.

5.12. Kvantifikacija ekspresije gena RT-PCR metodom

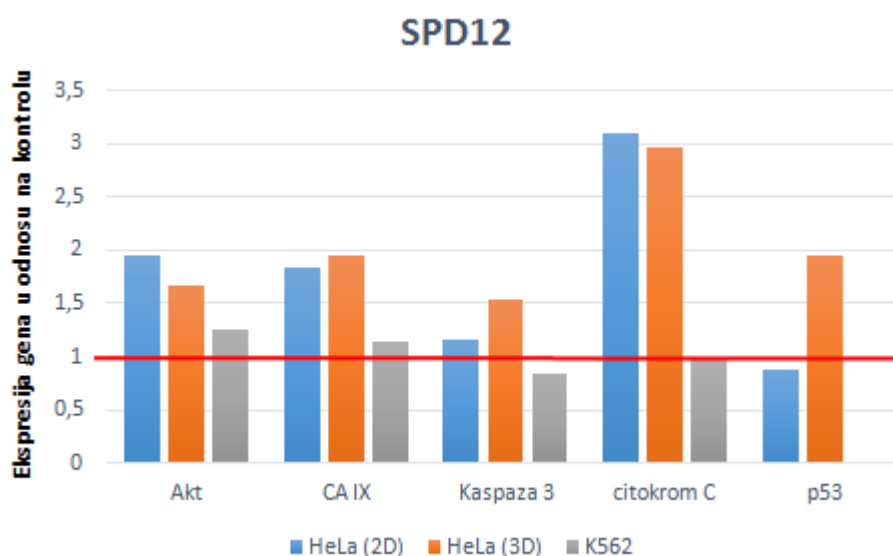
Učinak SPD1 i SPD12 derivata na ekspresiju gena *Akt*, *CA IX*, *kaspaze 3*, *citokrom C* i *p53* u stanicama 2D i 3D stanične linije HeLa i stanične linije K562 određen je RT-PCR metodom. Rezultati istraživanja pokazuju promjenu ekspresije gena u stanicama izloženim djelovanju istraživanih spojeva ovisno o vrsti stanice i načinu uzgoja.

U 2D HeLa stanicama izloženim derivatu SPD1 došlo je do povećanja ekspresije *Akt* i *CA IX* gena, dok je uočena snižena ekspresija *Akt* gena u HeLa staničnim sferoidima. Ekspresija gena *CA IX* u 3D HeLa kulturi stanica u razini je ekspresije kontrolnih stanica. Ekspresija gena *kaspaze 3* i gena *citokroma C* podjednako je povišena u 2D HeLa kulturi odnosno snižena u 3D HeLa kulturi. Djelovanje SPD1 na ekspresiju *p53* gena nije dovelo do promjena u 2D kulturi HeLa stanica, dok je ekspresija drastično snižena u 3D HeLa kulturi stanica. U K562 stanicama uočena je neznatno povišena ekspresija *CA IX* gena te značajno povišenje ekspresije *Akt*, *kaspaze 3* i *citokroma C* (slika 38.).



Slika 38.: Ekspresija gena *Akt*, *CA IX*, *kaspaze 3*, *citokroma C* i *p53* nakon izlaganja SPD1 derivatu u koncentraciji od 5×10^{-6} M za HeLa stanice uzgojene u 2D i 3D kulturi, te za K562 stanice u koncentraciji od 2×10^{-6} M u periodu od 24 sata. Rezultati ekspresije testiranih gena normalizirani su prema genu *GAPDH*. Ekspresija u kontrolnim stanicama prikazana je kao crveni pravac.

Djelovanje SPD12 derivata odrazilo se u povišenoj ekspresiji svih testiranih gena u 3D kulturi HeLa stanica. U 2D kulturi HeLa stanica najviše se ekspimirao gen za *citokrom C*, dok je razina ekspresije *Akt* i *CA IX* gena podjednako ekspimirana. Nadalje, u 2D kulturi HeLa stanica nakon izlaganja derivatu SPD12 blago je snižena ekspresija *p53* gena i neznatno povišena ekspresija *kaspaze 3*. U K562 stanicama izloženim derivatu SPD12 učena je blago povišena ekspresija *Akt* i *CA IX* gena, ekspresija je *citokrom C* gena nepromijenjena. U tretiranim K562 stanicama uočena je snižena ekspresija *kaspaze 3* (slika 39.).



Slika 39.: Ekspresija gena *Akt*, *CA IX*, *kaspaze 3*, *citokroma C* i *p53* nakon izlaganja SPD12 derivatu u koncentraciji od 5×10^{-6} M za HeLa stanice uzgojene u 2D i 3D kulturi, te za K562 stanice u koncentraciji od 2×10^{-6} M u periodu od 24 sata. Rezultati ekspresije testiranih gena normalizirani su prema genu *GAPDH*. Ekspresija u kontrolnim stanicama prikazana je kao crveni pravac.

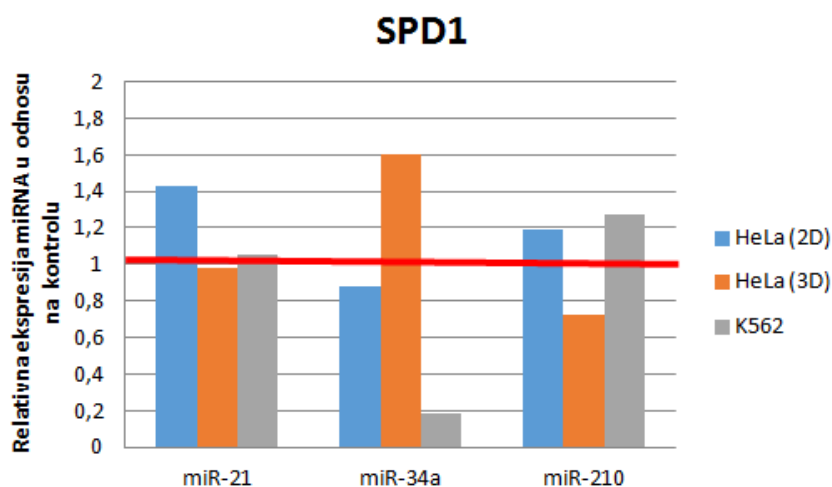
5.13. Ekspresija miRNA u HeLa i K562 staničnim linijama

Relativna ekspresija miR-21, miR-34a i miR-210 određena je TaqMan tehnologijom u HeLa stanicama uzgojenih u 2D i 3D kulturi, kao i u K562 staničnoj liniji. Nakon tretmana stanica sa SPD1 i SPD12 derivatima iz stanica je izolirana ukupna RNA koja je prepisana u cDNA

te je lančanom reakcijom polimeraze određena Ct (*eng. cycle threshold*) vrijednost odabranih miRNA.

MiR-25 i miR-95 odabrane su kao domaćinski geni (*eng. housekeeping gene*) za normalizaciju dobivenih rezultata. Normalizacija rezultata napravljena je prema miR-25 koja je odabrana na temelju nižeg koeficijenta varijance od 2,3 % u odnosu na miR-95 s koeficijentom varijance od 3,1 %.

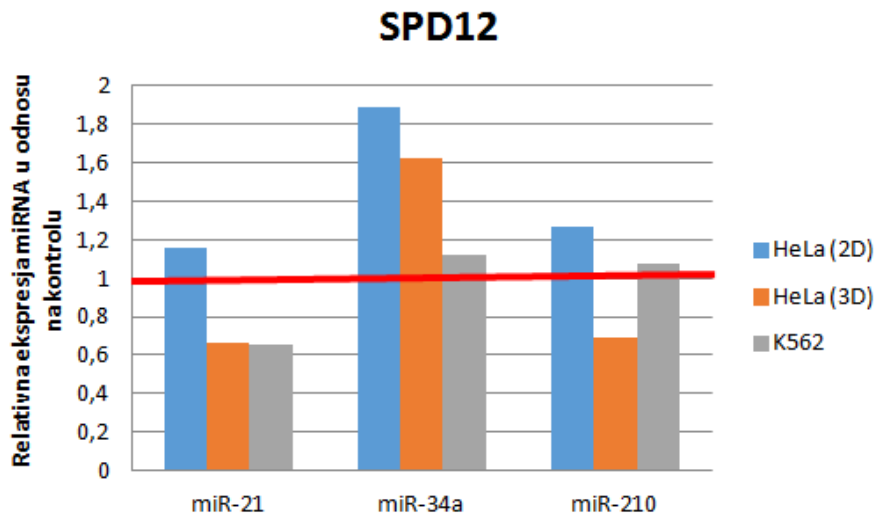
Povišena ekspresija miR-21 nakon tretmana sa SPD1 derivatom uočava se u HeLa stanicama uzgojenim u 2D kulturi stanica, dok nije došlo do promjene u ekspresiji miR-21 u HeLa stanicama uzgojenim u 3D kulturi i K562 stanicama. Djelovanje SPD1 značajno djeluje na promjenu u ekspresiji miR-34a s povišenom ekspresijom u HeLa (3D) stanicama i sniženom ekspresijom u HeLa (2D) i K562 stanicama. Ekspresija miR-210 odražava se s povišenom razinom u HeLa (2D) i K562 stanicama, te sniženom ekspresijom u HeLa staničnim sferoidima. Usporedna ekspresija miRNA u HeLa stanicama uzgojenim u 2D i 3D kulturi stanica odražava se kroz suprotnu ekspresiju ovisno o proučavanoj miRNA (slika 40).



Slika 40.: Relativna ekspresija miRNA u HeLa i K562 stanicama nakon tretmana sa SPD1 derivatom. SPD1 je apliciran u koncentraciji od 5×10^{-6} M za HeLa stanice uzgojene u 2D i 3D kulturi, te za K562 stanice u koncentraciji od 2×10^{-6} M u periodu od 24 sata. Normalizacija ekspresije napravljena je prema miR-25. Crveno označeni pravac predstavlja kontrolne netretirane stanice.

Djelovanje SPD12 derivata na ekspresiju miR-21 odražava se povišenom ekspresijom u HeLa stanicama uzgojenim u 2D kulturi, sa sniženom ekspresijom u HeLa sferoidima i K562

stanicama. Povećana ekspresija miR-34a ispoljava se u svim tretiranim stanicama nakon aplikacije SPD12 derivata. Ekspresija miR-210 nakon tretmana stanica s derivatom odražava se s povišenom ekspresijom u HeLa (2D) i sniženom ekspresijom u HeLa (3D) stanicama (slika 41.).



Slika 41.: Relativna ekspresija miRNA u HeLa i K562 stanicama nakon tretmana sa SPD12 derivatom. SPD1 je apliciran u koncentraciji od 5×10^{-6} M za HeLa stanice uzgojene u 2D i 3D kulturi, te za K562 stanice u koncentraciji od 2×10^{-6} M u periodu od 24 sata. Normalizacija ekspresije napravljena je prema miR-25. Crveno označena pravac predstavlja kontrolne netretirane stanice.

5.14. Identifikacija proteina

Ekspresija pojedinih proteina ključnih u reguliranju stanične smrti provedena je na stanicama karcinoma uzgojenih u 2D i 3D kulturi stanica, kao i u K562 leukemijskim stanicama i Raji stanicama limfoma. Stanice su tretirane tijekom 24 sata nakon čega su izolirani proteini iz stanica. Imunokemijskom detekcijom za pojedini protein denzitometrijski je određena relativna gustoća pojedinih vrpca.

