

Citotoksičnost derivata kinazolinona na stanice koje rastu u 2D i 3D kulturi

Periš, Antonio

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:317799>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Antonio Periš

**CITOTOKSIČNOST DERIVATA
KINAZOLINONA NA STANICE KOJE
RASTU U 2D I 3D KULTURI**

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Antonio Periš

**CITOTOKSIČNOST DERIVATA
KINAZOLINONA NA STANICE KOJE
RASTU U 2D I 3D KULTURI**

Završni rad

Osijek, 2018.

Rad je izrađen u Laboratoriju za kulturu tkiva pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

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

Rad ima 39 listova i 15 slika.

Zahvaljujem se ponajprije prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac na predloženoj temi i pruženoj prilici za suradnju tijekom izrade završnog rada kao i prenesenom znanju i zalaganju za unaprjeđenje i priznavanje studija Medicinsko laboratorijske dijagnostike.

Veliko hvala i dr. sc. Marijani Jukić radi prenesenog vrijednog praktičnog i teorijskog znanja o radu u Laboratoriju za kulturu stanica i vremena utrošenog tijekom suradnje.

Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Teuti Opačak-Bernardi te doc. dr. sc. Katarini Mišković Špoljarić kao i svim profesorima i suradnicima pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku na prenesenim vještinama i znanjima tijekom preddiplomskog studija.

Mojoj obitelji, rodbini i prijateljima hvala za svu brigu, strpljenje, podršku i motivaciju koju su mi davali tijekom studiranja. Bez vas ovo ne bi bilo moguće.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Heterociklički spojevi	1
1.2. Kinazolinonski spojevi	1
1.2.1. Kinazolinoni	1
1.2.2. Kinazolinonski derivati	2
1.2.3. Protutumorsko djelovanje derivata kinazolinona.....	3
1.3. In vitro kultivacija stanica	3
1.3.1. Kultura stanica	3
1.3.2. Principi <i>in vitro</i> kultivacije	4
1.4. Dvodimenzionalna (2D) kultura stanica	5
1.5. Trodimenzionalna (3D) kultura stanica	6
1.6. Metode 3D kultivacije stanica	7
1.6.1. Metode bez nosača.....	7
1.6.2. Metode s nosačima (3D matricama)	8
1.6.3. Bioreaktori	9
1.6.4. Mikročipovi ili organi na čipu	10
1.7. Tumorske bolesti	10
1.7.1. Laboratorijska dijagnostika u tumorskim bolestima.....	11
1.7.2. Uloga 3D kulture u istraživanju i liječenju tumora.....	11
2. CILJ	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Ispitivani spojevi	14
3.1.2. Kemikalije.....	14
3.1.3. Stanične linije.....	15
3.2. METODE	16
3.2.1. Kultivacija stanica <i>in vitro</i>	16
3.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi.....	16
3.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom	18
3.2.7. Statistička obrada podataka.....	19
4. REZULTATI	20

4.1. Određivanje citotoksičnog učinka derivata kinazolinona na 2D kulturu stanica MTT testom.....	20
4.2. Određivanje citotoksičnog učinka derivata kinazolinona na 3D kulturu stanica MTT testom.....	23
4.3. Usporedba citotoksičnog učinka derivata kinazolinona u 2D i 3D kulturi stanica.....	26
5. RASPRAVA	29
6. ZAKLJUČAK	32
7. SAŽETAK	33
8. SUMMARY	34
9. LITERATURA	35
10. ŽIVOTOPIS	39

POPIS KRATICA

ADP (eng. *Adenosine diphosphate*) adenzin difosfat

ATCC (eng. *American Type Culture Collection*) Američka zbirka staničnih kultura

ATP (eng. *Adenosine triphosphate*) adenzin trifosfat

DHFR dihidrofolat reduktaza

DMEM (eng. *Dulbecco's Minimal Essential Medium*) Dulbeccov minimalni esencijalni medij

DMSO dimetil sulfoksid

DNK deoksiribonukleinska kiselina

EGFR (eng. *Epidermal Growth Factor Receptor*) receptor epidermalnog faktora rasta

HEM hidroksietil metakrilat

HSV-1 herpes simpleks virus -1

HZ hipoksična zona

M mol/dm³

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

NASA (eng. *National Aeronautics and Space Administration*)

NSCLC (eng. *Non-Small Cell Lung Cancer*) karcinom pluća ne-malih stanica

NZ nekrotička zona

PARP-1 poli(ADP-riboza) polimeraza-1

PBS (eng. *phosphate-buffered saline*) fosfatni pufer

PLGA (eng. *poly lactic-co-glycolic acid*) polilaktično-glikolna kiselina

PZ proliferacijska zona

RPMI 1640 (eng. *Roswell Park Memorial Institute*) medij

SDS (engl. *sodium dodecyl-sulphate*) natrijev dodecil sulfat

TIBC (eng. *Total Iron Binding Capacity*) ukupni kapacitet vezanja željeza

1. UVOD

1.1. Heterociklički spojevi

Sinteza i karakterizacija heterocikličkih spojeva zauzimaju više od polovice znanstvenih istraživanja u polju organske kemije (1). Heterociklički spojevi, inače obilno zastupljeni u prirodi, godinama su temelj brojnim otkrićima u polju organske, farmakološke i medicinske kemije, ali i industrije. Poznao je da više od 90% novih lijekova sadržava heterocikličke motive u strukturi te da su vitalna poveznica kemije i biologije (2).

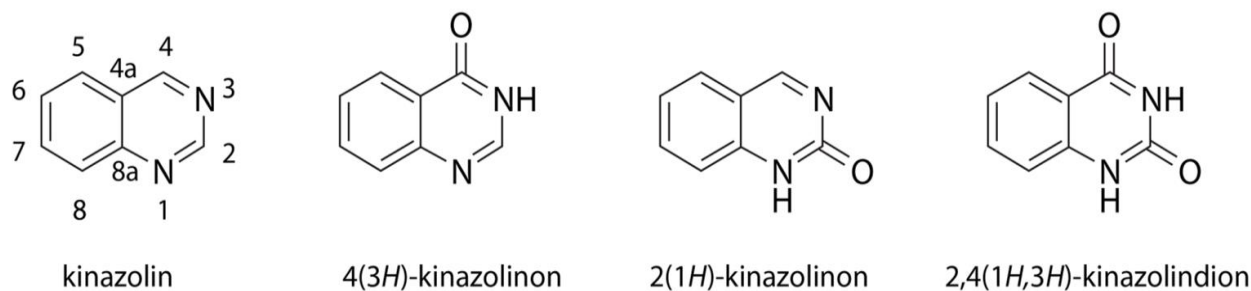
1.2. Kinazolinonski spojevi

1.2.1. Kinazolinoni

Dušikom bogati heterociklički spojevi, kinazolinoni, su ubikvitarne farmakološke jedinice zastupljene u raznim bioaktivnim prirodnim i novosintetiziranim kemijskim spojevima koji se danas uglavnom koriste kao lijekovi u humanoj i veterinarskoj medicini, kao i za zaštitu bilja u obliku agrokemikalija (3).

Kinazolinoni su biciklički spojevi koji se sastoje od dva spojena šesteročlana aromatska prstena, benzenskog i oksidiziranog pirimidinskog. Prva sinteza ovih spojeva objavljena je 1869. god. i napravljena je korištenjem antranilne kiseline i cijanida u etanolu (4). Općenito, ovaj tip sinteze odvija se uvođenjem keto skupine u pirimidinski prsten kinazolina (2). Tek pedesetih godina prošlog stoljeća postaju zanimljivi za primjenu u terapijske svrhe kada su Koepfli i suradnici objavili strukturu kinazolinona febrifugina i izofebrifugina kao antimalarika izoliranih iz kineske biljke *Dichroae Radix*. Ovi prirodni kinazolinoni sintetiziraju se iz antranilne kiseline i triptofana (5).

Ovisno o poziciji okso tj. ketonske skupine razlikujemo tri tipa kinazolinona: 2(1H)-kinazolinoni, 4(3H)-kinazolinoni te 2,4(1H, 3H)-kinazolindioni (slika 1) (5).



Slika 1. Kemijska struktura i podjela kinazolinona

S obzirom na položaj supstituenata kategoriziraju se u 2-supstituirane, 3-supstituirane i 2,3-disupstituirane kinazolinone (5). Svojstva supstituiranih kinazolinona ovise o tome na kojem su prstenu smješteni te o njihovim kemijskim svojstvima (6).

Prirodni kinazolinoni izolirani iz biljaka, mikroorganizama i morskih životinja dugo se koriste u tradicionalnoj medicini te su jedan od najvažnijih izvora biološki aktivnih spojeva za razvoj novih lijekova upravo zbog strukturne i funkcionalne raznolikosti (5). Njihovo djelovanje je primarno antimikrobno, antifungalno, protuupalno, antikonvulzivno i protutumorsko (7). Do 2005. bilo je poznato više od 150 prirodnih kinazolinona, a u posljednjem desetljeću otkriveno ih je još 55, mnogi s izrazitim protutumorskim djelovanjem kao što su Ketominin čiji učinci su značajno bolji od 5-fluorouracila, te Faitantrin A (8). Inhibiraju HSV-1 virus i imaju slabije toksične učinke i bolje antivirusne terapijske učinke i od aciklovira (9).

1.2.2. Kinazolinonski derivati

Ovi derivati predstavljaju grupu spojeva s dodatnim modifikacijama u A i B prstenima. Supstitucije mogu biti raznovrsne i uključivati metilne, amino i amidne skupine, halogene atome i heterocikličke prstenove (5). U literaturi se ističe stabilnost kinazolinonskih prstena prema oksidaciji, redukciji i hidrolizi (2). Upravo ta stabilnost zajedno sa učinkovitim i ekološkim načinima sinteze te lakom dostupnošću spojeva povećali su opseg njihove sinteze s ciljem pripreme boljih kemoterapeutika (3).

1.2.3. Protutumorsko djelovanje derivata kinazolinona

Kinazolinonski kostur sliči purinskoj i pteridinskoj jezgri slijedom čega su otkriveni spojevi koji mogu inhibirati metaboličke puteve purina i folne kiseline (2). Cao i suradnici sintetizirajući derivate kinazolinona s ditiokarbamatnom skupinom dobili su neklasične lipofilne antifolatne lijekove koji su djelovali inhibitorno na dihidrofolat reduktazu (DHFR) i timidilat sintetazu, enzime ključne za sintezu deoksiribonukleotida i DNK (10). Orvieto i suradnici su sintezom pirazolokinazolinona razvili potentne inhibitore poli(ADP-riboza)polimeraze-1 (PARP-1) kao enzima DNK popravka koja se aktivira jednolančanim lomovima, veže na DNK i sudjeluje u oporavku stanice (11). Protutumorsko djelovanje ovi derivati ostvaruju i inhibicijom receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR). To je transmembranska protein kinaza čija povećana ekspresija je u korelaciji s prokrvljenosti tumora i lošom prognozom, a uočena je kod tumora dojke, jajnika, kolona i drugih (7). Ahmed i Belal, uz to što su prikazali citotoksično djelovanje derivata kinazolinona s piridinskom i piranskom jezgrom na stanice tumora jetre, kolona i dojke, uočili su da se ti derivati vežu na ATP - vezno mjesto EGFR tirozin kinaze inhibirajući je za 95% (12). Mnogi kinazolinonski derivati odobreni su kao protutumorski lijekovi, a ističu se Raltitrekstat kao terapija izbora kod kolorektalnog karcinoma, Ispinesib kao antimitotički agens te prirodni Luotonin A, inhibitor DNK topoizomeraze I (5,13).