Western blot analiza pokazala je ekspresiju p53 u 2D kulturi CaCo-2 stanica s mutiranim p53 (75). S obzirom na tretman uočava se niža ekspresija p53 proteina u stanicama izloženim djelovanju SPD1 u odnosu na kontrolne, netretirane stanice, dok nakon izlaganja derivatu SPD12 nije uočena razlika u ekspresiji p53. (slika 42 b). Protein p53 u CaCo-2 staničnim

sferoidima najviše se eksprimira nakon tretmana sa SPD1 derivatom, dok je suprotan učinak ostvaren nakon tretmana sa SPD12 derivatom gdje ekspresija p53 nije zamijećena (slika 43 b). Ekspresija p53 nije zabilježena pomoću primijenjenog kromogenog supstrata u HeLa (2D i 3D) stanicama koje izražavaju slabu ekspresiju mutiranog p53 (slika 42 i 43 a). Učinkovitija detekcija p53 proteina u HeLa stanicama bila bi ostvarena primjenom kemiluminiscentnog supstrata za HRP obilježeno sekundarno protutijelo, što ujedno predstavlja osjetljiviju metodu detekcije. Ekspresija p53 nije zabilježena u Raji stanicama. Smatramo da je razlog za to nedovoljno osjetljiva metoda detekcije.

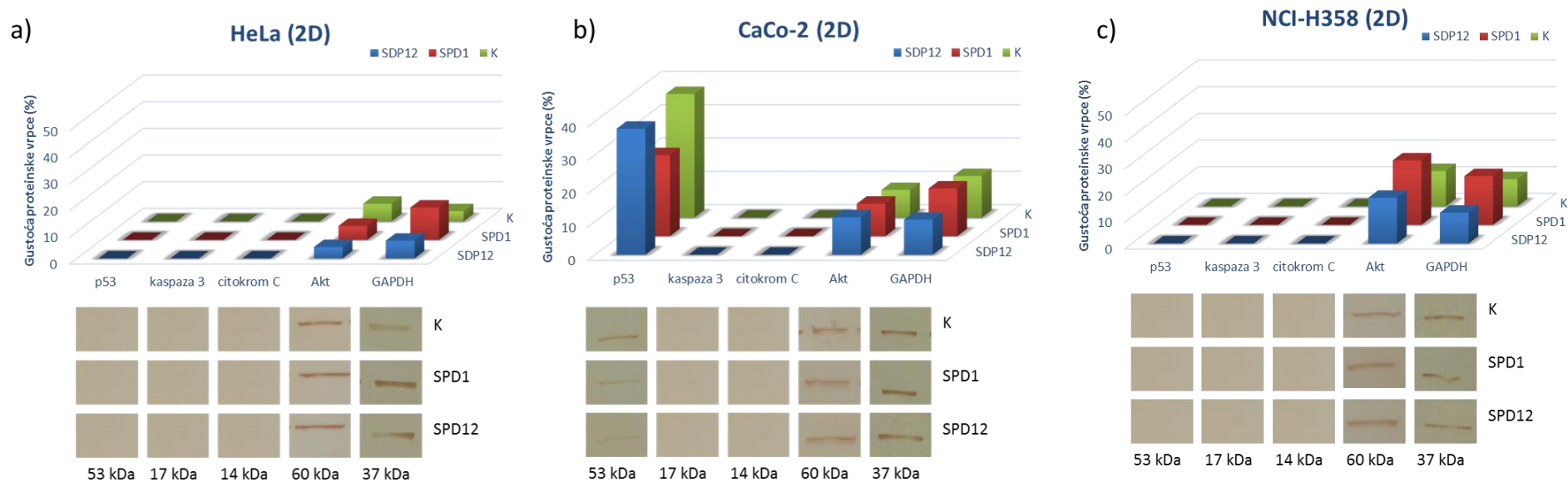
U stanicama NCI-H358 kod kojih se ne eksprimira p53 protein (76) nije ni zabilježena p53 vrpca (slika 42 i 43 c). Za K562 stanice karakteristična je mutacija koja ima za posljedicu inaktivaciju gena za *p53* gen (77) što je u skladu s dobivenim rezultatima.

Ekspresija proteina kaspaze 3 nije zabilježena u testiranim stanicama što je u korelaciji s određivanjem katalitičke aktivnosti kaspaze nakon 24 satne inkubacije sa SPD1 i SPD12 derivatima.

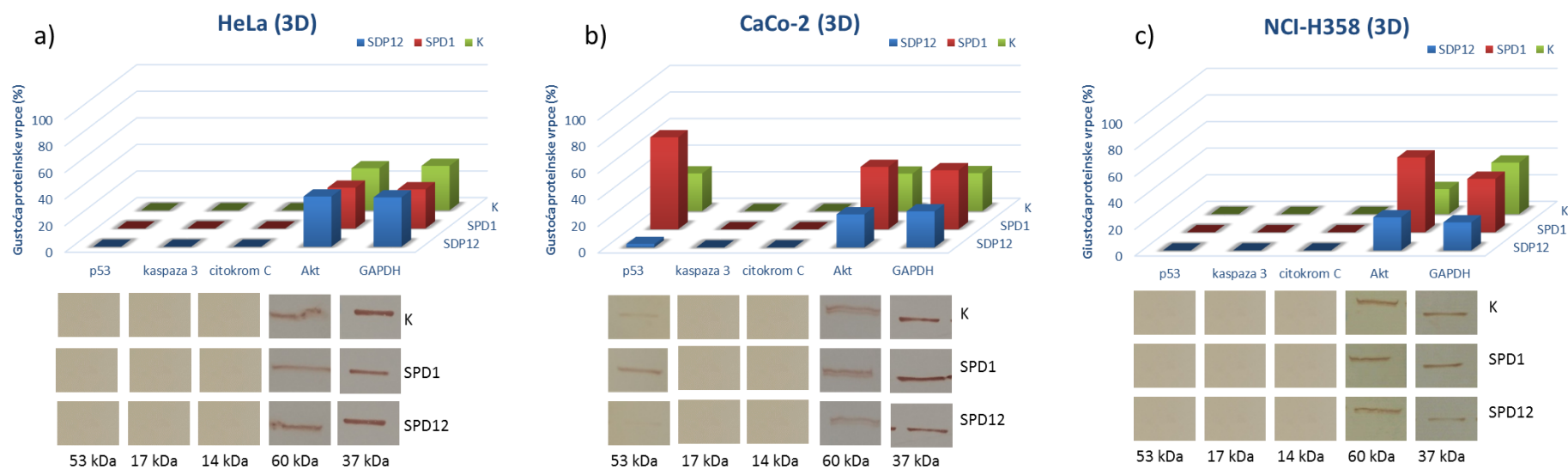
Primijenjena metoda detekcije pokazala se nedovoljno osjetljivom za detekciju proteina citokroma c čija je veličina svega 14 kDa.

Zabilježena je ekspresija Akt proteina u kontrolnim stanicama karcinoma uzgojenih u 2D kulturi stanica tretiranim sa SPD1 i SPD12 derivatima. Nakon tretmana 2D HeLa i 2D CaCo-2 stanica sa SPD1 i SPD12 derivatima, nije uočena značajnija promjena u razini ekspresije Akt proteina u odnosu na netretirane stanice. Aplicirani SPD1 na NCI-H358 (2D) izazvao je blago povišenu ekspresiju Akt proteina u odnosu na kontrolne stanice.

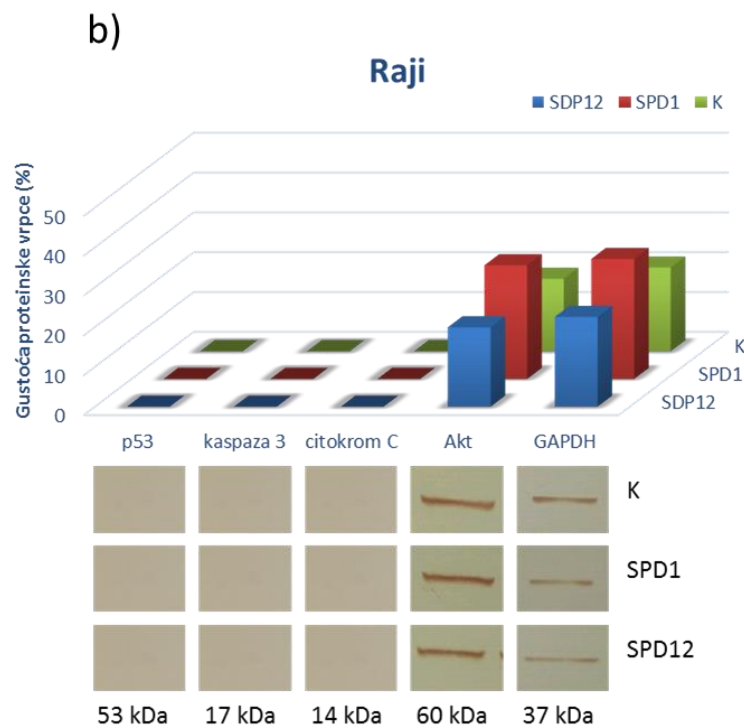
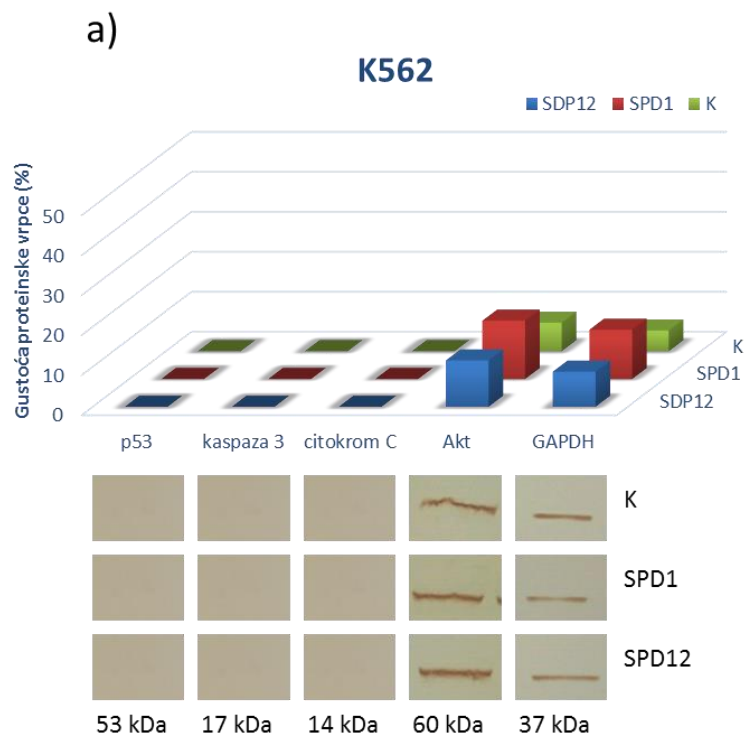
Uočava se blago povišena razina ekspresije Akt proteina u sferoidima NCI-H358 stanica nakon tretmana sa SPD1 derivatom (slika 43 c). Sličan rezultat vidljiv je nakon aplikacije SPD1 na CaCo-2 sferoide, dok razina Akt proteina nakon aplikacije SPD12 dovodi do neznatno snižene ekspresije u odnosu na kontrolne stanice (slika 43 b). Sferoidi HeLa stanica ne odražavaju promjene u ekspresiji Akt proteina (slika 43 a). Ekspresija Akt-a odražava isti obrazac ponašanja u K562 i Raji stanicama s povećanom ekspresijom nakon aplikacije SPD1 (slika 44.).



Slika 42. Identifikacija proteina u stanicama karcinoma uzgojenih u 2D kulturi stanica. Stanice su tretirane sa SPD1 i SPD12 derivatima u finalnoj koncentraciji od 5×10^{-6} M kroz 24 sata. Proteini su najprije izdvojeni SDS-gel elektroforezom, te potom preneseni na PVDF membranu. Proteinske vrpce vizualizirane su kromatografskom metodom koristeći DAB tablete. Densitometrijom je određena gustoća proteinskih vrpce pomoću ImageJ programa.



Slika 43. Identifikacija proteina u stanicama karcinoma uzgojenih u 3D kulturi stanica. Stanice su tretirane sa SPD1 i SPD12 derivatima u finalnoj koncentraciji od 5×10^{-6} M kroz 24 sata. Proteini su najprije izdvojeni SDS-gel elektroforezom, te potom preneseni na PVDF membranu. Proteinske vrpce vizualizirane su kromatografskom metodom koristeći DAB tablete. Densitometrijom je određena gustoća proteinskih vrpce pomoću ImageJ programa.



Slika 44. Identifikacija proteina u K562 leukemijskim stanicama i Raji stanicama limfoma. Stanice su tretirane sa SPD1 i SPD12 derivatima u finalnoj koncentraciji od 2×10^{-6} M kroz 24 sata. Proteini su najprije izdvojeni SDS-gel elektroforezom, te potom preneseni na PVDF membranu. Proteinske vrpce vizualizirane su kromatografskom metodom koristeći DAB tablete. Denzitometrijom je određena gustoća proteinskih vrpce pomoći ImageJ programa.

6. RASPRAVA

Tumorska oboljenja jedan su od vodećih uzročnika smrtnosti ljudske populacije i teško ih je liječiti zbog velike genske i fenotipske raznolikosti i iz tog razloga potrebno je sintetizirati male organske molekule koje za mjesto djelovanja ciljaju makromolekule važne za funkciju tumorskih stanica. Modificirane nukleobaze svoju aktivnost ostvaruju molekularnom sličnošću s prirodnim nukleobazama što im omogućuje olakšan ulazak u tumorske stanice. Unutar tumorskih stanica analozi nukleobaza (78 – 81) i nukleozidni analozi ponašaju se kao antimetaboliti koji koriste stanični metabolizam radi narušavanja višestruko kontroliranih signala za proliferaciju, što dovodi do propadanja i smrti tumorskih stanica (82).

Na temelju rezultata dobivenih u prethodnim istraživanjima (5, 83 – 85) novosintetizirani *N*-9-sulfonilpurinski derivati dizajnirani su na temelju dosadašnjih spoznaja o širokom spektru djelovanja nukleozidnih analoga kao farmakološki učinkovitih analoga purina i sulfonamida (78) i s ciljem postizanja usporavanja i potpunog zaustavljanja rasta tumorskih stanica uz minimalne toksične učinke na normalne stanice.

U ovom radu istražen je mehanizam inhibicije staničnog rasta djelovanjem novosintetiziranih *N*-9-sulfonilpurinskih derivata (SPD) *in vitro* na staničnim linijama karcinoma, limfoma i leukemija. Dobiveni rezultati pokazuju da novi derivati djeluju inhibicijski na rast testiranih stanica karcinoma (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358), leukemijskih stanica (K562, CCRF-CEM i MOLT4) i stanica limfoma (Raji i HuT-78), uz pretežno slabiji inhibicijski učinak na normalne BJ i MDCK1 stanice. Jače antiproliferativno djelovanje gotovo svih testiranih SPD derivata zabilježeno je na stanicama limfoma i leukemija sa značajno nižom vrijednošću IC_{50} u odnosu na normalne stanice i stanice karcinoma staničnih linija. Budući da se danas najčešće u liječenju akutne mijeloidne leukemije, kao i limfoidnih bolesti koriste purinski nukleozidi kladribin (2-CdA), sapacitab, citarabin i citarabin s dodatnim modifikacijama (86) koji djeluju kao antimetaboliti. Rezultati nedavno objavljenih studija pokazali su značajan ciljni učinak purinskih nukleozidnih derivata na usporavanje i zaustavljanje rasta tumorskih stanica *in vitro* i *in vivo* (81) na stanice limfoma i leukemija u odnosu na normalne stanice i stanice karcinoma što potvrđuje antiproliferativni potencijal modificiranih nukleobaza i nukleozida.

U ovoj studiji najjači inhibicijski učinak na proliferaciju stanica pokazali su derivati SPD1 i SPD12, s IC_{50} nižom od 35 μ M na svim testiranim staničnim linijama. Strukturalna

poveznica između ovih derivata sa specifičnim inhibicijskim učinkom na leukemijske stanice 9-stirilsulfonilna je skupina vezana na purinsku okosnicu. Kritična uloga sulfurilne strukture (SO_2X_2) i geometrijske konformacije radikala u antiproliferativnoj aktivnosti potvrđena je studijom u kojoj je analizirana povezanost strukture s aktivnošću (82). Značajnu ulogu stirilsulfonilne skupine u protutumorskom učinku pokazala su ispitivanja na stiril-benzil sulfonu (rigosertib) koji djeluje antimitotski preko zaustavljanja staničnog ciklusa u G2/M fazi i aktivacije apoptoze u tumorskim stanicama, s minimalnim posljedicama ili bez posljedica na normalne stanice (83).

Strukturno slični derivatu SPD1 koji se razlikuju po radikalu na 9H-purin-6-amin okosnici, derivati s 9-metilsulfonil (SPD11) i 9-tosil (SPD16) nisu pokazali značajniju inhibiciju stanične proliferacije. Okosnica za SPD12 derivat jest 6-morfolino-9H-purin (SPD14) koji kao takav značajno ne inhibira staničnu proliferaciju. Osim derivata SPD12, derivati SPD3 i SPD10 sadrže 6-morfolino-9H-purinsku okosnicu u svojoj strukturi te pokazuju inhibiciju stanične proliferacije. Derivat SPD7 s vezanim 9-tosil radikalom na 6-[N,N-bis(2-hidroksietil)amino]-purinsku okosnicu djeluje inhibicijski na staničnu proliferaciju s najjačim djelovanjem na stanicama limfoma CCRF-CEM. Iako derivati SPD5 i SPD13 sadrže istu okosnicu kao i SPD7 derivat, derivati nisu pokazali značajnu inhibiciju staničnog rasta. Djelovanje SPD7 derivata moglo bi se pripisati vezanom 9-tosil radikalu. Upravo je za kombinaciju tosila i sulfonamidina pokazano da imaju značajan citotoksični učinak i inhibicijski učinak na ugljičnu anhidrazu u stanicama karcinoma pluća (H-157) (87).

Uzgoj stanica u 3D kulturi dobar je model za biološka istraživanja s visokim potencijalom oponašanja stanica u fiziološkom okruženju unutar organizma (86, 87). Sukladno tome, za potrebe istraživanja antiproliferativnog učinka SPD1 i SPD12 derivata uzgojeni su stanični sferoidi od karcinomskih staničnih linija. Za uspostavljanje 3D kulture tumorskih stanica izabrane su HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 stanice koje posjeduju visoki potencijal formiranja sferoida (88 – 90). Pokazalo se da je optimalan broj stanica za formiranje sferoida kroz 72 sata 1×10^4 stanica/ml koje zadržavaju svoju formu u pokusu u periodu od dodatnih 24, 48 i 72 sata. HeLa sferoidni model odražava ponašanje tumorskog tkiva u *in vivo* uvjetima. Zabilježeno je usklađeno vrijeme udvostručavanja HeLa sferoida s *in vivo* solidnim tumorom, oponašajući kinetička svojstva rasta tumora u organizmu (90). Unutar sferoida zabilježena je graduirana raspodjela kisika i hranjivih tvari ovisno o veličini

sferoida, što u konačnici dovodi do stvaranja vanjske proliferativne zone i unutrašnje hipoksične/nekrotične zone (93).

Uzgoj stanica u monosloju najčešće je korišten model za otkrivanje i ranu karakterizaciju novih malih molekula koje predstavljaju dobre kandidate za daljnji razvoj protutumorskih lijekova. Iako dobar model za formiranje pregledne molekularne baze podataka s potencijalnim djelovanjem, ovakav model ne odražava patofiziologiju solidnih tumora. Naime, solidni tumori često pokazuju hipoksiju/nekrozu, sporu proliferaciju i neujednačenu difuziju lijekova što doprinosi stvaranju otpornosti na liječenje (94). Karlsson i suradnici testirali su standardne i pokusne lijekove na stanicama raka debelog crijeva. Jedan od testiranih lijekova bio je i 5-fluoruracil. Stanice su uzgojili u monosloju i u sferoidnom obliku te ih izložili djelovanju testnih spojeva. Dobiveni rezultati pokazuju stvaranje graduirane otpornosti stanica uzgojenih u 3D kulturi stanica (94). Slični rezultati dobiveni su u ovom radu gdje je usporedno testirano antiproliferativno djelovanje SPD1 i SPD12 derivata na stanice uzgojene u 2D i 3D kulturi i gdje su stanice u 3D kulturi pokazale smanjenu osjetljivost na tretman. Otpornost staničnih sferoida na tretman zabilježena je u svim testiranim staničnim linijama pri koncentraciji od 1×10^{-5} M. Primjetnu razliku u otpornosti pokazuju sferoidi formirani od NCI-H358 stanica u odnosu na ostale sferoide i pri testnoj koncentraciji derivata od 1×10^{-4} M. Generiranje veće otpornosti staničnih sferoida na testirane spojeve u odnosu na uzgoj stanica u monosloju nije moguće generalizirati. Istraživanja idu u smjeru izučavanja hipoksičnih uvjeta koji se stvaraju u središnjem dijelu formiranih sferoida većih od $200 \mu\text{m}$ što je u suglasnosti sa solidnim tumorima. Kao takvi hipoksični uvjeti utječu na promjenu biologije tumora, odnosno može doći do promjene u odgovoru na tretman (95). Hipoksija sudjeluje u promjeni stanične signalizacije preko tirozin kinaznog receptora, promičući ekspresiju gena koji smanjuju aktivnost apoptoze i djelujući na mehanizme popravka DNK (96).

Praćenjem učinka djelovanja SPD1 i SPD12 kontinuiranim mjerenjem otpuštenog LDH u okolnom mediju iz stanica s oštećenom membranom na testiranim stanicama tijekom 24 sata zabilježena je povećana inhibicija staničnog rasta pri koncentraciji od 1×10^{-5} M za HeLa stanice uzgajane u mediju s 1 % fetalnog goveđeg seruma (FBS). Otpušteni LDH u HeLa stanicama kao prvi znak nastalog oštećenja zamjećuje se već nakon 3 sata inkubacije sa SPD1 i SPD12, dok je maksimalno oštećenje nastalo već nakon 10 sati tretmana. Snižena

koncentracija FBS-a u mediju koji je glavni izvor hormonalnih faktora rasta i proliferacije stanica, minerala i elemenata u tragovima (97) uz primijenjene derivate SPD1 i SPD12 u koncentraciji 1×10^{-5} M pokazala se kritičnom za HeLa stanice. Značajno su osjetljivije na djelovanje testiranih 1×10^{-6} M derivata K562 stanice uzgojene u mediju sa sniženim udjelom seruma, u odnosu na stanice koje su rasle u mediju s uobičajenom koncentracijom FBS-a od 10 %. Ovaj rezultat može se objasniti činjenicom da uzgoj K562 stanica u mediju bez seruma dovodi do značajno smanjenog rasta stanica popraćenog nakupljanjem stanica u G_0/G_1 i smanjenjem stanica u S fazi staničnog ciklusa, te aktivacijom apoptoze nakon 24 satnog izgladnjivanja (98). Blagi skok u otpuštenom LDH uočen je nakon inkubacije stanica sa SPD1 u koncentraciji od 5×10^{-6} M za K562 stanice u periodu između 10 i 24 sata. Kontinuirano otpuštanje iste koncentracije LDH iz K562 stanica nakon inkubacije s 5×10^{-6} M SPD12 izmjereno je tijekom 24 sata. Raji stanična linija pokazuje dužu otpornost na oštećenje stanične membrane djelovanjem SPD1 i SPD12 pri koncentraciji od 5×10^{-6} M, te do oštećenja stanične membrane dolazi nakon 6 sati, popraćeno većim postotkom otpuštenog LDH koji se zadržava tijekom produženog vremena inkubacije. SPD1 i SPD12 pokazuju podjednak obrazac djelovanja na testnim stanicama u sličnoj koncentraciji LDH u mediju za uzgoj stanica.