Dodatno, strukturno modificirani 2,3-disupstituirani derivati kinazolinona ne izazivaju nuspojave i genotoksičnost kao standardni protutumorski lijekovi, a u tome leži potencijal za njihovo uvođenje kao lijekova izbora u liječenju tumora (5).

1.3. *In vitro* kultivacija stanica

1.3.1. Kultura stanica

Uzgoj stanica u kulturi nezaobilazno je oruđe molekularne i stanične biologije jer je izvrstan model za proučavanje fiziologije i biokemije stanica, ispitivanje utjecaja lijekova te karcinogeneze i mutageneze (14). Prednosti kulture stanica svakako su mogućnost manipulacije fizikalno-kemijskim (temperatura, pH, osmotski tlak, tlak O₂ i CO₂) i fiziološkim uvjetima (hormoni i nutrijenti), te ekonomičnost koja podrazumijeva manju potrebu za reagensima u

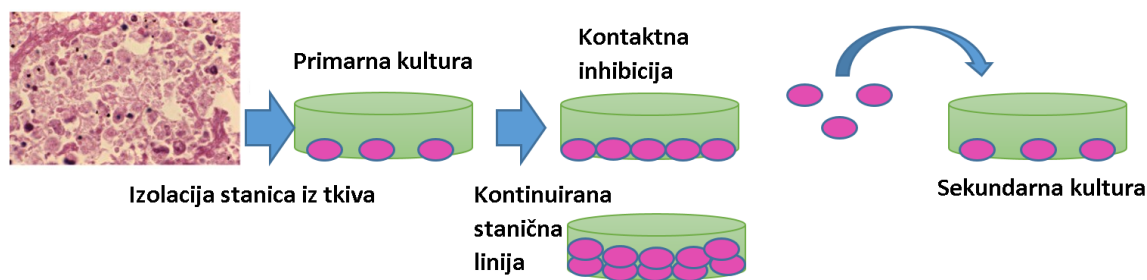
odnosu na ispitivanja *in vivo*, jeftinije testove probira, kao i izbjegavanje zakonskih i etičkih problema vezanih uz upotrebu životinja (15). Konačno, rezultati dobiveni proučavanjem klonalnih stanica su konzistentni i reproducibilni (14).

Temelje razvoja kulture stanica postavlja Harrison 1907. godine kada uspijeva izolirati i kultivirati živčano vlakno iz žabljeg embrija. Početne tehnike su zapravo bile usmjerene ka uzgoju fragmenata tkiva, a kao podloga služila je krvna plazma. Do napretka dolazi 1912. kada Carrel uvodi sterilne tehnike, a do uspostave prve humane stanične linije dolazi tek 1952. kada se stanične linije počinju koristiti u istraživanju malignih tumora. Danas postoji više od 1000 staničnih linija malignih tumora (15).

1.3.2. Principi *in vitro* kultivacije

Održavanje stanica u kulturi zahtijeva pridržavanje strogo aseptičnih uvjeta kako bi se izbjegli kontaminacija i gubitak stanica. Bitan faktor u kultivaciji stanica je medij za uzgoj stanica koji se danas odabire na osnovi potreba stanica za određenim nutrijentima i faktorima rasta (16). Prvi definirani medij opisao je Eagle 1955. On se sastoji od 13, za većinu staničnih kultura esencijalnih aminokiselina, 8 vitamina, glukoze, soli i seruma sisavaca. Serum je bitan sastojak jer sadrži izvor hranjivih tvari, hormona, ali i polipeptidnih faktora rasta koji predstavljaju signale za rast i diferencijaciju (17). Njihovo otkriće dovelo je do uvođenja medija bez seruma čija je prednost selektivnost za određene stanične linije, veća produktivnost te bolja kontrola fiziološkog odgovora u odnosu na osnovni medij (14).

In vitro uzgoj stanica može započeti od primarne kulture koja se dobiva iz tumorskog ili normalnog tkiva, te odražava realnu funkciju stanica u organizmu. Subkultivacijom primarne kulture dobivamo sekundarnu kulturu. Takve kulture ne žive dugo, a broj dioba im se poklapa s brojem dioba *in vivo*. Uspostava kontinuirane stanične linije posljedica je *in vitro* transformacija, a takve su stanice besmrtnne, aneuploidne, te tumorigenične (slika 2).



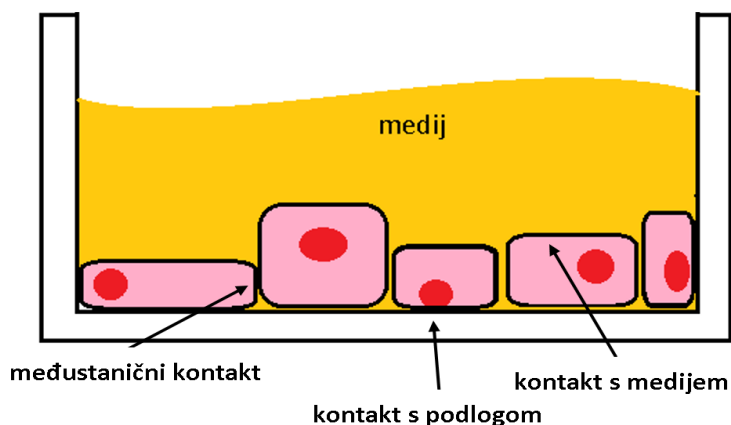
Slika 2. Principi stanične kultivacije

S obzirom na način rasta stanice mogu biti adherentne i suspenzijske. Adherentne stanice korištene su u ovom radu, a rastu u monosloju radi kontaktne inhibicije rasta te su vezane za nabijenu podlogu. Zbog toga njihova subkultivacija zahtijeva primjenu agensa za odvajanje od podloge (npr. tripsin-EDTA, pronaza, dispaza, kolagenaza). Koriste se u citologiji, a u usporedbi sa suspenzijskim stanicama učinkovitije izlučuju proizvode (antitijela, hormone, antibiotike). Stanice u suspenziji lakše se subkultiviraju jednostavnim oduzimanjem volumena ili razrjeđivanjem no zahtijevaju svakodnevno brojanje i određivanje vijabilnosti (14). Za uspješnu kultivaciju vitalan je rad u aseptičnim uvjetima u kabinetu s laminarnim protokom zraka, održavanje odgovarajuće koncentracije CO₂ (5-10%), vlažnosti i temperature (37°C) pomoću inkubatora te pH (7,4) jer kod promjene boje indikatora (fenolnog crvenila) u mediju već postoji opasnost staničnog oštećenja (14).

1.4. Dvodimenzionalna (2D) kultura stanica

Konvencionalna 2D kultura stanica podrazumijeva prihvaćanje stanica na površinu stakla ili plastike te rast u monosloju, što je neprirodno mnogim staničnim tipovima. Stanice su spljoštene te je približno 50% površine stanica izloženo mediju, 50% podlozi, a tek mali postotak u dodiru je s ostalim stanicama (slika 3). Homogeni stanični rast i proliferacija rezultat su podjednake opskrbe nutrijentima i faktorima rasta, a koji često dovode do prenaplašenog učinka u testovima citotoksičnosti pa su se stoga pokazale kao loš model procjene djelotvornosti lijekova sa stopom neuspjeha od 95% (18, 19). Iako je 2D kultura jednostavna, jeftina, laka za interpretaciju, te je omogućila bolje razumijevanje mehanizama rasta tumorskih stanica, takva metoda ne oponaša vjerodostojno fiziologiju, mikrookoliš i stanične interakcije tumorskih i normalnih tkiva *in vivo*. U 2D kulturi nedostaju međustanične interakcije te interakcije stanica i izvanstaničnog prostora, koje utječu na diferencijaciju, proteinsku i gensku ekspresiju i metabolizam lijekova. Uslijed adaptacije na rigidnu površinu, morfologija i mehanizam diobe

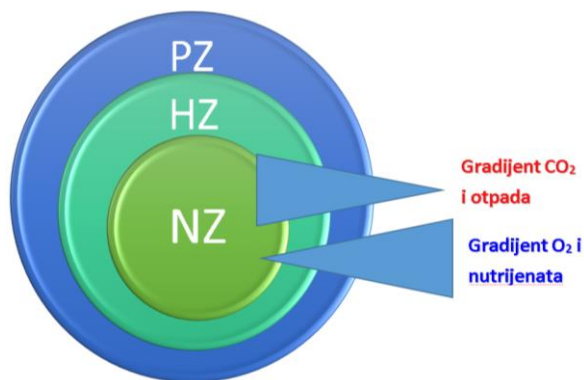
stanice se mijenjaju. Gubitak polarnosti, koja regulira stanični odgovor na razne pojave kao što je apoptoza, te smanjena fenotipska raznolikost također su rezultat 2D kulture stanica (20).



Slika 3. Prikaz staničnih interakcija u 2D kulturi

1.5. Trodimenzionalna (3D) kultura stanica

3D kultura stanica podrazumijeva uzgoj stanica u okruženju bliskom onom u živom sustavu. Stanice u 3D okolišu održavaju svoj oblik obično u obliku sferoida. U njemu su stanice smještene u slojevima u različitim stadijima rasta. Vijabilne, proliferirajuće stanice čine vanjski sloj ili proliferacijsku zonu (PZ), dok stanice u jezgri generiraju hipoksičnu zonu (HZ) s nekrotičkim središtem (NZ) (21). Takva heterogenost stanica te uspostava gradijenata kisika i hranjivih tvari nalazi se i kod tumora *in vivo* (slika 4). Bitan element 3D kulture je stvaranje izvanstaničnog prostora koji podupire stanice, izlučuje faktore rasta i sudjeluje u staničnoj signalizaciji i komunikaciji (22). U odnosu na 2D kulturu, stanice u 3D kulturi su stabilnije, polarizirane, dugovječnije i potpuno okružene drugim stanicama i izvanstaničnim prostorom (19).



Slika 4. Kompozicija staničnog sferoida; PZ proliferacijska zona, HZ hipoksična zona, NZ nekrotična zona

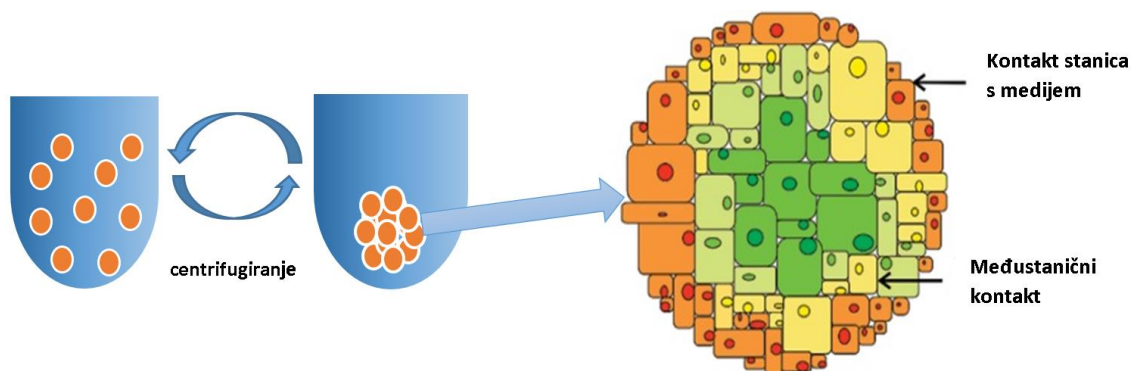
1.6. Metode 3D kultivacije stanica

Temeljne metode 3D kultivacije su: metode bez nosača, metode s nosačima, bioreaktori i mikročipovi (22).