Kako bi se rasvijetlio mehanizam djelovanja kojim odabrani *N*-9-sulfonilpurinski derivati djeluju inhibicijski na tumorski stanični rast, određeni su njihovi učinci na stanični ciklus tretiranih i kontrolnih netretiranih stanica. Nađeno je da oba ispitivana spoja mijenjaju progresiju tretiranih stanica kroz stanični ciklus u usporedbi s kontrolnim netretiranim stanicama. Djelovanje SPD1 na HeLa stanice odražava se povećanim brojem stanica u sub G_0 fazi i G_2/M fazi staničnog ciklusa, za razliku od učinaka SPD12 koji djeluje na HeLa stanice primarnim nakupljanjem stanica u sub G_0 fazi staničnog ciklusa s proporcionalnim smanjenjem zastupljenosti stanica u G_0/G_1 , S i G_2/M fazi staničnog ciklusa. Stanice koje se dominantno nakupljaju u sub G_0 fazi staničnog ciklusa stanice su s fragmentiranom DNA te predstavljaju stanice koje su ušle u apoptozu (97 – 99). Stanične linije K562 i Raji pokazuju podjednak obrazac preraspodjele stanica unutar faza staničnog ciklusa djelovanjem SPD1 i SPD12 derivata. Dolazi do nakupljanja stanica u apoptotičnoj zoni sub G_0 faze s primjetnim smanjenjem stanica u S i G_2/M fazi staničnog ciklusa.

Nedavno objavljene studije rađene na pirimidinskim i purinskim derivatima pokazale su da je regulacija staničnog ciklusa pod nadzorom ciklin ovisnih kinaza (CDK) koje

se povezuju s ciklinima prilikom prijelaza između pojedinih faza staničnog ciklusa omogućavaju proliferaciju stanice. Mojzych i suradnici (102) okarakterizirali su 8-azopurine i pirazol (4,3-d) pirimidine kao CDK inhibitore. Nadalje, dokazano je i da purinski derivat roskovitin (*CYC202* ili *seliciclib*) inhibira CDK s promicanjem apoptoze u karcinomu pluća, prostate, dojke i debelog crijeva, kao i u multiplom mijelomu. Također, nedavna istraživanja dokazala su da roskovitin zaustavlja stanični ciklus u G₁/S ili G₂/M fazi u HeLa, MCF-7, i HTC116 stanicama kao i u stanicama karcinoma pluća (101, 102).

Budući da je djelovanjem derivata SPD1 i SPD12 uočeno zaustavljanje staničnog ciklusa u tretiranim stanicama, daljnja istraživanja usmjerena su na potvrdu proapoptotičkog učinka ispitivanih spojeva. Aktivacija apoptoze zabilježena je (slika 27., 28. i 29.) u tretiranim HeLa, K562 i Raji staničnim linijama nakon aplikacije SPD1 i SPD12 derivata. U tretiranim HeLa stanicama stvorena je homogena populacija stanica s apoptotičkim obilježjima, dok K562 i Raji stanice imaju obilježje kasne apoptoze ili nekroze. Slični rezultati objavljeni su u studiji koja je pokazala da (E)-2/3-((stiril-sulfonil)metil) pirimidinski derivati zaustavljanju stanični ciklus u G₂/M fazi, smanjena je regulacija preko Mcl-1, PARP je pokidan, te su stanice ušle u programiranu staničnu smrt (105).

Kako bi se odredio put aktivacije apoptoze u tretiranim stanicama, izmjerena je katalitička aktivnost enzima kaspaze 3, jer kaspazno ovisna aktivacija apoptoze dovodi do akumulacije uzvodne kaskadne signalizacije koja aktivira izvršne kaspaze 3/6/7 (106). Povišena ekspresija gena *kaspaze 3* uočena je u 2D kulturi stanica HeLa i K562 stanicama nakon tretmana sa SPD1 derivatom, dok je ekspresija ovog gena u 3D kulturi HeLa stanica smanjena. U 3D HeLa stanicama izloženim derivatu SPD12 povećana je ekspresija *kaspaza 3* gena za oko 50 %, dok je u 2D kulturi HeLa stanica tek neznatno povišena. SPD12 derivat ne utječe na ekspresiju ovog gena u K562 stanicama. Western blot metodom nije zabilježena ekspresija kaspaze 3 u tretiranim HeLa i K562 stanicama, a ni promjena u katalitičkoj aktivnosti ovog proteina nakon tretmana spojeva s odabranim derivatima.

Kako razina ekspresije *kaspaza 3* gena ne pridonosi značajnoj aktivnosti i proteinskoj detekciji u HeLa sferoidima nakon aplikacije SPD1 derivata i u K562 stanicama nakon aplikacije SPD12 derivata dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost indukcije apoptoze kaspazno neovisnim putem.

Uz sniženu razinu ekspresije *kaspaza 3* gena zamijećena je i snižena razina ekspresije *citokrom C* gena. Jedan od mogućih putova aktivacije apoptoze jest preko AIF proteina

oslobođenog iz mitohondrija, a koji je usko povezan s kaspaza neovisnom-nekroptozom. Nekroptoza je programirana stanična smrt s morfologijom nekroze posredovane TNF- α , Fas ligandom iz iste TNF obitelji citokina te proteinom TRAIL. Iako potaknuti istim signalnim putovima, za razliku od apoptoze nekroptoza nije ovisna o kaspazama. Otpušteni AIF ovisno o kalpainu i proapoptotskoj Bcl-2 obitelji Bax dovodi do degradacije DNK i programirane smrti stanice (107) uz serinske proteaze, katepsin i kalpain (105 – 107).

Aktivacija apoptoze u stanicama tretiranim sa SPD1 i SPD12 derivatima u skladu je s uočenim i izmjerenim narušenim mitohondrijskim potencijalom. Budući da je apoptoza često povezana sa složenim promjenama u mitohondrijima, promjene u potencijalu mitohondrijskih membrana mogu biti rani događaj u indukciji apoptoze ili nasuprot tome može biti posljedica apoptotičkog signalnog puta koja se odražava kao promjena transmembranskog potencijala – $\Delta\Psi_m$ (111). U stanicama tretiranim s istraživanim derivatima mitohondrijski potencijal narušen je u više od 75 % stanica nakon izlaganja stanica u vremenu od 24 sata, što je u skladu s rezultatima dobivenim mjerenjem citotoksičnog kapaciteta ispitivanih spojeva, indukcije apoptoze u stanicama, kao i mjerenjem staničnog stresa preko stvaranja ROS u tretiranim stanicama (tablica 4., slike 13. – 36.). Narušen mitohondrijski potencijal dovodi do povećane propusnosti mitohondrijske membrane za proapoptotske signalne Bax/Bak molekule, što dovodi do otpuštanja citokroma C (112). Određivanjem ekspresije *citokrom c* gena uočena je povišena razina ekspresije u 2D HeLa (oko 40 %) i K562 stanicama (za 70 %) nakon aplikacije SPD1 derivata, dok je u 2D i 3D kulturama HeLa stanica 3 puta povišena ekspresija ovog gena djelovanjem SPD12 derivata. U K562 stanicama nije došlo do promjene u ekspresiji gena za *citokrom C* djelovanjem SPD12 derivata. Kako iz mitohondrija otpušteni citokrom C sudjeluje u kaspazno ovisnoj apoptozi (113), vidljiva je poveznica s povišenom ekspresijom gena za *kaspazu 3* ovisno o vrsti stanica i apliciranom derivatu. Međutim, zbog ograničenja primijenjene metode, rezultati dobiveni na temelju proteinske ekspresije trebali bi se uzeti s dozom opreza i ove pokuse treba ponoviti s nešto osjetljivijom metodom kako bi se potvrdili dobiveni rezultati.

Narušen integritet mitohondrija aktivira unutrašnji put apoptoze (112). Jedan je od aktivirajućih čimbenika u promjeni funkcije mitohondrijske membrane nastanak kisikovih slobodnih radikala (ROS) koji dovode do povećane i neselektivne propusnosti mitohondrijske membrane, što dovodi do otpuštanja proapoptotskih proteina, aktivirajući

kaspazno ovisan ili neovisan put (110, 111). U stanicama izloženim derivatima SPD izmjereno je nakupljanje ROS-a. SPD12 derivat pokazuje snažnije prooksidativno djelovanje u odnosu na SPD1 derivat. Za razliku od HeLa i Raji stanica, u K562 stanicama uočeno je manje nakupljanje ROS-a u odnosu na kontrolne netretirane stanice što se može objasniti činjenicom da je u K562 stanicama nađena od strane Song i sur. visoka ekspresija antioksidansa peroksiredoksin 1/2/6 i katalaze (115).

Povišena ekspresija CA IX u tumorskim stanicama s ograničenom ekspresijom u normalnom tkivu doprinosi selektivnom djelovanju novosintetiziranih protutumorskih derivata. Prethodne studije potvrdile su usku povezanost ekspresije CA IX sa staničnom proliferacijom gdje je zamijećen smanjen rast stanica sa smanjenom ekspresijom CA IX nakon izlaganja inhibitorima CA IX što doprinosi protutumorskom djelovanju (116 – 120). CA IX sudjeluje u osiguravanju ključnih staničnih funkcija potrebnih za rast i stvaranje metastaza tumora, s regulatornom funkcijom staničnog pH, preživljenju i adheziji/migraciji. Transmembranska lokalizacija CA IX omogućava učinkovito ciljano djelovanje malih inhibitornih molekula. Molekularni inhibitori na bazi sulfonamida/sulfamata inhibiraju CA IX koordinacijom s ionom cinka unutar aktivnog mjesta enzima (30). U ovom radu uočen je različit odgovor u promjeni katalitičke funkcije CA IX u leukemijskih staničnih linija u odnosu na stanične linije dobivene iz karcinoma. Djelovanje SPD1 derivata odražava se na sniženu aktivnost CA IX u HeLa staničnim sferoidima (3D), dok je aktivnost u K562 stanicama nepromijenjena odnosno neznatno povišena u 2D kulturi HeLa stanica. Snižena aktivnost CA IX uočava se u 2D HeLa stanicama nakon tretmana sa SPD12 derivatom, za razliku od 3D HeLa stanica kod kojih nije došlo do promjene u katalitičkoj aktivnosti. U K562 tretiranim stanicama sa derivatom SPD12 gotovo je 100 % povišena katalitička aktivnost ugljične anhidraze što znači da je jedan od uzroka snažnog inhibicijskog djelovanja na ovu staničnu liniju ovog derivata povezan i s promjenom katalitičke aktivnosti CA IX (121).

HIF doprinosi pojačanoj aktivnosti CA IX koja se odražava u smjeru održavanja konstantnog pH osiguravajući pogodne uvjete za rast tumorskih stanica (122). Povišena ekspresija *HIF* gena prisutna je u karcinomima mozga, debelog crijeva, pluća, dojki, prostate, bubrega, gušterače, vrata grlića maternice, mokraćnog mjehura i jajnika, te se povezuje s agresivnim fenotipom bolesti s lošom prognozom. Iako većina studija upućuje na povišenu ekspresiju HIF-a u solidnim tumorima, uočena je povišena ekspresija HIF i u

hematološkim zloćudnim tumorima kao što su difuzni limfom velikih B stanica, kronična limfocitna leukemija i akutna limfoblastična leukemija (123).