1.6.1. Metode bez nosača

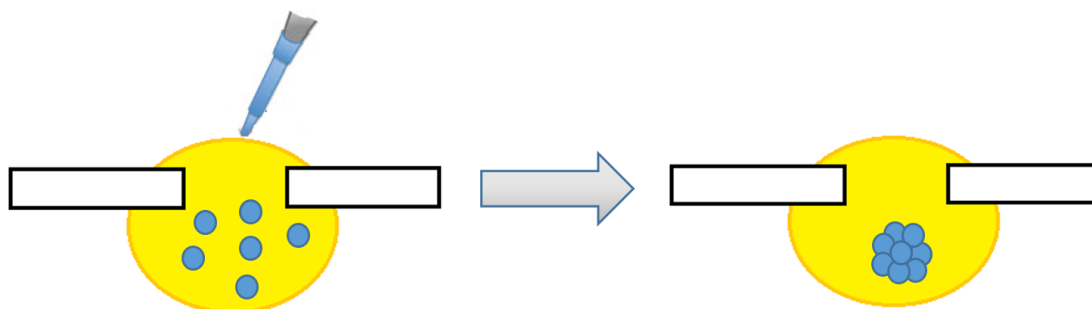
Metode bez nosača podrazumijevaju formiranje sferoida kao samouspostavljenih nakupina stanica koji izlučuju vlastiti izvanstanični prostor te su sjajan fiziološki model. Razlikujemo dvije bitne metode (22).

Prva je metoda plutajućih stanica (eng. *forced floating*) u kojoj nakon nasađivanja stanica u jažice konusnog dna, mikrotitarske ploče centrifugiramo potičući nastanak sferoida (slika 5). Prijanjanje stanica za stjenke ploče sprječavamo oblaganjem stjenki 0,5 % poli-HEM-om (poli-2-hidroksietil metakrilatom). Metoda je jednostavna i reproducibilna, a veličina sferoida prilagođava se promjenom broja nasađenih stanica (23).



Slika 5. Metoda plutajućih stanica

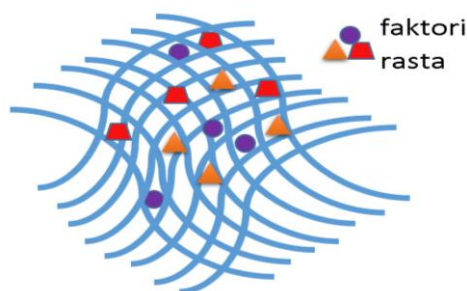
Metoda viseće kapi (eng. *hanging drop*) koristi male alikvote stanične suspenzije koji se pipetiraju u jažice bez dna. Ploče se zatim uzastopno okreću, a alikvoti stanične suspenzije tvore viseće kapi koje na mjestu drži površinska napetost (slika 6). Stanice akumuliraju na dnu kapi i tvore sferoide. Jednostavna je, s gotovo 100%-tnom reproducibilnošću (21,23).



Slika 6. Metoda viseće kapi

1.6.2. Metode s nosačima (3D matricama)

Matrice ili nosači dostupni su u vidu materijala različitih poroznosti i propusnosti s ciljem oponašanja izvanstaničnog prostora (slika 7) (22). Dva različita pristupa kod ovih metoda su raspršivanje u tekućem hidrogelu i polimerizacija te nasađivanje stanica na acelularni 3D matriks (21).



Slika 7. Nosači za 3D kulturu

Hidrogelovi sadrže visok postotak vode i križno povezan biomaterijal kao što je agaroz, kolagen ili hijaluronska kiselina (24). Jedan od najpoznatijih je Matrigel™, koji je animalnog podrijetla. Tkivna mekoća, vjerno oponašanje izvanstaničnog prostora te raznolikost prirodnih i sintetičkih materijala doveli su do popularnosti gelova u tumorskim istraživanjima (21,22).

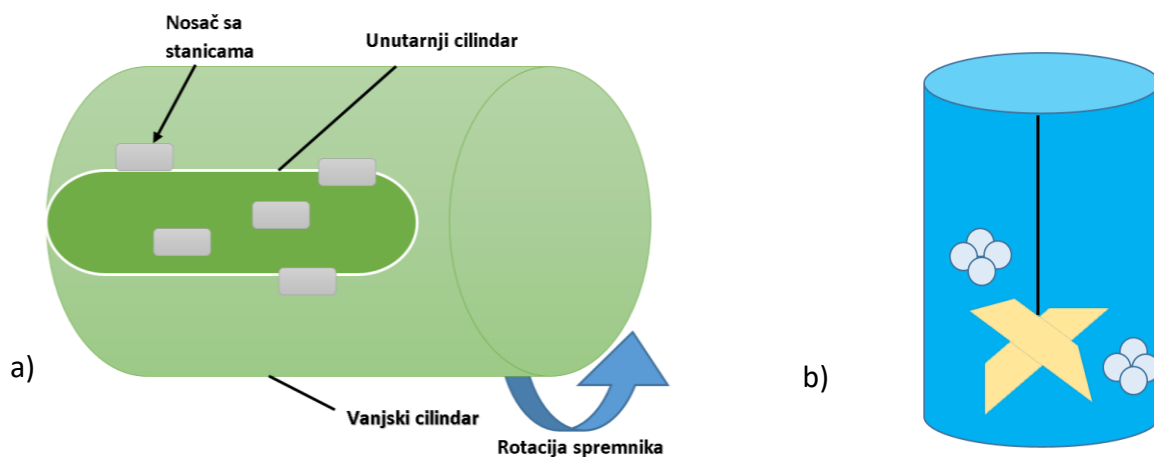
Mikroporozni nosači građeni su najčešće od polistirena i PLGA (eng. *poly lactic-co-glycolic acid*). Prednost im je definirana geometrija i fiksna veličina pora (21). Pore bi trebale

biti međusobno povezane i dovoljno velike da omogućue rast stanicama, opskrbu nutrijentima i uklanjanje otpadnih tvari (25).

1.6.3. Bioreaktori

Oni su najidealniji za masovnu staničnu proizvodnju, a uključuju protok medija i time cirkulaciju nutrijenata i otpadnih tvari te homogenost okoliša u reaktoru (22).

Pokretne boce bioreaktora (eng. *spinner flask*) sastoje se od spremnika sa staničnom suspenzijom i miješalice (slika 8.b). Medij se može često mijenjati što omogućuje dugotrajnu kultivaciju, no sila miješanja može utjecati na staničnu fiziologiju (26).

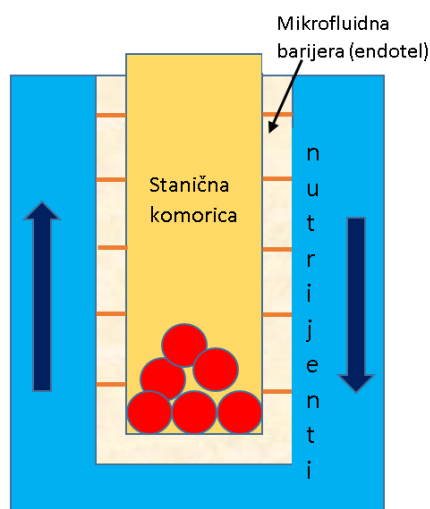


Slika 8. Dva tipa bioreaktora a) sustav rotacijske kulture; b) pokretna boca bioreaktora

U sustavu rotacijske kulture (eng. *rotating cell culture*), za razliku od pokretnih boca, sam spremnik se rotira, a održavanje gibanja tekućine osigurava niskoturbulentno okruženje s minimalnom silom na stanice (slika 8.a) (27). Sedimentacija se sprječava prilagođavanjem brzine okretanja, a prvotno ju je razvila NASA (eng. *National Aeronautics and Space Administration*) za oponašanje mikrogravitacije (23).

1.6.4. Mikročipovi ili organi na čipu

Mikročipovi kombiniraju tehnologiju mikrovlakana, koja stvara strukturirani 3D mikrookoliš s kontrolom oblika i funkcije stanica te mikrotekućinsku tehnologiju za kontroliranu dostavu nutrijenata i kemijskih signala stanicama. To omogućuje rekonstrukciju tkivnih sučelja i prikaz mikroarhitekture organa (28) (slika 9).



Slika 9. Rekonstrukcija jetrene arhitekture na čipu

1.7. Tumorske bolesti

Tumorske bolesti su u svojoj osnovi genska bolest jer je promjena odgovorna za zloćudnu preobrazbu genska mutacija. Oni su monoklonskog podrijetla, jer nastaju zloćudnom preobrazbom jedne zdrave stanice koja je akumulirala brojna oštećenja gena supresora i antionkogeni. Prema Hanahanu i Weinbergu tumori zaobilaze apoptozu, samodostatni su s obzirom na signale rasta, a neosjetljivi na inhibicijske signale rasta te imaju neograničen proliferacijski potencijal te sposobnost invazije i angiogeneze. Također, poremećena su metabolizma, nose genomsku nestabilnost, izazivaju upalu i izmiču imunosnom sustavu (29).

1.7.1. Laboratorijska dijagnostika u tumorskim bolestima

Zloćudni je rast praćen upalom pa se u serumu povećava koncentracija reaktanata akutne faze pa imamo povišene α -2 globuline i sedimentaciju eritrocita. Dodatno, povećana aktivnost alkalne fosfataze i bakra te sniženi kolesterol, željezo i TIBC (ukupni kapacitet vezanja željeza) kao i krv u stolici trebaju pobuditi sumnju na maligni proces. Aktivnost mnogih enzima u serumu također se mijena, a ovisi o masi zloćudnog tkiva jer tumori imaju karakterističan sastav enzima. Najviše rastu glikolitički enzimi (aldolaza, fosfoheksoza izomeraza i laktat dehidrogenaza), posebno u metastazama. Kod zloćudnih monoklonskih gamopatija određuju se i Bence Jonesovi proteini u serumu i mokraći (30). Pošto su ti nalazi nespecifični, za dijagnozu se danas rabe tumorski biljezi. To su hormoni, proteini i amini čija je osnovna vrijednost u praćenju tijeka bolesti, a zbog premale osjetljivosti nisu pogodni za probir (29).

1.7.2. Uloga 3D kulture u istraživanju i liječenju tumora

Veliki napori ulažu se u otkrivanje novih i učinkovitih protutumorskih lijekova jer je rak i dalje jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svijetu (31). Potraga za novim lijekovima obično počinje detekcijom potencijalnih kandidata. Pretkliničko testiranje se zatim provodi koristeći *in vitro* stanične modele, gdje više od 80% znanstvenika koristi 2D kulturu radi njihove pogodnosti i brzine te *in vivo* životinjske modele koji su često preskupi te povlače etičke probleme (23,32). Kliničko testiranje se na kraju obavlja na ljudima. Iako je sve veći broj potencijalnih protutumorskih lijekova, postotak onih koji prođu kliničku fazu i pokažu se djelotvornima tek je 5% (31). Radi visoke cijene procesa odobravanja lijekova imperativ je što brže isključivanje nedjelotvornih i toksičnih onkoloških lijekova (23).

3D kultura stanica, napose u obliku sferoida pokazala se vjerodostojnim i ključnim pokazateljem mikrookoliša, fenotipa i heterogenosti tumora *in vivo* (23). Čak 30% gena drugačije je izraženo u odnosu na 2D kulturu što omogućuje otkrivanje novih signalnih puteva i ciljnih mjesta djelovanja lijekova (21). Na taj se način pronašao uzrok kemorezistencije mezotelioma i pronašla nova meta (argininosukcinat sintaza) koja je povećala osjetljivost na protutumorski lijek *in vivo*. Sferoidi su

korišteni i za proučavanje metastaziranja gdje se pratila invazija stanica iz sferoida u izvanstanični prostor. Arhitekturna transformacija iz preinvazivnog u stadij potpune zloćudnosti pokazana je na sferoidnom modelu karcinoma dojke (33).