Djelovanje SPD1 derivata na HeLa stanicama uzgojenim u monosloju odražava se u povišenoj ekspresiji *Akt* i *CA IX* gena što je u skladu s dobivenom blago povišenom katalitičkom aktivnošću *CA IX*, ali i povišenom ekspresijom miR-210. Sličan rezultat vidljiv je u K562 staničnoj liniji nakon tretmana s SPD1 derivatom gdje je došlo do povišene ekspresije u *Akt* i *CA IX* genima. Dobiveni rezultati upućuju da inhibicijsko djelovanje SPD1 derivata nije ostvareno preko *Akt* / HIF signalizacijskog puta na što upućuju povišene ekspresije miR-210 i gena *Akt* i *CA IX*, koje su usko povezane s razinom ekspresije *HIF* gena. Suprotan učinak SPD1 derivata vidljiv je u 3D HeLa kulturi stanica kod kojih je došlo do smanjene ekspresije *Akt* gena i nepromijenjenoj ekspresiji *CA IX* što je popraćeno smanjenom katalitičkom aktivnošću enzima *CA IX* i ekspresijom miR-210. Iako su HeLa stanični sferoidi pokazali veću proliferativnu otpornost prema testiranim derivatima, njihovo se djelovanje u određenoj mjeri odrazilo kroz narušenu *Akt* signalizaciju. Iako je u središtu sferoidne strukture prisutna hipoksična zona, vidljiva je narušena aktivacija HIF-a preko snižene katalitičke aktivnosti enzima *CA IX* i ekspresije miR-210. Na temelju rezultata ekspresije *Akt* i *CA IX* gena, SPD12 djeluje na K562 stanice kao i SPD1 derivat. U HeLa stanicama tretiranim sa SPD12 povišena je ekspresija gena *Akt* i *CA IX* i nije zamijećena jasna razlika djelovanja SPD12 derivata između stanica uzgojenih u monosloju i u obliku sferoida.

Rezultati dobiveni određivanjem ekspresije *Akt* gena u 2D HeLa i K562 stanicama koji pokazuju da nije došlo do promjene u ekspresiji potvrđeni su rezultatima određivanja ekspresije proteina *Akt*, koji sudjeluje u kontroliranju staničnog preživljenja i apoptozi (45 – 48), također nije promijenjena djelovanjem derivata SPD1 i SPD12 derivata.

Stanične linije na kojima je istraživano djelovanje novih SPD1 i SPD12 derivata imaju različitu ekspresiju tumorsupresorskog gena *p53* i različitu funkciju tumorsupresorskog proteina *p53* proteina (124). Stanice K562 su *p53* null stanice i ne ekspimiraju *p53* (125, 126), na njima nije rađena ekspresija ovog gena. Kako protein *p53* ima značajnu ulogu u staničnom odgovoru na oštećenja DNK i drugih genskih aberacija i njegova aktivacija dovodi do zastoja u staničnom ciklusu ili aktivacije apoptoze (127) bilo je značajno istražiti dolazi li do razlike u ekspresiji ovog gena u staničnim linijama CaCo-2 i HeLa. Nađena je snižena

ekspresija *p53* gena u HeLa sferoidima, s nepromjenjenom razinom ekspresije u monosloju HeLa stanica nakon izlaganja stanica SPD1 derivatu. Sličan rezultat utvrđen je u 2D HeLa nakon izlaganja SPD12, dok je razina ekspresije *p53* gena znatno povišena u HeLa staničnim sferoidima. Snižena razina ekspresije *p53* gena normalna je za stanice adenokarcinoma vrata maternice (HeLa stanice), što je povezano s HPV (*human papilloma virus*) infekcijom, koja ima za posljedicu degradaciju *p53* putem E6 proteina (128). Promjena u ekspresiji *p53* na proteinskoj razini nakon tretmana uočena je u CaCo-2 stanicama. CaCo-2 stanična linija pokazuje mutaciju za *p53* gdje je jedan alel izbrisan, a na drugom je mutacija (129 – 132). Stanice adenokarcinoma debelog crijeva CaCo-2 (2D) pokazuju blago smanjenu ekspresiju *p53* nakon aplikacije SPD1 derivata, dok stanice koje rastu u 3D kulturi pokazuju blagi porast ekspresije za razliku od kontrolnih stanica. Tretman ovih stanica sa SPD12 dovodi do smanjene ekspresije *p53* u CaCo-2 stanicama uzgojenim u 3D kulturi stanica.

MiRNA su male nekodirajuće RNA, izgrađene od 18 – 25 nukleotida, koje sudjeluju u regulaciji ekspresije gena specifičnim sparivanjem baze na 3'-netranslatiranom području ciljane mRNA. MiRNA imaju važnu ulogu u mnogim staničnim procesima kao što je proliferacija, diferencijacija i apoptoza (133). Djelovanje miRNA, ovisno o uvjetima, može se promatrati kao onkogeno ili tumorsupresorno. Rezultati nedavnih studija upućuju na narušenu regulaciju ekspresije miRNA kod ljudi oboljelih od tumorskih bolesti uslijed amplifikacije ili brisanja miRNA gena, nenormalne transkripcijske kontrole, izmijenjene regulacije u epigenetskoj podlozi i biogenezi miRNA. MiRNA pokazale su se kao potencijalni biomarkeri u postavljanju dijagnoze i prognoze tumorskih oboljenja, a mogu biti i ciljevi, ali i alati protutumorske terapije (134).

MiR-21 je povišeno ekspimirana u gotovo svim epitelnim stanicama dobivenim iz solidnih tumora, a nedavne studije ukazuju i na povišenu regulaciju i u hematološkim malignim bolestima kao što su leukemije, limfomi i multipli mijelom. Zbog svoje izražene pojavnosti u svim većim klasama humanih karcinoma podržana je pretpostavka o miR-21 kao onkogenu koji svoju funkciju pretežno ispoljava preko inhibicije stanične apoptoze. Ona djeluje na ključne signalne putove odgovorne za regulaciju vanjskog i unutarnjeg mitohondrijskog puta. Nađeno je da miR-21 direktno djeluje na PTEN koji sudjeluje u inhibiciji Akt/PI3K signalnog puta, upravo djelovanje PTEN u apoptozi povezuje se sa posredovanjem u promicanju proapoptotskih mitohondrijskih čimbenika (135). U studiji

Yao i sur. (136) uočeno je da uz inhibiciju miR-21 u HeLa stanicama dolazi do snižene stanične proliferacije uz povišenu ekspresiju tumor supresorskog gena PDCD4 (136). U ovom radu uočena je snižena ekspresija miR-21 i s neznatno povišenom ekspresijom u 2D kulturi HeLa stanica nakon izlaganja SPD12 derivatu. Na temelju rezultata nedavnih studija, kao i u ovoj studiji povezivanja dobivenih rezultata može se reći da je snižena ekspresija u K562 stanicama u korelaciji s narušenim mitohondrijskim potencijalom i potaknutom apoptozom nakon tretmana sa SPD12 derivatom.

MiR-34 pripada miRNA tumor supresor obitelji koja se aktivira od strane p53. Ekspresija miR-34a usko je povezana s aktivnošću p53 nakon oštećenja DNK u stanici i aktivacije apoptoze i zastoja staničnog ciklusa u G1 fazi (128). U ovom radu uočena je povišena ekspresija miR-34a u 2D i 3D kulturi HeLa i K562 stanica nakon tretmana sa SPD12 derivatom. Povišena ekspresija nakon tretmana sa SPD1 derivatom uočena je samo u sferoidima HeLa stanica zajedno s povišenom ekspresijom *p53* gena. Povišena ekspresija miR-34a popraćena je povišenom ekspresijom *p53* u HeLa staničnim sferoidima, potaknutom djelovanjem SPD12 derivata. Kako su K562 stanice *p53* negativne, ekspresija miR-34a nije pokrenuta putem *p53* gena. Istraživanje Navarra i sur. upućuje na ekspresiju miR-34a preko forbol esterskog promotora osiguravajući duži pri-miR-34a transkript (137).

MiR-210 sudjeluje u regulaciji širokog spektra bioloških procesa, uključujući proliferaciju stanica, migraciju, apoptozu, diferencijaciju, DNK popravak i metabolizmu stanica. Najveće zapažanje miR-210 zadobila je kao glavni regulator u hipoksičnom odgovoru (138). Derivati SPD1 i SPD12 jednako utječu na ekspresiju miR-210 u svim testiranim stanicama. Snižena razina miR-210 zamijećena je u HeLa staničnim sferoidima, za razliku od blago povišene ekspresije u 2D HeLa stanicama i K562 stanicama. Iako je pretpostavljena povišena ekspresija miR-210 u staničnim sferoidima kao mogući mehanizam veće otpornosti prema testiranim *N*-9-sulfonilpuriskim derivatima dobiveni rezultati upućuju na promicanje rezistencije u staničnim sferoidima preko drugih proliferativno stimulirajućih faktora.

7. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Šesnaest novosintetiziranih *N*-9 sulfonilpurinskih derivata (SPD) pokazuje različitu IC_{50} vrijednost u odnosu na staničnu proliferaciju ovisno o vrsti testiranih stanica, duljini trajanja tretmana i samoj strukturi derivata.
- Derivati SPD1 i SPD12 imaju najizraženije antiproliferativno djelovanje.
- Leukemijske i limfomske stanične linije značajno su osjetljivije na izlaganje istraživanim spojevima u odnosu na stanice karcinoma.
- Stanice karcinoma uzgojene u 3D kulturi otpornije su na SPD1 i SPD12 u odnosu na klasičnu 2D kulturu stanica.
- Derivati SPD1 i SPD12 uzrokuju nakupljanje tretiranih stanica pretežno u subG₀ fazi staničnog ciklusa.
- Derivati SPD1 i SPD12 nakon 24 satnog izlaganja izazivaju apoptozu sa zapaženom kasnom apoptozom/nekrozom.
- Derivati SPD1 i SPD12 narušavaju mitohondrijski potencijal sa zapaženim nakupljanjem ROS-a.
- Ekspresija Akt, CA IX, kaspaze 3, citokroma C i p53 na razini proteina i gena u ovisnosti je o vrsti stanične kulture, načinu uzgoja stanica i apliciranom derivatu.
- Ekspresija miR-21, miR-34a i miR-210 različita je i u ovisnosti je o apliciranom derivatu te staničnoj liniji.

8. SAŽETAK

Primjenom većine danas korištenih protutumorskih lijekova može doći do oštećenja normalnih stanica jer mehanizam njihovog djelovanja nije ciljno specifičan za tumorske stanice. Novosintetizirani *N*-9-sulfonilpurinski derivati ubrajaju se u grupu antimetabolita koji djeluju kompetitivno s prirodnim metabolitima te tako postižu svoje specifično djelovanje na tumorske stanice. Cilj ovog rada bio je odrediti antiproliferativan učinak novih derivata na stanice leukemijskih staničnih linija i linije karcinoma koje rastu u 2D i 3D kulturi, te istražiti njihov utjecaj na ekspresiju proteina regulacijom ekspresije gena značajnih u promicanju stanične smrti. Inhibicijski potencijal stanične proliferacije novosintetiziranih *N*-9-sulfonilpurinskih derivata na humanim staničnim linijama uzgojenim u 2D i 3D kulturi stanica određen je MTT metodom. SPD1 i SPD12 derivati pokazali su se najučinkovitijima te su korišteni za daljnja istraživanja antiproliferativnog mehanizma. Protočnom citofluorimetrijom određen je utjecaj SPD1 i SPD12 na stanični ciklus, apoptozu, mitohondrijski potencijal i nakupljanje ROS-a unutar stanica. Ekspresija gena određena je RT-PCR-om za *Akt*, *CA IX*, *kaspazu 3*, *citokrom C*, *p53* gene i odabrane miRNA, a Western blot analizom određena je ekspresija p53, Akt, citokroma c i kaspaze 3. Stanice limfoma i leukemije osjetljivije su na tretman SPD u odnosu na stanice karcinoma. Stanice uzgojene u 3D kulturi pokazuju jaču otpornost na djelovanje SPD1 i SPD12 u odnosu na stanice u 2D kulturi. Mehanizam djelovanja SPD1 i SPD12 odražava se u promicanju apoptoze popraćene narušenim mitohondrijskim potencijalom i povećanim nakupljanjem ROS-a. Proapoptotička aktivnost SPD ovisi o vrsti stanične kulture, načinu uzgoja i apliciranom derivatu. SPD1 i SPD12 pokazali su se kao dobri kandidati za proučavanje i razjašnjavanje mehanizma umiranja izloženih tumorskih stanica s potencijalnom upotrebom u liječenju leukemijskih oboljenja.

9. SUMMARY

Most of the anticancer drugs used today can damage normal cells because their mechanism of action is not target-specific for tumor cells. Newly synthesized *N*-9-sulfonylpyrimidine derivatives belong to the group of antimetabolites that compete with natural metabolites and thus achieve specific effects on tumor cells. The aim of this study was to determine the antiproliferative effect of new derivatives on leukemia and carcinoma cell lines grown in 2D and 3D culture, to investigate their influence on protein expression and regulation of gene expression important in promoting cell death. Inhibitory potential of the newly synthesized *N*-9-sulfonylpyrimidine derivatives in human cell lines cultured in 2D and 3D cell culture was determined by colorimetric MTT test. SPD1 and SPD 12 derivatives proved to be the most effective and were used for further investigation of the antiproliferative mechanism. Flow cytometry was used to determine effect of SPD1 and SPD12 on cell cycle, apoptosis, mitochondrial potential and accumulation of ROS in cells. Gene expression was determined by RT-PCR for *Akt-1*, *CAIX*, *caspase 3*, *cytochrome C*, *p53* genes and selected miRNAs; p53, Akt, cytochrome c and caspase 3 proteins were detected using Western blotting. Leukemia and lymphoma cells are more sensitive to SPD treatment compared to carcinoma cell lines. Cells grown in 3D culture showed stronger resistance to SPD1 and SPD12 than 2D cell culture. Mechanism of action SPD1 and SPD12 is activated by promotion apoptosis accompanied with impaired mitochondrial potential and increased ROS accumulation. Proapoptotic activity of SPDs depends on the cell line, method of cultivating and applied derivatives. SPD1 and SPD12 have proven to be good candidates for further study and to clarify the mechanism of cell death of exposed tumor cells with a potential use in the treatment of leukemia diseases.

10. LITERATURA

1. Mišković K, Bujak M, Baus LM, Glavaš-Obrovac L. Antineoplastic DNA-Binding Compounds: Intercalating and Minor Groove Binding Drugs. *Arch Ind Hyg Toxicol*. 2013.;64(4):593–602.
2. Stewart B, Wild C. International agency for research cancer (IARC) Publications Website - World Cancer Report 2014.
3. Ćorić T, Miler Knežević A. Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2014. godini. Hrvatski zavod za javno zdravstvo-Odjel za mortalitetnu statistiku-Služba za epidemiologiju (1. rezultati), 2015.
4. Serkova NJ, Eckhardt SG. Metabolic Imaging to Assess Treatment Response to Cytotoxic and Cytostatic Agents. *Front Oncol*. 2016.; 6(152):1-9.
5. Kašnar-Šamprec J, Ratkaj I, Mišković K, Pavlak M, Baus-Lončar M, Kraljević Pavelić S, i ostali. In vivo toxicity study of N-1-sulfonylcytosine derivatives and their mechanisms of action in cervical carcinoma cell line. *Invest New Drugs*. 2012.;30(3):981–90.
6. Dunty WC. Cancer and Alcohol: An Overview of Tumorigenesis. U: Zakhari S, Vasiliou V, Guo QM, urednici. *Alcohol and Cancer*. Springer New York. 2011. 5–18.
7. Inoue S, Hao Z, Elia AJ, Cescon D, Zhou L, Silvester J, i ostali. Mule/Huwe1/Arf-BP1 suppresses Ras-driven tumorigenesis by preventing c-Myc/Miz1-mediated down-regulation of p21 and p15. *Genes Dev*. 2013.;27(10):1101–14.
8. Kuzyk A, Mai S. c-MYC-induced genomic instability. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014.;4(4):a014373, 1-19.
9. Maya-Mendoza A, Ostrakova J, Kosar M, Hall A, Duskova P, Mistrik M, i ostali. Myc and Ras oncogenes engage different energy metabolism programs and evoke distinct patterns of oxidative and DNA replication stress. *Mol Oncol*. 2015.;9(3):601–16.
10. Farnebo M, Bykov VJN, Wiman KG. The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010.;396(1):85–9.

11. Duffy MJ, Synnott NC, McGowan PM, Crown J, O'Connor D, Gallagher WM. p53 as a target for the treatment of cancer. *Cancer Treat Rev.* 2014.;40(10):1153–60.
12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011.;144(5):646–74.
13. Xu X, Farach-Carson MC, Jia X. Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. *Biotechnol Adv.* 2014.;32(7):1256–68.
14. Brajša K, Trzun M, Zlatar I, Jelić D. Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. *Period Biol.* 2016.;118(1):59-65.
15. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* svibanj 2014.;12(4):207–18.
16. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol.* 2010.;148(1):3–15.
17. Wenzel C, Riefke B, Gründemann S, Krebs A, Christian S, Prinz F, i ostali. 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Exp Cell Res.* 2014.;323(1):131–43.
18. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. *Biology.* 2014.;3(2):345–67.
19. Ciccolini J, Serdjebi C, Le Thi Thu H, Lacarelle B, Milano G, Fanciullino R. Nucleoside analogs: ready to enter the era of precision medicine? *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2016.;12(8):865–77.
20. Shelton J, Lu X, Hollenbaugh JA, Cho JH, Amblard F, Schinazi RF. Metabolism, Biochemical Actions, and Chemical Synthesis of Anticancer Nucleosides, Nucleotides, and Base Analogs. *Chem Rev.* 2016.;116(23):14379–455.

21. Ewald B, Sampath D, Plunkett W. Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene*. 2008.;27(50):6522–37.
22. Robak T, Korycka A, Lech-mar E, Robak P. Current status of older and new purine nucleoside analogues in the treatment of lymphoproliferative diseases. *Molecules*. 2009.;1183–1226.
23. Savić D, Stanković T, Lavrnja I, Podolski-Renić A, Banković J, Peković S, i ostali. Purine nucleoside analogs in the therapy of cancer and neuroinflammation. *Mol Inhib Target Ther*. 2015.;1(1): 3-14.
24. Nussbaumer S, Bonnabry P, Veuthey J-L, Fleury-Souverain S. Analysis of anticancer drugs: a review. *Talanta*. 2011.;85(5):2265–89.
25. Kobetić R, Kazazić S, Kovačević B, Glasovac Z, Krstulović L, Bajić M, i ostali. Mass Spectrometry and Theoretical Studies on N-C Bond Cleavages in the N-Sulfonylamidino Thymine Derivatives. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2015.;26:833–42.
26. Narayana Venkata K, Subba Rao D, Madhava G, Venkateswarlu N, Vijaya T, i ostali. Sulfonamide and carbamate derivatives of 6-chloropurine: synthesis, characterization and antimicrobial activity evaluation. *Org. Commun*. 2016; 9(2):42-53.
27. Krstulović L, Ismaili H, Bajć Miroslav, Višnjevac A, Glavaš-Obrovac LJ, i Žinić B. Synthesis of Novel Aliphatic N-sulfonylamidino Thymine Derivatives by Cu(I)-catalyzed Three-component Coupling Reaction. *Croat. Chem. Acta*. 2012; 85 (4):525-34.
28. Kołaczek A, Fusiarz I, Ławecka J, Branowska D. Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives: A brief review. *Chemik*. 2017; 68 (7): 620-8.
29. Benej M, Pastorekova S, Pastorek J. Carbonic anhydrase IX: regulation and role in cancer. *Subcell Biochem*. 2014.;75:199–219.
30. McDonald PC, Winum J-Y, Supuran CT, Dedhar S. Recent Developments in Targeting Carbonic Anhydrase IX for Cancer Therapeutics. *Oncotarget*. 2012.;3(1):84–97.

31. Chandak N, Ceruso M, Supuran CT, Sharma PK. Novel sulfonamide bearing coumarin scaffolds as selective inhibitors of tumor associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII. *Bioorg Med Chem*. 2016.;24(13):2882–6.
32. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Res Int*. 2014.;2014:1-23.
33. Kamal A, Faazil S, Malik MS. Apoptosis-inducing agents: a patent review (2010 - 2013). *Expert Opin Ther Pat*. 2014.;24(3):339–54.
34. Nagoor NH, Shah Jehan Muttiah N, Soon Lim C, In LLA, Mohammad K, Awang K. Regulation of Apoptotic Effects by Erythrocarpine E, a Cytotoxic Limonoid from *Chisocheton erythrocarpus* in HSC-4 Human Oral Cancer Cells. *PLoS ONE*. 2011;6 (8): 1-7.
35. Jayakiran M. Apoptosis-Biochemistry: A Mini Review. *J Clin Exp Pathol*. 2015; 5(1):1-4.
36. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2015.;16(6):2129–44.
37. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang F-T, Zhou T-T, Liu B, i ostali. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*. 2012.;45(6):487–98.
38. Plácido AI, Pereira CMF, Duarte AI, Candeias E, Correia SC, Santos RX, i ostali. The role of endoplasmic reticulum in amyloid precursor protein processing and trafficking: implications for Alzheimer’s disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014.;1842(9):1444–53.
39. Seaton DD, Krishnan J. Model-Based Analysis of Cell Cycle Responses to Dynamically Changing Environments. *PLoS Comput Biol*. 2016.;12(1):1-28.
40. Bretones G, Delgado MD, León J. Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta*. 2015.;1849(5):506–16.

41. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RAM. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013.;14(8):518–28.
42. Kar S. Unraveling Cell-Cycle Dynamics in Cancer. *Cell Syst.* 2016.;2(1):8–10.
43. Bassermann F, Eichner R, Pagano M. The ubiquitin proteasome system - implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2014.;1843(1):150–62.
44. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J Pathol.* 2012.;226(2):352–64.
45. Rahmani M, Aust MM, Attkisson E, Williams DC, Ferreira-Gonzalez A, Grant S. Dual inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL strikingly enhances PI3K inhibition-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a GSK3- and Bim-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2013.;73(4):1340–51.
46. Nitulescu GM, Margina D, Juzenas P, Peng Q, Olaru OT, Saloustros E, i ostali. Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *Int J Oncol.* 2016.;48(3):869–85.
47. Liu P, Begley M, Michowski W, Inuzuka H, Ginzberg M, Gao D, i ostali. Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. *Nature.* 2014.;508(7497):541–5.
48. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol.* 2014.;4 (64):1-11.
49. Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med.* 2014.;46(6):372–83.
50. Choudhry H, Mole DR. Hypoxic regulation of the noncoding genome and NEAT1. *Brief Funct Genomics.* 2016.;15(3):174–85.
51. Welsh SJ, Dale AG, Lombardo CM, Valentine H, Fuente M de la, Schatzlein A, i ostali. Inhibition of the hypoxia-inducible factor pathway by a G-quadruplex binding small molecule. *Sci Rep.* 2013.;3:2799: 1-9.