Za prikazivanje tumorske heterogenosti rabe se sferoidne kokulture tj. višestanični tumorski modeli jer se zna da mikrookoliš ima vitalnu ulogu u tumorskom odgovoru na terapiju. Tumoroidni model tako sadrži smjesu različitih staničnih tipova nekog tumora i prati njihovo ponašanje tijekom primjene terapije. Koriste se i kokulture s endotelnim stanicama i fibroblastima, koji djeluju na rast tumorskih matičnih stanica. Posebno zanimljiva je kultura sferoidnog fragmenta, izvedena iz tumorskog bioptičkog materijala te je temelj individualizirane protutumorske terapije (34).

Tumorske matične stanice potencijalna su meta novih protutumorskih lijekova, a zna se da ih čini nekoliko subpopulacija koje imaju ulogu u inicijaciji, održavanju i metastaziranju tumora (33). Pokazano je da samo one terapije koje ih eradiciraju imaju učinka u liječenju. Mnoga istraživanja ukazuju da ih se jedino može održati u sferičnoj 3D kulturi u mediju bez seruma te su isto tako temelj individualiziranog tumorskog liječenja (34).

2. CILJ

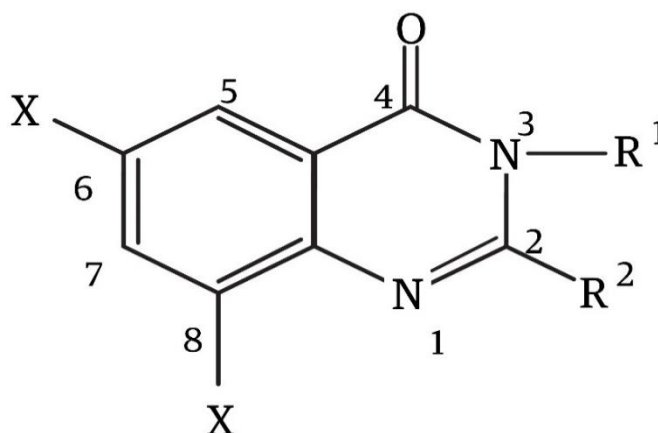
- ❖ Odrediti razlikuje li se citotoksičnost novih derivata kinazolinona na normalnim stanicama i tumorskim stanicama u uvjetima 2D i 3D kulture *in vitro*.
- ❖ Ustanoviti povezanost između strukture i koncentracije novih spojeva i inhibicije rasta.
- ❖ Definirati supstanciju koja ima najveću učinkovitost na rast tumorskih stanica, a da istovremeno ne djeluje inhibitorno na rast kulture epitelnih stanica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Ispitivani spojevi

Novosintetizirani derivati kinazolinona korišteni za tretiranje normalnih i tumorskih staničnih linija sintetizirani su na Zavodu za primijenjenu kemiju i ekologiju Prehrambeno tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Osijeku (slika 10). Spojevi su dobiveni u prahu te su za potrebe *in vitro* testiranja otopljeni u dimetil sulfoksidu (DMSO) u koncentraciji 1×10^{-2} M (mol/dm^3) te potom pohranjeni na -20 °C do uporabe. Neposredno prije testiranja pripremljene su radne otopine otapanjem stock otopine (1×10^{-2} M) u destiliranoj vodi čija su završna razrjeđenja bila 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M i 1×10^{-6} M.



Slika 10. Opća strukturna formula kinazolinona

3.1.2. Kemikalije

- ❖ DMEM, s visokim udjelom glukoze (4.5 g/L) i L-glutaminom, Capricorn Scientific GmbH (Slough, Velika Britanija)
- ❖ Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640), Lonza (Basel, Switzerland),
- ❖ Fetalni goveđi serum (FBS), Na-piruvat i antibiotik-antimikotik (penicilin–streptomycin) 100 x, GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija)
- ❖ DMSO, dimetilsulfoksid 99,8%, Acros organics (New Jersey, SAD)
- ❖ Tripan plavilo 0.4%, 0.8 % NaCl, sterilno filtriran, Lonza (Basel, Švicarska)

- ❖ 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) BioChemica, AppliChem (Darmstadt, Njemačka)
- ❖ Tripsin/EDTA, tripsin 0.25%, 1Mm EDTA-Na₄ u HBSS, s phenolred, Panbiotech GmbH (Aidenbach, Njemačka)

3.1.3. Stanične linije

Učinak novih derivata kinazolinona testiran je na panelu komercijalno dostupnih humanih staničnih linija i jednoj animalnoj staničnoj liniji.

Adherentne stanične linije korištene u radu su:

- ❖ HeLa (ATCC® CCL-2™) - humane epitelne stanice adenokarcinoma cerviksa , prva i najčešće korištena humana stanična linija izdvojena iz tkiva raka vrata maternice Henriette Lacks po kojoj je dobila ime
- ❖ CaCo-2 (ATCC® HTB-37™) - epitelne stanice humanog karcinoma kolona, odlikuje se visokim stupnjem heterogenosti i često se koristi u studijama lipidnog transporta (35)
- ❖ NCI-H358 (ATCC® CRL-5807™) - epitelne stanice bronhioalveolarnog karcinoma
- ❖ MDCK-1 (ATCC® CCL-34™) – stanična linija epitela distalnog kanalića bubrega psa, važan model u istraživanju epitela (36)

Stanične linije korištene u 3D kulturi su:

- ❖ HeLa (ATCC® CCL-2™)
- ❖ CaCo-2 (ATCC® HTB-37™)
- ❖ NCI-H358 (ATCC® CRL-5807™)

3.2. METODE

3.2.1. Kultivacija stanica *in vitro*

Kultivacija stanica koja se izvodi u laboratoriju za kulturu stanica zahtijeva rad u sterilnim uvjetima u kabinetu s laminarnim protokom zraka. Stanične kulture se pohranjuju u kriotubicama u tekućem dušiku uklopljene u medij za smrzavanje (FBS + medij + DMSO). Kod odmrzavanja stanice je potrebno prebaciti u tubice s medijem, centrifugirati (1100 rpm, 6 min), ukloniti medij te ih resuspendirati u svježem mediju i prebaciti u boce za kultivaciju.

Stanice se uzgajaju u bocama za kultivaciju površine rasta 25 i 75 cm² (BD Falcon, Njemačka) u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlifeTM, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pri 37 °C/5% CO₂ te visoku vlažnost.

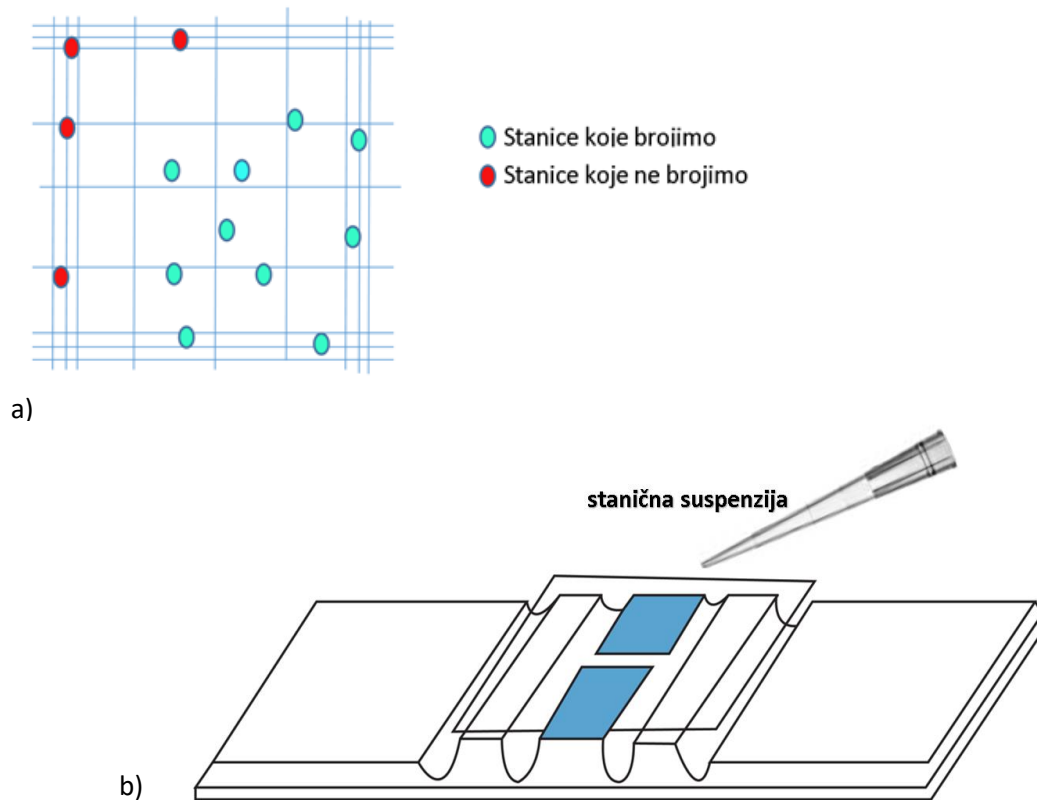
Adherentne stanične linije HeLa, CaCo-2 i MDCK1 uzgajane su u DMEM mediju uz dodatak 10% FBS-a, 2 Mm glutamina i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomocina. Adherentna stanična linija NCI-H358 iznimno je kultivirana u RPMI 1640 mediju.

Konfluentnost stanica provjerava se svakodnevno invertnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka). Za odvajanje adherentnih stanica od podloge koristio se 0,25% tripsin/EDTA. Stanice se tripsiniziraju 6 min u CO₂ inkubatoru nakon čega se tripsin inaktivira dodatkom medija za uzgoj.

3.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi

Vijabilnost stanica ključan je faktor uspješne stanične kulture. Oni određuju kvalitetu i reproducibilnost rezultata. Broj stanica i vijabilnost određuju se bojanjem stanične suspenzije tripan plavilom. Uzme se 50 µL resuspendirane stanične suspenzije te se prenese u jažicu i doda boja tripan plavilo (slika 11.b). Stanična suspenzija s bojom nanosi se na Bürker-Türkovu komoricu, a brojanje se vrši pomoću invertnog mikroskopa.

Brojimo žive stanice koje su neoboјane jer imaju intaktnu staničnu membranu te aktivno izbacuju boju pomoću membranskih pumpi. U mrtvim stanicama se boja nakuplja. Brojimo stanice unutar 4 kvadrata te one u gornjem i jednom od postranih bridova kvadrata (slika 11.a).



Slika 11. a) Mikroskopski prikaz Bürker-Türk komorice, b) nanošenje stanične suspenzije sa tripan plavilom na Bürker-Türk komoricu

Broj živućih stanica određen je formulom:

$$N/4 \cdot 3 = X \cdot 10^4 \text{ stanica/cm}^3$$

Gdje je:

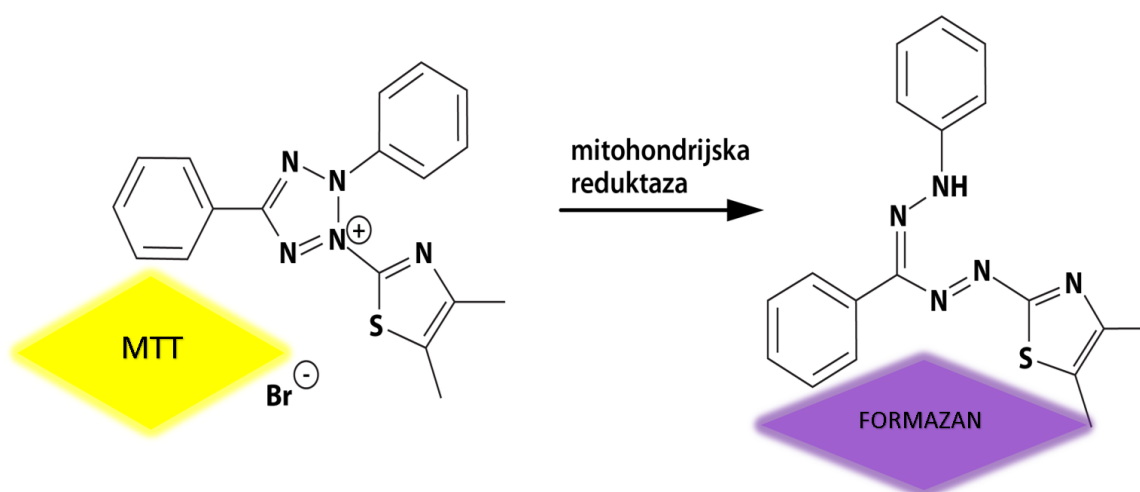
N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – faktor razrjeđenja

3.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom

MTT je kolorimetrijski metabolički test koji ne mjeri preživljenje direktno već ga definira kao sposobnost zadržavanja proliferativne ili metaboličke sposobnosti nakon uklanjanja toksičnog supstrata. Ne razlikuje između smanjenog broja stanica i smanjenja metaboličke aktivnosti (15). Mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza metabolički aktivnih stanica reducira tetrazolijeve soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2, 5-difeniltetrazolium bromid) što rezultira stvaranjem tamnoljubičastih kristala formazana koji se nakuplja u stanicama (slika 12). Formazan se otapa u DMSO-u ili 10% SDS-u u HCL-u. Intenzitet obojenja očitava se spektrofotometrijski pomoću mikročitača i proporcionalan je broju metabolički aktivnih stanica.



Slika 12. Prikaz principa MTT metode

Postupak MTT testa u 2D kulturi : Adherentne stanične linije nasadene su na mikrotitarske ploče u koncentraciji 2×10^4 st/mL u volumenu od 200 μ l (180 μ l stanične suspenzije i 20 μ l spoja). Nasadujemo i kontrole stanica koje ostaju netretirane. Kontrole početnog broja stanica pohranjuju se u dvije epruvete od 1 ml te se ostave na -20 °C do kraja testa. Stanice su se inkubirale na 37 °C/24 h u CO₂ inkubatoru. Na prvi dan testa stanice su tretirane derivatima kinazolinona u finalnim koncentracijama od 1×10^{-4} , 1×10^{-5} i 1×10^{-6} M. Nakon inkubacije od 72 h medij se uklonio a stanice su tretirane 1X MTT/PBS-om u koncentraciji od 5 mg/mL. Stanice su potom inkubirane u inkubatoru 4 h. Da bi se formazanski kristali otopili dodano je 160 μ l DMSO-a u svaku jažicu, uz laganu trešnju na tresilici (OS-10

Orbital Shaker, Biosan, Latvia) na sobnoj temperaturi. Rezultati su dobiveni na mikročitaču (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) na valnoj duljini od 595 nm.

Postupak MTT testa u 3D kulturi: Stanične linije namijenjene formiranju staničnih sferoida najprije se tripsiniziraju te resuspendiraju u mediju za uzgoj stanica. Stanice su nasadene na mikrotitarske ploče u koncentraciji 1×10^4 st/mL u volumenu od 200 μ l. Ploče sa stanicama centrifugirane su na 1100 rpm 10 min pri 25 °C. Nakon centrifugiranja ostavljene su u inkubatoru 72 h na 37 °C i 5% CO₂ radi formiranja staničnih sferoida. Po isteku vremena inkubacije dio medija je zamijenjen novim te su stanice tretirane sa 20 μ l derivata kinazolinona u finalnoj koncentraciji 1×10^{-4} M. Nakon 72 h medij se uklonio a stanice su tretirane 1X MTT/PBS-om u koncentraciji od 5 mg/ml. Nakon inkubacije od 4h dodano je 160 μ l DMSO-a u svaku jažicu te su ploče ostavljene na tresilici 20 min kako bi se otopili kristali formazana. Rezultati su dobiveni na mikročitaču na valnoj duljini od 595 nm.

Nakon dobivenih rezultata apsorbancije, kontrola i pozadine (background), određen je udio preživljenja stanica koji se izražava prema sljedećoj formuli:

$$\text{vijabilnost (\%)} = \frac{A_{\text{tretman}} - A_{\text{background}}}{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{background}}} \times 100$$

3.2.7. Statistička obrada podataka

Testovi citotoksičnosti obavljani su u triplicatu te prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija ($\pm SD$) za tri neovisna mjerenja. Rezultati su analizirani primjenom statističkog programa STATISTICA 13.0 za Windows operativne sustave. Normalnost raspodjele podataka određena je Kolmogorov Smirnovim testom. Za analizu statističke značajnosti razlike između testiranih kultura i kontrole korišten je neparametrijski Mann-Whitney test uz statističku značajnost $p < 0,05$. Kod usporedbe 2D i 3D kulture stanica korišten je one way ANOVA test. Za sve stanične linije napravljen je graf te su statistički značajni rezultati označeni zvjezdicom iznad stupca (*).

4. REZULTATI

4.1. Određivanje citotoksičnog učinka derivata kinazolinona na 2D kulturu stanica MTT testom

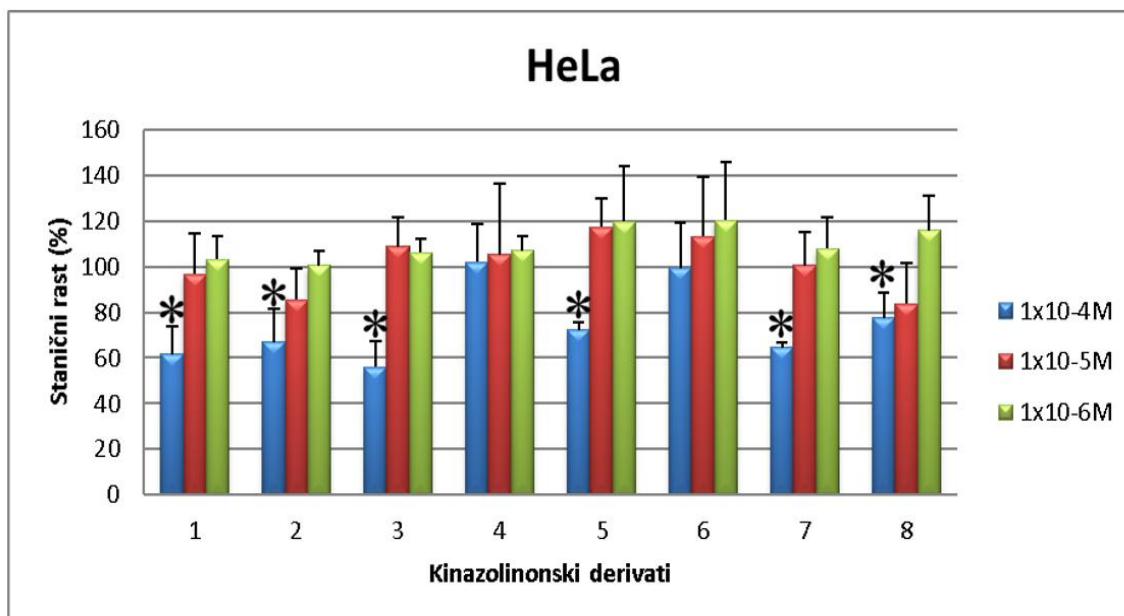
Citotoksičan učinak novih derivata kinazolinona praćen je na tri adherentne tumorske stanične linije (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358) i jednoj normalnoj staničnoj liniji (MDCK1). Stanice su bile izložene djelovanju derivata kinazolinona označenih rednim brojevima **1-8** u koncentracijama 1×10^{-4} , 1×10^{-5} i 1×10^{-6} M. Rezultati prikazuju postotak staničnog rasta navedenih staničnih linija u odnosu na kontrolne netretirane stanice te su prikazani na slici 13(a-d).

HeLa stanična linija pokazala se najosjetljivijom, njen rast pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 1×10^{-4} M statistički značajno inhibirali su derivati **1, 2, 3, 5, 7 i 8**. Ističe se derivat **3** s inhibicijskim učinkom od 44% te derivat **1** s učinkom od 38%. Pri testnim koncentracijama od 1×10^{-5} i 1×10^{-6} M niti jedan derivat nije doveo do znatnije inhibicije rasta, a derivati **4 i 6** nisu djelovali inhibicijski ni pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji (slika 13.a).

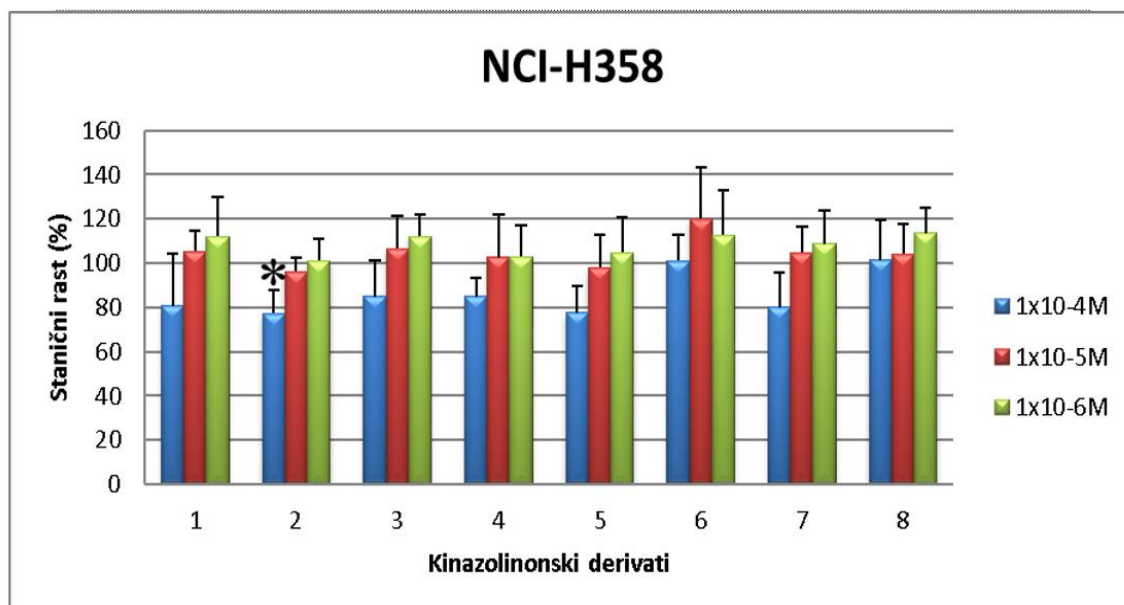
Na rast stanica NCI-H358 utjecao je samo derivat **2** pri koncentraciji 1×10^{-4} M maksimalno postignutom inhibicijom rasta od 23% dok ostali testirani derivati nisu imali učinka (slika 13.b).

CaCo-2 stanična linija pokazala se nešto osjetljivijom od prethodne te je rast stanica značajno inhibiran derivatima kinazolinona **2, 3, 5 i 7** pri najvišoj koncentraciji od 1×10^{-4} M pri čemu se ističu inhibicijski učinci derivata **3** od 36% i derivata **7** od 28%. U preostalim dvjema koncentracijama izostaje inhibicijski učinak svih testiranih derivata, a kod derivata **4 i 6** izostanak inhibicije je vidljiv i kod koncentracije 1×10^{-4} M kao i kod HeLa stanične linije (slika 13.c).