52. Akocak S, Alam MR, Shabana AM, Sanku RKK, Vullo D, Thompson H, i ostali. PEGylated Bis-Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors Can Efficiently Control the Growth of Several Carbonic Anhydrase IX-Expressing Carcinomas. *J Med Chem.* 2016.;59(10):5077–88.
53. Supuran CT. Inhibition of carbonic anhydrase IX as a novel anticancer mechanism. *World J Clin Oncol.* 2012.;3(7):98–103.
54. Supuran CT, Scozzafava A, Casini A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev.* 2003.;23(2):146–89.
55. Thiry A, Dogné J-M, Masereel B, Supuran CT. Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2006.;27(11):566–73.
56. Chen J, Xu T, Chen C. The critical roles of miR-21 in anti-cancer effects of curcumin. *Ann Transl Med.* 2015.;3(21): 1-7.
57. Balcells I, Cirera S, Busk PK. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol.* 2011.;11(70): 1-11.
58. Schmidt MF. Drug target miRNAs: chances and challenges. *Trends Biotechnol.* 2014.;32(11):578–85.
59. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, i ostali. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol.* 2007.;27(5):1859–67.
60. Gurses HE, Hatipoğlu OF, Gunduz MG and E. MicroRNAs as Therapeutic Targets in Human Breast Cancer. U: Gunduz E. *A Concise Review of Molecular Pathology of Breast Cancer.* InTech. 2015; 121-37.
61. Zhao L, Bode AM, Cao Y, Dong Z. Regulatory mechanisms and clinical perspectives of miRNA in tumor radiosensitivity. *Carcinogenesis.* 2012.;33(11):2220–7.
62. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics.* 2015.;5(10):1122–43.

63. Xu X, Kriegel AJ, Jiao X, Liu H, Bai X, Olson J, i ostali. miR-21 in ischemia/reperfusion injury: a double-edged sword? *Physiol Genomics*. 2014.;46(21):789–97.
64. Gorospe M, Tominaga K, Wu X, Föhling M, Ivan M. Post-Transcriptional Control of the Hypoxic Response by RNA-Binding Proteins and MicroRNAs. *Front Mol Neurosci*. 2011.;4:7.
65. Dong P, Konno Y, Watari H, Hosaka M, Noguchi M, Sakuragi N. The impact of microRNA-mediated PI3K/AKT signaling on epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness in endometrial cancer. *J Transl Med*. 2014.;12:231.
66. Navarro F, Lieberman J. miR-34 and p53: New Insights into a Complex Functional Relationship. *PLOS ONE*. 2015.;10(7):1-23.
67. Yamakuchi M, Lowenstein CJ. MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. *Cell Cycle Georget Tex*. 2009.;8(5):712–5.
68. Agostini M, Knight RA. miR-34: from bench to bedside. *Oncotarget*. 2014.;5(4):872–81.
69. Okada N, Lin C-P, Ribeiro MC, Biton A, Lai G, He X, i ostali. A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. *Genes Dev*. 2014; 28(5):438-50.
70. Qin Q, Furong W, Baosheng L. Multiple functions of hypoxia-regulated miR-210 in cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014.;33:50.
71. Devlin C, Greco S, Martelli F, Ivan M. miR-210: More than a silent player in hypoxia. *IUBMB Life*. 2011.;63(2):94–100.
72. Gee HE, Ivan C, Calin GA, Ivan M. HypoxamiRs and cancer: from biology to targeted therapy. *Antioxid Redox Signal*. 2014.;21(8):1220–38.
73. Marczy S, Glavas-Obrovac L, Belovari T, Stojković R, Ivanković S, Serić V, i ostali. Biological properties of 4-methyl-2,7-diamino-5,10-diphenyl-4,9-diazapyrenium hydrogensulfate (ADAP). *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008.;62(4):595–604.

74. Das MK, Andreassen R, Haugen TB, Furu K. Identification of Endogenous Controls for Use in miRNA Quantification in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Genomics Proteomics*. 2016.;13(1):63–8.
75. Gartel AL, Feliciano C, Tyner AL. A New Method for Determining the Status of p53 in Tumor Cell Lines of Different Origin. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther*. 2003.;13(6–1):405–8..
76. Shao C, Lu C, Chen L, Koty PP, Cobos E, Gao W. p53-Dependent anticancer effects of leptomycin B on lung adenocarcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011.;67(6):1369–80.
77. Law JC, Ritke MK, Yalowich JC, Leder GH, Ferrell RE. Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line. *Leuk Res*. 1993.;17(12):1045–50.
78. Krizmanić I, Žinic BD, Žinic M. Sulfonylpyrimidine derivatives with anticancer activity. patent. EP0877022 B1, 2003.
79. Glavaš-Obrovac L, Karner I, Žinic B, Pavelić K. Antineoplastic activity of novel N-1-sulfonylpyrimidine derivatives. *Anticancer Res*.2001;21(3B):1979–86.
80. Kašnar-Šamprec J, Glavaš-Obrovac L, Pavlak M, Štambuk N, Konjevoda P, Žinić B. Synthesis, spectroscopic characterization and biological activity of N-1-sulfonylcytosine derivatives. *Croat Chem Acta*. 2004.; 78 (2): 261-7.
81. Glavaš-Obrovac L, Karner I, Štefanić M, Kašnar-Šamprec J, Žinić B. Metabolic effects of novel N-1-sulfonylpyrimidine derivatives on human colon carcinoma cells. *Farmaco*. 2005.;60(6–7):479–83.
82. Jordheim LP, Durantel D, Zoulim F, Dumontet C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2013.;12(6):447–64.
83. Kašnar B, Krizmanić I, Žinić M. Synthesis of the Sulfonylpyrimidine Derivatives as a New Type of Sulfonylcycloureas. *Nucleosides Nucleotides*. 1997.;16(7–9):1067–71.

84. Žinić B, Krizmanić I, Vikić-Topić D, Žinić M. 5-Bromo- and 5-Iodo-*N*-1-sulfonylated Cytosine Derivatives. Exclusive Formation of Keto-Imino Tautomers. *Croat Chem Acta*. 1999.;72(4):957–66.
85. Glavaš-Obrovac L, Karner I, Pavlak M, Radačić M, Kašnar-Šamprec J, Žinić B. Synthesis and antitumor activity of 5-bromo-1-mesylyracil. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2005.;24(5–7):557–69.
86. DiNardo CD, Cortes JE. New treatment for acute myelogenous leukemia. *Expert Opin Pharmacother*. 2015.;16(1):95–106.
87. Khan NUH, Zaib S, Sultana K, Khan I, Mougang-Soume B, Nadeem H, i ostali. Metal complexes of tosyl sulfonamides: design, X-ray structure, biological activities and molecular docking studies. *RSC Adv*. 2015.;5(38):30125–32.
88. Girard YK, Wang C, Ravi S, Howell MC, Mallela J, Alibrahim M, i ostali. A 3D fibrous scaffold inducing tumoroids: a platform for anticancer drug development. *PloS One*. 2013.;8(10):1-11.
89. Modulevsky DJ, Lefebvre C, Haase K, Al-Rekabi Z, Pelling AE. Apple derived cellulose scaffolds for 3D mammalian cell culture. *PloS One*. 2014.;9(5):1-10
90. Ma H, Jiang Q, Han S, Wu Y, Cui Tomshine J, Wang D, i ostali. Multicellular tumor spheroids as an in vivo-like tumor model for three-dimensional imaging of chemotherapeutic and nano material cellular penetration. *Mol Imaging*. 2012.;11(6):487–98.
91. Hoffmann OI, Ilmberger C, Magosch S, Joka M, Jauch K-W, Mayer B. Impact of the spheroid model complexity on drug response. *J Biotechnol*. 2015.;205:14–23.
92. Curtis LT, England CG, Wu M, Lowengrub J, Frieboes HB. An interdisciplinary computational/experimental approach to evaluate drug-loaded gold nanoparticle tumor cytotoxicity. *Nanomed*. 2016.;11(3):197–216.

93. Thoma CR, Zimmermann M, Agarkova I, Kelm JM, Krek W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014.;69–70:29–41.
94. Karlsson H, Fryknäs M, Larsson R, Nygren P. Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. *Exp Cell Res.* 2012.;318(13):1577–85.
95. Breslin S, O’Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2013.;18(5–6):240–9.
96. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011.;11(6):393–410.
97. Rauch C, Feifel E, Amann E-M, Spötl HP, Schennach H, Pfaller W, i ostali. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *ALTEX.* 2011.;28(4):305–16.
98. Wei Z, Chen N, Guo H, Wang X, Xu F, Ren Q, i ostali. Bone marrow mesenchymal stem cells from leukemia patients inhibit growth and apoptosis in serum-deprived K562 cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009.;28:141.
99. Haneef J, Parvathy M, M P, Thankayyan R SK, Sithul H, Sreeharshan S. Bax translocation mediated mitochondrial apoptosis and caspase dependent photosensitizing effect of *Ficus religiosa* on cancer cells. *PloS One.* 2012.;7(7):1-7.
100. Henderson L, Bortone DS, Lim C, Zambon AC. Classic „broken cell“ techniques and newer live cell methods for cell cycle assessment. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013.;304(10):C927-938.
101. Akasaka T, Tsujii M, Kondo J, Hayashi Y, Ying J, Lu Y, i ostali. 5-FU resistance abrogates the amplified cytotoxic effects induced by inhibiting checkpoint kinase 1 in p53-mutated colon cancer cells. *Int J Oncol.* 2015.;46(1):63–70.

102. Mojzych M, Šubertová V, Bielawska A, Bielawski K, Bazgier V, Berka K, i ostali. Synthesis and kinase inhibitory activity of new sulfonamide derivatives of pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazines. *Eur J Med Chem.* 2014.;78:217–24.
103. Wang Q, Su L, Liu N, Zhang L, Xu W, Fang H. Cyclin Dependent Kinase 1 Inhibitors: A Review of Recent Progress. *Curr Med Chem.* 2011.;18(13):2025–43.
104. Coker-Gurkan A, Arisan ED, Obakan P, Ozfiliz P, Kose B, Bickici G, i ostali. Roscovitine-treated HeLa cells finalize autophagy later than apoptosis by downregulating Bcl-2. *Mol Med Rep.* 2015.;11(3):1968–74.
105. Long Y, Yu M, Li P, Islam S, Goh AW, Kumarasiri M, i ostali. Synthesis and biological evaluation of heteroaryl styryl sulfone derivatives as anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016.;26(23):5674–8.
106. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013.;5(4):1-28.
107. Delavallée L, Cabon L, Galán-Malo P, Lorenzo HK, Susin SA. AIF-mediated caspase-independent necroptosis: A new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life.* 2011.;63(4):221–32.
108. Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat Med.* 2005.;11(7):725–30.
109. Huai J, Jöckel L, Schrader K, Borner C. Role of caspases and non-caspase proteases in cell death. *F1000 Biol Rep.* 2010.;2(48):1-6.
110. Kaminskyy V, Zhivotovsky B. Proteases in autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2012.;1824(1):44-54.
111. Li D, Ye Y, Lin S, Deng L, Fan X, Zhang Y, i ostali. Evaluation of deoxynivalenol-induced toxic effects on DF-1 cells in vitro: cell-cycle arrest, oxidative stress, and apoptosis. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014.;37(1):141–9.
112. Xiong S, Mu T, Wang G, Jiang X. Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. *Protein Cell.* 2014.;5(10):737–49.