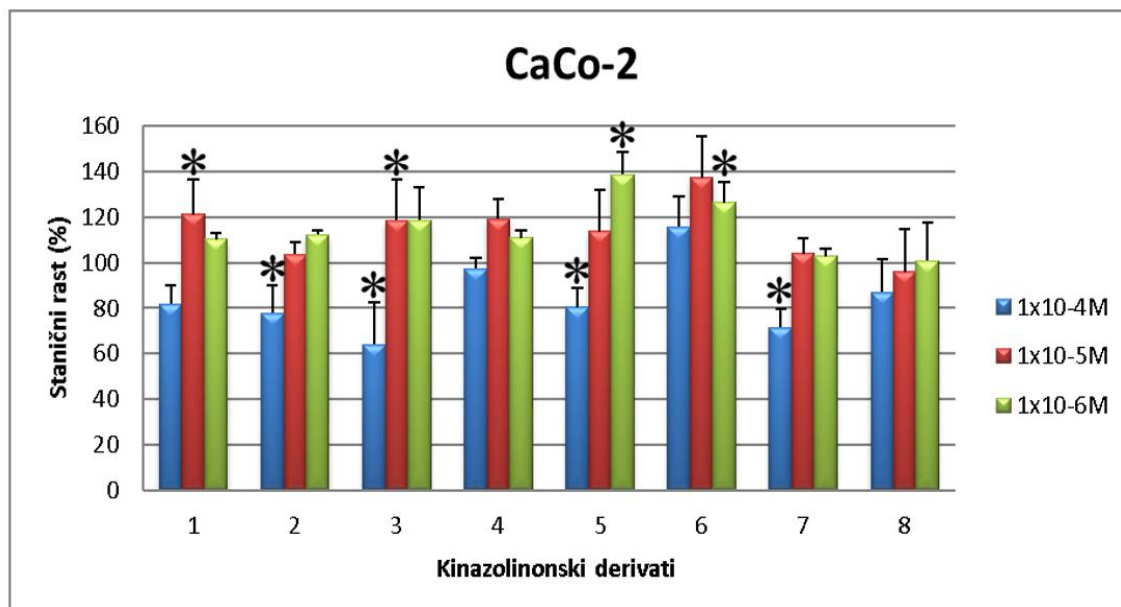
Kod MDCK1 stanične linije bitan nam je što manji inhibicijski učinak jer se radi o normalnim stanicama. Ispitivani derivati **4 i 6** ne pokazuju inhibicijski učinak niti na jednoj koncentracijskoj razini. Derivati kinazolinona **1, 2, 3, 5, 7 i 8** djeluju značajno inhibicijski samo pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji pri čemu najveći citotoksični učinak ima derivat **1** sa učinkom od 44% (slika 13.d)



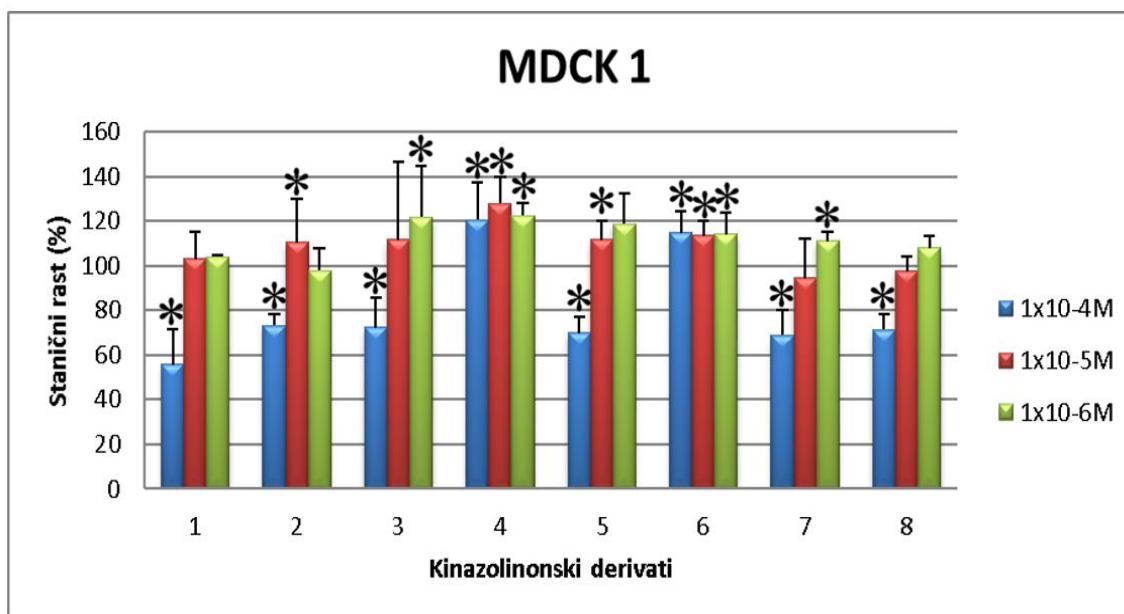
Slika 13. a)



Slika 13. b)



Slika 13. c)



Slika 13. d)

Slika 13. (a-d) Citotoksičan učinak derivata kinazolinona u 2D kulturi. Ispitivane stanične linije izložene su djelovanju derivata kinazolinona kroz 72 h pri koncentracijama 1×10^{-4} , 1×10^{-5} i 1×10^{-6} M. Citotoksičnost je određena MTT testom u tri vremenski nezavisna ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05$ (*) u odnosu na kontrolne ne tretirane stanice.

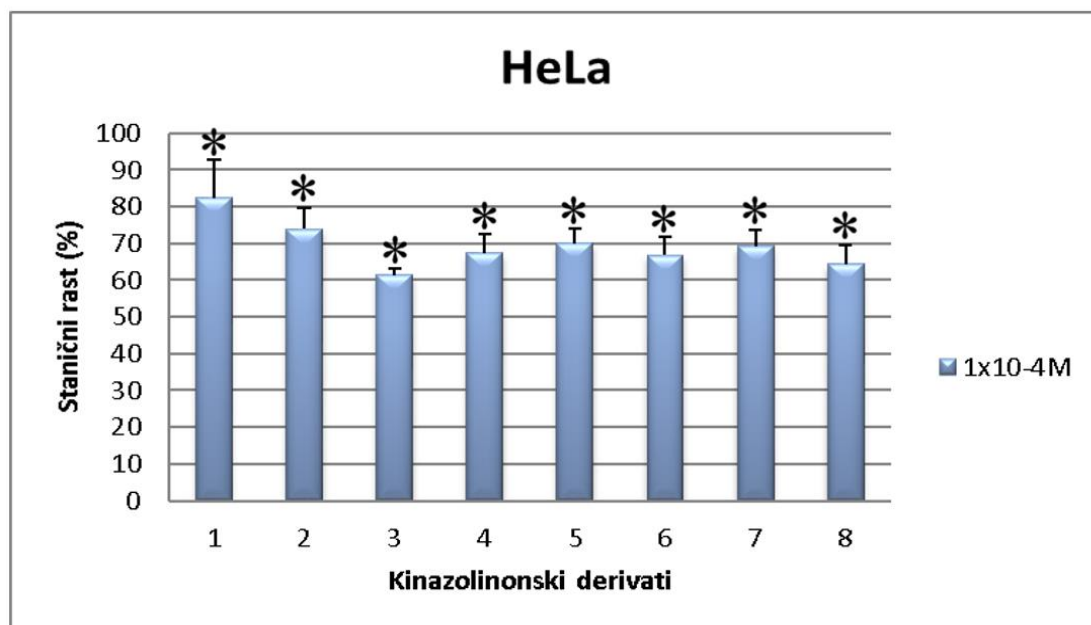
4.2. Određivanje citotoksičnog učinka derivata kinazolinona na 3D kulturu stanica MTT testom

Citotoksičan učinak novih derivata kinazolinona u 3D staničnoj kulturi praćen je na tri adherentne tumorske stanične linije (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358). Stanice su bile izložene djelovanju derivata kinazolinona označenih rednim brojevima **1-8** u koncentraciji od 1×10^{-4} M. Rezultati prikazani na slici 14(a-c) pokazuju postotak staničnog rasta navedenih staničnih linija u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

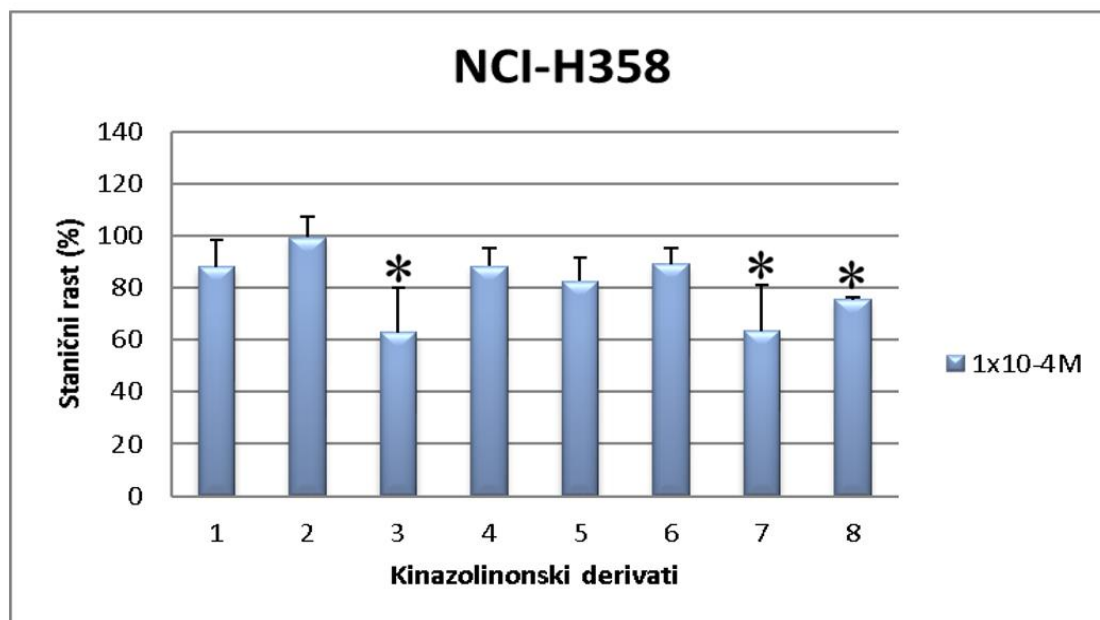
Na 3D kulturu HeLa stanične linije, statistički značajno inhibicijski djelovali su svi ispitivani derivati kinazolinona. Ističu se derivati **3** i **8** koji su ostvarili inhibiciju rasta od 39 % odnosno 36% dok su derivati **4, 5, 6, i 7** ostvarili podjednak citotoksični učinak od oko 30% (slika 14.a).

Derivati **3, 7, i 8** statistički su značajno inhibirali NCI-H358 staničnu liniju u 3D kulturi. Derivati **3** i **7**, kao najpotentniji, doveli su do inhibicije staničnog rasta od oko 37%, a derivat **8** od 25%. (slika 14.b).

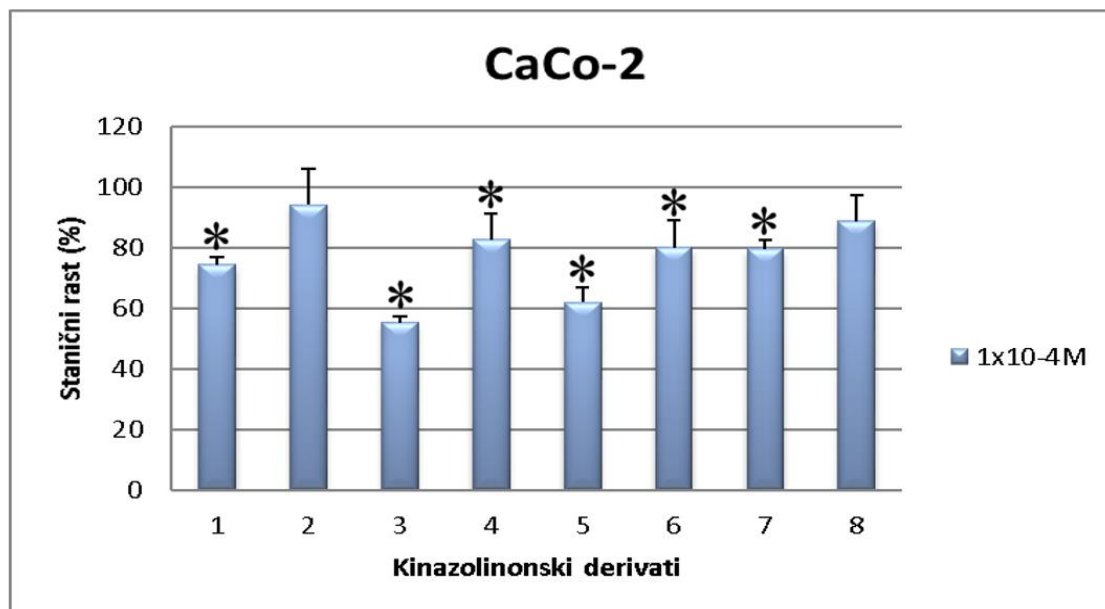
CaCo-2 stanična linija u 3D kulturi značajno je inhibirana derivatima kinazolinona **1, 3, 4, 5, 6 i 7**. Derivat **3** pokazao se najaktivnijim kao i u prethodne dvije testirane stanične linije te uzrokovao 45 %-tnu inhibiciju rasta. Zamjetan inhibicijski učinak ostvario je i derivat **5** s postotkom inhibicije od 38% (slika 14.c).



Slika 14.a)



Slika 14. b)



Slika 14. c)

Slika 14.(a-c) Citotoksičan učinak derivata kinazolinona na stanice u 3D kulturi. Ispitivane stanične linije izložene su djelovanju derivata kinazolinona kroz 72 h pri koncentraciji 1×10^{-4} M. Citotoksičnost je određena MTT testom u tri vremenski nezavisna ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05$ (*) u odnosu na kontrolne ne tretirane stanice.

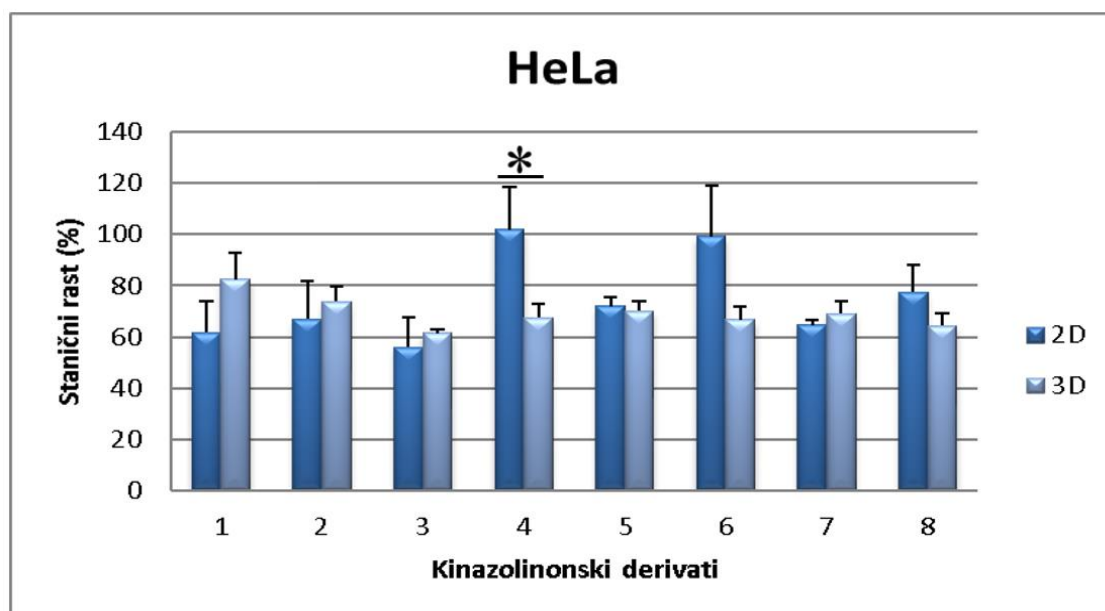
4.3. Usporedba citotoksičnog učinka derivata kinazolinona u 2D i 3D kulturi stanica

Usporedba rezultata dobivenih uzgojem stanica u 2D i 3D kulturi *in vitro* na tumorskim staničnim linijama HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 koje su tretirane derivatima kinazolinona **1-8** u koncentraciji od 1×10^{-4} M prikazana je na slici 15(a-c).

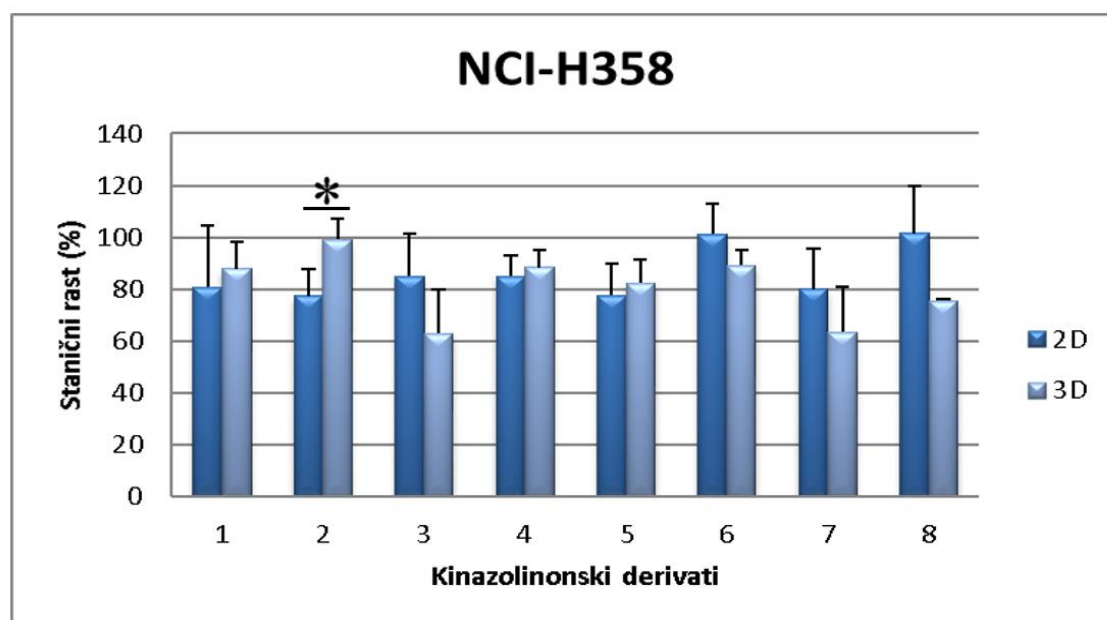
Usporedbom djelovanja derivata kinazolinona u 2D i 3D kulturi HeLa stanične linije uočen je statistički značajan bolji učinak derivata **4** od 35 % na 3D kulturu stanica ($p=0,026$). Bolji učinak na 3D kulturu postigao je i derivat **8**, te derivat **6** čiji je rezultat na granici značajnosti ($p=0,052$). Derivat **1** 21% jače je inhibirao 2D kulturu HeLa stanica. Ostali derivati pokazali su slične inhibicijske učinke u obje kulture (slika 15.a).

Derivat **2** je statistički značajno bolje djelovao na 2D kulturu NCI-H358 stanične linije sa razlikom od 22% u odnosu na 3D kulturu ($p=0,045$). Uočena je i veća osjetljivost 3D kulture u odnosu na 2D kulturu navedene stanične linije na djelovanje derivata **3, 7, i 8** (slika 15.b).

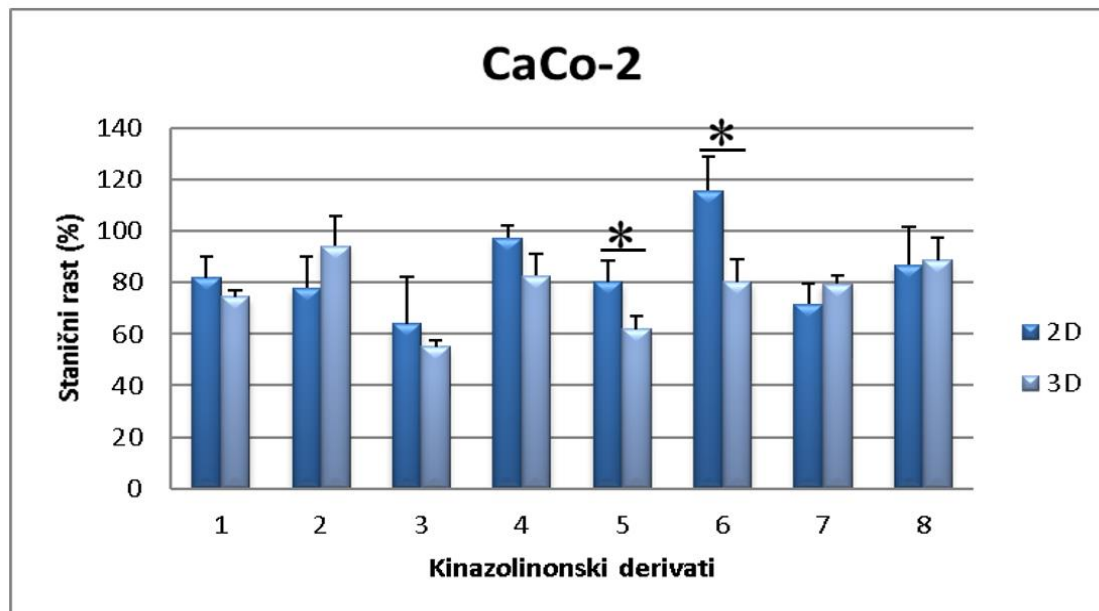
Kod CaCo-2 stanične linije derivat **6** je 36% jače djelovao na 3D u odnosu na 2D kulturu što je statistički značajan rezultat ($p=0,018$). Značajnu razliku pokazao je i derivat **5** ($p=0,032$) sa 18% jačim djelovanjem na 3D kulturu. Derivat **2** djelovao je nešto bolje na 2D kulturu s razlikom od 16% dok su ostali derivati pokazali slične učinke u obje kulture (slika 15.c).



Slika 15.a)



Slika 15. b)



Slika 15.c)

Slika 15.(a-c) Usporedba citotoksičnog učinka derivata kinazolinona na stanice u 2D i 3D kulturi. Ispitivane stanične linije izložene su djelovanju derivata kinazolinona kroz 72 h pri koncentraciji 1×10^{-4} M. Citotoksičnost je određena MTT testom u tri vremenski nezavisna ponavljanja u triplikatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05$ (*) usporedbom 2D i 3D kulture stanica.