113. Wen S, Zhu D, Huang P. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. *Future Med Chem.* 2013.;5(1):53–67.
114. Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 2011.;1807(6):735–45.
115. Song L-L, Tu Y-Y, Xia L, Wang W-W, Wei W, Ma C-M, i ostali. Targeting catalase but not peroxiredoxins enhances arsenic trioxide-induced apoptosis in K562 cells. *PLoS One.* 2014.;9(8):1-6.
116. Supuran CT, Briganti F, Tilli S, Chegwiddden WR, Scozzafava A. Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides as antitumor agents? *Bioorg Med Chem.* 2001.;9(3):703–14.
117. Supuran CT, Winum J-Y. Carbonic anhydrase IX inhibitors in cancer therapy: an update. *Future Med Chem.* 2015.;7(11):1407–14.
118. Ward C, Meehan J, Mullen P, Supuran C, Dixon JM, Thomas JS, i ostali. Evaluation of carbonic anhydrase IX as a therapeutic target for inhibition of breast cancer invasion and metastasis using a series of in vitro breast cancer models. *Oncotarget.* 2015.;6(28):24856–70.
119. Supuran CT. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016.;31(3):345–60.
120. Mahon BP, Pinard MA, McKenna R. Targeting Carbonic Anhydrase IX Activity and Expression. *Molecules.* 2015.;20(2):2323–48.
121. Alatrash G, Molldrem JJ. Vaccines as consolidation therapy for myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol.* 2011.;4(1):37–50.
122. Brahimi-Horn MC, Bellot G, Pouysségur J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr Opin Genet Dev.* 2011.;21(1):67–72.
123. Martin SK, Diamond P, Gronthos S, Peet DJ, Zannettino ACW. The emerging role of hypoxia, HIF-1 and HIF-2 in multiple myeloma. *Leukemia.* 2011.;25(10):1533–42.

124. WOO S-M, CHOI YK, KIM AJ, CHO S-G, KO S-G. p53 causes butein-mediated apoptosis of chronic myeloid leukemia cells. *Mol Med Rep.* 2016.;13(2):1091–6.
125. Lübbert M, Miller CW, Crawford L, Koeffler HP. p53 in chronic myelogenous leukemia. Study of mechanisms of differential expression. *J Exp Med.* 1988.;167(3):873–86.
126. Sen S, Takahashi R, Rani S, Freireich EJ, Stass SA. Expression of differentially phosphorylated Rb and mutant p53 proteins in myeloid leukemia cell lines. *Leuk Res.* 1993.;17(8):639–47.
127. Khoo KH, Verma CS, Lane DP. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nat Rev Drug Discov.* 2014.;13(3):217–36.
128. Mert U, Özgür E, Tiryakioglu D, Dalay N, Gezer U. Induction of p53-inducible microRNA miR-34 by gamma radiation and bleomycin are different. *Front Genet.* 2012.;220(3):1-3.
129. Kralj M, Husnjak K, Körbler T, Pavelić J. Endogenous p21WAF1/CIP1 status predicts the response of human tumor cells to wild-type p53 and p21WAF1/CIP1 overexpression. *Cancer Gene Ther.* 2003.;10(6):457–67.
130. Ray RM, McCormack SA, Johnson LR. Polyamine depletion arrests growth of IEC-6 and Caco-2 cells by different mechanisms. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2001.;281(1):G37–43.
131. Lopez-Sánchez LM, Jimenez C, Valverde A, Hernandez V, Peñarando J, Martinez A, i ostali. CoCl₂, a Mimic of Hypoxia, Induces Formation of Polyploid Giant Cells with Stem Characteristics in Colon Cancer. *PLOS ONE.* 2014.;9(6):1-10.
132. Novakovic P, Stempak JM, Sohn K-J, Kim Y-I. Effects of folate deficiency on gene expression in the apoptosis and cancer pathways in colon cancer cells. *Carcinogenesis.* 2006.;27(5):916–24.
133. Matamala N, Vargas MT, González-Cámpora R, Miñambres R, Arias JI, Menéndez P, i ostali. Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection. *Clin Chem.* 2015.;61(8):1098–106.

134. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016.;1(15004):1-9.
135. Buscaglia LEB, Li Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin J Cancer.* 2011.;30(6):371–80.
136. Yao Q, Xu H, Zhang Q-Q, Zhou H, Qu L-H. MicroRNA-21 promotes cell proliferation and down-regulates the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) in HeLa cervical carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009.;388(3):539–42.
137. Navarro F, Gutman D, Meire E, Cáceres M, Rigoutsos I, Bentwich Z, i ostali. miR-34a contributes to megakaryocytic differentiation of K562 cells independently of p53. *Blood.* 2009.;114(10):2181–92.
138. Grosso S, Doyen J, Parks SK, Bertero T, Paye A, Cardinaud B, i ostali. MiR-210 promotes a hypoxic phenotype and increases radioresistance in human lung cancer cell lines. *Cell Death.* 2013.;4(3):1-3.

11. ŽIVOTOPIS

Marijana Jukić



marjukic@mefos.hr

DATUM ROĐENJA

05. LIPNJA 1986

MJESTO ROĐENJA

Novi Sad, Srbija

ČLANSTVO:

Hrvatsko društvo za
biokemiju i molekularnu
biologiju (HDBMB)
Hrvatsko društvo za
istraživanje raka (HDIR)

TRENUTNO ZAPOSLENJE

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
ZNASTVENI NOVAK/ASISTENT

Katedra za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku
kemiju

OBRAZOVANJE

Interdisciplinarni doktorski studij Molekularnih
bioznanosti, Sveučilište J. J. Strossmayer, **u tijeku**

Pedagoško-psihološka i didaktičko-metodička
naobrazba, Učiteljski fakultet Osijek, Sveučilište J. J.
Strossmayer, **2014**

Diplomski studij biologija, Odjel za biologiju,
Sveučilište J. J. Strossmayer, **2011**

Preddiplomski studij biologije, Odjel za biologiju,
Sveučilište J. J. Strossmayer, **2008**

SUDJELOVANJE NA PROJEKTU

"Mehanizmi bioloških učinaka novih malih molekula
na stanice tumora čovjeka" pod voditeljstvom
prof.dr.sc. Ljubice Glavaš-Obrovac

VIF projekt pod voditeljstvom prof.dr.sc. Ljubice
Glavaš-Obrovac

NAGRADA ZA NAJBOLJI POSTER

Marijana Jukić, Vesna Rastija, Teuta Opačak-Bernardi, Miroslav Bajić, Ivana Stolić, Luka Krstulović, Ljubica Glavaš-Obrovac. [ANTITUMOR ACTIVITY OF 3, 4-ETHYLENEDIOXYTHIOPHENE DERIVATIVES AGAINST CARCINOMA CELLS IN VITRO AND QUANTITATIVE STRUCTURE–ACTIVITY RELATIONSHIP ANALYSIS](#) // *16th Ružička days “TODAY SCIENCE – TOMMOROW INDUSTRY” Book of abstracts* / Ante Jukić (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, 2016. 96-96 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Aleksandra Cvetanović, **Marijana Jukić**, Katarina Mišković-Špoljarić, Jaroslava Švarc-Gajić, Ljubica Glavaš-Obrovac. [Health benefits and functional properties of dry powder chamomile extract obtained by using spray drying technique](#) // *With food to health* / Drago Šubarić, Midhat Jašić (ur.). Osijek and Tuzla: Studio HS internet d.o.o., Osijek, Hrvatska, 200, 2016. 73-73 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

ZNANSTVENE PUBLIKACIJE

Jukić, Marijana; Rastija, Vesna; Opačak-Bernardi, Teuta; Stolić, Ivana; Krstulović, Luka; Bajić, Miroslav; Glavaš-Obrovac, Ljubica. [Antitumor Activity of 3, 4-Ethylenedioxythiophene Derivatives and Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis](#). // *Journal of Molecular Structure*. 1133 (2017) ; 66-73 (članak, znanstveni).

Suč, Josipa; Tumir, Lidija-Marija; Glavaš-Obrovac, Ljubica; **Jukić, Marijana**; Piantanida, Ivo; Jerić, Ivanka. [Impact of \$\alpha\$ -hydrazino acids embedded in short fluorescent peptides on peptide interaction with DNA and RNA](#). *Organic & biomolecular chemistry*. 14 (2016); 4865-4874.

SVEUČILIŠNA SKRIPTA

[Priručnik za seminare i vježbe iz medicinske kemije i biokemije 2](#); Glavaš-Obrovac, Ljubica; Baus Lončar, Mirela; Ćurić, Goran; Mišković, Katarina; Šerić, Vatroslav; Wagner, Jasenka; Marczi, Saška; Opačak-Bernardi, Teuta; Suver Stević, Mirjana; Viljetić, Barbara; **Jukić, Marijana**. Osijek : Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku; Medicinski fakultet Osijek, 2014; 35-39.

Jukić, Marijana; Mišković, Katarina; Bešlo, Drago; Glavaš-Obrovac, Ljubica. [Antitumor effect of bee venom and melittin in vitro](#) // *HDIR-2 From Bench to Clinic*. 2012. 80-80 (poster,domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

Marijana Jukić, Katarina Mišković, Drago Bešlo, Ljubica Glavaš-Obrovac. [In vitro antitumor effect of domestic Apis mellifera bee venom and melittin](#) // *International Scientific and Professional Conference 14th Ruzicka Days „Today Science – Tomorrow industry“*. (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).

Mišković, Katarina; Baus-Lončar, Mirela; **Jukić, Marijana;** Belovari, Tatjana; Glavaš-Obrovac, Ljubica. [In vivo određivanje testne koncentracije ispitivanog spoja zasnovan na „Up and down“ metodi](#) // *15th Ružička days “TODAY SCIENCE – TOMMOROW INDUSTRY” Book of abstracts / Šubarić, Drago (ur.)*. Osijek : Faculty of Food Technology Osijek Croatian Society of Chemical Engineers, 2014. 111-111 (poster,međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Jukić, Marijana; Leović, Jasna; Cvetanović, Aleksandra; Mišković, Katarina; Švarc-Gajić, Jaroslava; Glavaš-Obrovac, Ljubica. [Antiproliferative activity of chamomile flower extracts on normal and human tumour cell lines](#) // *XIth János Szentágothai and Ist László Cholnoky Interdisciplinary Conference*. (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

Mišković Špoljarić, Katarina; **Jukić, Marijana;** Glavaš-Obrovac, Ljubica. [ODREĐIVANJE GENOTOKSIČNOSTI DVA NOVA MONOMETINSKA CIJANINSKA DERIVATA](#) // *16th Ružička days: TODAY SCIENCE-TOMORROW INDUSTRY / Ante Jukić (ur.)*. Zagreb : Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa; Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2016. 95-95 (poster, sažetak, znanstveni).

Marijana Jukić, Vesna Rastija, Teuta Opačak-Bernardi, Miroslav Bajić, Ivana Stolić, Luka Krstulović, Ljubica Glavaš-Obrovac. [ANTITUMOR ACTIVITY OF 3, 4-ETHYLENEDIOXYTHIOPHENE DERIVATIVES AGAINST CARCINOMA CELLS IN VITRO AND QUANTITATIVE STRUCTURE–ACTIVITY RELATIONSHIP ANALYSIS](#) // *16th Ružička days “TODAY SCIENCE – TOMMOROW INDUSTRY” Book of abstracts / Ante Jukić (ur.)*. Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, 2016. 96-96 (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

Aleksandra Cvetanović, **Marijana Jukić,** Katarina Mišković-Špoljarić, Jaroslava Švarc-Gajić, Ljubica Glavaš-Obrovac. HEALTH BENEFITS AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF DRY POWDER CHAMOMILE EXTRACT OBTAINED USING SPRAY DRYING TECHNIQUE. // *International Scientific*

and Professional Conference *9th WITH FOOD TO HEALTH/* 2016. (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).