5. RASPRAVA

Maligne bolesti epidemija su modernog doba te su značajan javnozdravstveni problem Republike Hrvatske kao drugi najznačajniji uzrok smrti iza bolesti srca i krvnih žila. U Hrvatskoj je u 2015. od raka umrlo 14 012 osoba, pri čemu je stopa mortaliteta 333 /100000 i kao takva među najvišim u Europi (37). Razvoj novih protutumorskih terapija temelji se na ciljanju molekularnih promjena u tumorima bez oštećenja normalnog tkiva. Stabilnost kinazolinonske jezgre, njihova laka dostupnost te jednostavna sinteza strukturalno i funkcionalno različitih derivata utjecali su na njihovu primjenu u protutumorskoj terapiji (38). Znatno je njihov doprinos u liječenju humane leukemije, tumora dojke te debelog crijeva (39). Raznovrsnost njihove protutumorske bioaktivnosti među ostalim uključuje inhibiciju DNK enzima popravka, EGFR tirozin kinaze, timidilat sintaze, te tubulinske polimeraze (40).

Citotoksični učinak novih derivata kinazolinona određen je na četiri adherentne stanične linije koje su tretirane s navedenim spojevima tijekom 72 h u 2D i 3D kulturi (slike 13 i 14). Na temelju rezultata vidljivo je da određeni derivati kinazolinona djeluju značajno inhibicijski na 2D i 3D stanične kulture pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji pri čemu vrsta stanične linije i koncentracija derivata imaju ulogu u njihovoj učinkovitosti. Rezultati analize povezanosti strukture i aktivnosti objavljeni u nedavnim studijama navode kako su pozicije 2, 6 i 8 kinazolinonske jezgre bitne za njihovu aktivnost, te da prisutnost različitih heterocikličkih prstenova na poziciji 3 pridonose boljoj protutumorskoj aktivnosti (2,4). Na osnovi predhodno navedenog može se objasniti, u ovom radu, izmjerena različita citotoksičnost jer različiti supstituenti s različitim elektronskim okruženjem djeluju na lipofilnost, a time i učinkovitost spoja i njegov mehanizam djelovanja (41,42). Palem i suradnici su za derivate kinazolinona s alilfenilnim i kinoksalinskim skupinama uočili citotoksično djelovanje na stanice karcinoma gušterače (MIAPACA), dojke (MDA-MB-231) i cerviksa (HeLa). Uočili su isto tako da promjene funkcionalnih skupina na fenilnom prstenu derivata značajno utječu na citotoksičnost te da je vjerojatan mehanizam djelovanja povezan s njihovim vezanjem na DNK odnosno da djeluju kao DNK interkalirajući spojevi (43).

U istraživanju El Sayeda i suradnika rodaninski derivati kinazolinona sa hidrofobnim, elektron-privlačecim i lipofilnim skupinama (Br, Cl, CF₃) na kinazolinonskom 3- fenilnom prstenu pokazali su se selektivno toksičnim, te proapoptotskim za stanice humane leukemije (HL-60 i K-562) (44). Zayed i suradnici su uvođenjem fluora, koji je poboljšao

bioraspoloživost i apsorpciju mnogih protutumorskih spojeva, sintetizirali fluorirane kinazolinone koji su se pokazali izuzetno aktivnim prema tumorskim stanicama pluća (NCI) i dojke (MCF-7). Pokazalo se da fluor, kao halogen malog radijusa bolje djeluje na vezanje lijeka za receptor od joda, te povećava lipofilnost koja je pokazala povezanost sa povećanjem protutumorskih učinaka (45). Halogeno supstituirani kinazolinoni u ovome radu (1, 2, 5 i 8) pokazali su značajnu inhibicijsku aktivnost na 2D i 3D kulturu HeLa stanica što je u skladu s prethodno navedenim istraživanjima.

HeLa stanična linija također je podvrgnuta djelovanju 2,3 disupstituiranih derivata kinazolinona u istraživanju Khodarahmija i suradnika te je uočen inhibicijski učinak od 50% pri 1×10^{-4} M (46) što je blisko učinku u ovom radu testiranog derivata 3 (44%-tna inhibicija). Oni su također uočili da slaba topljivost derivata kinazolinona u RPMI mediju može negativno utjecati na njihovu aktivnost prema istoj staničnoj liniji (47).

Zanimljivi rezultati dobiveni su usporedbom citotoksičnosti derivata kinazolinona u 2D i 3D kulturi stanica. Tako derivati **4** i **6** citotoksično djelovanje pokazuju samo u 3D, ali ne i u 2D kulturi HeLa stanične linije. Također, statistički značajno bolje djelovanje na 3D kulturu vidi se kod derivata **5** i **6** kod CaCo-2 stanične linije (slika 15). Dobiveni rezultati oprečni su brojnim istraživanjima koji navode veću otpornost stanica u 3D kulturi. Primjer su stanice raka dojke koje pokazuju veću otpornost na tamoksifen u 3D kulturi nego stanice koje rastu u monosloju (48). Slično je pokazano na stanicama tumora jetre i jajnika (32). Povećanje rezistencije u 3D kulturi primarno je rezultat signala iz staničnih interakcija i utjecaja izvanstaničnog prostora. Također, može biti rezultat ograničene difuzije u sferoidu i hipoksije koja dovodi do aktivacije gena za preživljenje (49). No, poneki spojevi mogu biti aktivirani hipoksijom kao tirapazamin ili zahtijevati aktivnu proliferaciju za antiproliferativni učinak, a koja može biti izraženija u 3D kulturi pa ona postaje osjetljivija (26). Istraživanja su pokazala da se razlika očituje i u stupnju genske ekspresije te da u 3D kulturi dolazi do promjene ekspresije gena i proteina uključenih u djelovanje određenih spojeva što utječe na njihovu djelotvornost (49). Slično, izražajnost i prostorna organizacija staničnih receptora kao mjesta djelovanja citotoksičnih spojeva razlikuje se u 2D i 3D kulturi što je slučaj i s receptorom epidermalnog faktora rasta (EGFR) čija razina ekspresije može biti povećana u 3D kulturi stanica (50). Njegova inhibicija pokazana je kao mehanizam protutumorskog djelovanja derivata kinazolinona u radovima Kumara, Ahmeda i Belala i drugih što bi mogao biti jedan od razloga povećane osjetljivosti stanica u 3D kulturi u ovom radu (7,12). .Dodatno, novi

derivati 4(3H)-kinazolinona pokazali su se kao selektivni i moćni inhibitori H1975 stanica kao EGFR mutanata čija mutacija T790M dovodi do rezistencije na gefitinib u polovice pacijenata s karcinomom pluća ne-malih stanica (NSCLC) (51). Pokazano je da stanice raka pluća s tom mutacijom osjetljivost na standardne EGFR inhibitore pokazuju jedino u 3D kulturi te da su jedino ti učinci usporedivi s kliničkim zapažanjima u pacijenata sa rakom pluća.. To ukazuje da bi ispitivanje ranije navedenih 4(3H)-kinazolinona kao potentnih inhibitora EGFR T790M mutanata u 3D kulturi moglo predvidjeti klinički ishod u takvih pacijenata (52). Studije su također pokazale da je stupanj izraženosti poli(ADP-riboza)polimeraze-1 (PARP-1), kao protutumorskog cilja derivata kinazolinona, povećan u određenim tumorima (maligni limfomi, glioblastom, rak kolona i cerviksa) te povezan sa hipoksičnim uvjetima i nekrozom koji se nalaze u sferoidnoj kulturi, ali i kod tumora *in vivo* (53, 54, 55)

Osim načina djelovanja testiranih derivata kinazolinona, objašnjenje njihova djelovanja između 2D i 3D kulture treba tražiti i u strukturi sferoida koja ovisi o staničnoj liniji te u njihovoj stabilnosti jer labilniji sferoidi mogu pokazivati osjetljivost sličnu onoj u 2D kulturi (21,56). Dodatno, razlog slične učinkovitosti testiranih derivata u 2D i 3D kulturi može se pripisati činjenici kako nije bilo ograničenja u prodiranju spoja kroz sferoid kako navode Kim i suradnici (57).

Temeljem rezultata ovog rada, vidljivo je kako su potrebna dodatna istraživanja djelovanja novih derivata kinazolinona na 3D kulturu stanica koja iako uključuje složene mehanizme djelovanja i često otežava interpretaciju rezultata daje bolji uvid u biologiju tumora te bolje predviđa njihovo ponašanje *in vivo* u odgovoru na citotoksične spojeve od 2D kulture stanica.

6. ZAKLJUČAK

- ❖ Vidljiv je citotoksičan učinak testiranih derivata kinazolinona u 2D i 3D kulturama korištenih staničnih linija, gdje je citotoksičnost evidentirana pri koncentraciji od 1×10^{-4} M ispitivanih kemijskih spojeva.
- ❖ Sve stanične linije pokazale su otpornost na testirane derivate pri koncentracijama od 1×10^{-5} M i 1×10^{-6} M u 2D kulturi.
- ❖ Najosjetljivijom staničnom linijom pokazala se HeLa koja je značajno inhibirana svim ispitivanim derivatima, s izuzetkom derivata 4 i 6 u 2D kulturi, a u 3D kulturi svim ispitivanim derivatima.
- ❖ Novosintetizirani derivati kinazolinona izazivaju različite citotoksične učinke na stanice koje rastu u 2D i 3D kulturi.
- ❖ Najveću citotoksičnost postigao je derivat 3 u 3D kulturi svih staničnih linija.
- ❖ Derivati kinazolinona 4 i 6 potencijalni su kandidati za daljna istraživanja s obzirom na njihovo inhibitorno djelovanje na 3D kulturu HeLa i CaCo-2 staničnih linija, a bez pokazane citotoksičnosti prema normalnim MDCK1 stanicama.

7. SAŽETAK

Uvod: Dušikom bogati heterociklički spojevi, kinazolinoni, su ubikvitarne farmakološke jedinice zastupljene u raznim bioaktivnim prirodnim i novosintetiziranim kemijskim spojevima. Stabilnost kinazolinonske jezgre te jednostavna sinteza strukturalno i funkcionalno različitih derivata utjecali su na njihovu važnost kao protutumorskih lijekova.

Ciljevi istraživanja: Odrediti razlikuje li se citotoksični učinak novih derivata kinazolinona na normalnim i tumorskim stanicama u uvjetima 2D i 3D kulture *in vitro*.

Materijali i metode: Citotoksičan učinak novih derivata kinazolinona praćen je na tri adherentne tumorske stanične linije (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358) i jednoj normalnoj staničnoj liniji (MDCK1) u 2D kulturi te na staničnim linijama HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 u 3D kulturi. Stanična vijabilnost određena je MTT testom nakon inkubacije od 72 h.

Rezultati: Novi derivati kinazolinona djelovali su citotoksično pri koncentraciji od 1×10^{-4} M na 2D i 3D kulturu testiranih staničnih linija. Najbolji učinak postigao je derivat 3, a najosjetljivija je bila HeLa stanična linija.

Zaključak: Razlikuje se citotoksični učinak novih derivata kinazolinona u uvjetima 2D i 3D kulture *in vitro*. Inhibicija rasta ovisi o koncentraciji spoja i vrsti stanične linije.

Ključne riječi: kinazolinoni; tehnike kulture stanica; protutumorski lijekovi

8. SUMMARY

Introduction: Nitrogen-rich heterocyclic compounds, quinazolinones, are ubiquitous pharmacological units represented in various bioactive natural and newly synthesized chemical compounds. The stability of the quinazolinone core and simple synthesis of structurally and functionally diverse derivatives have influenced their importance as antineoplastic agents.

Research objectives: The aim was to determine whether there is a difference in the cytotoxic effect of novel quinazolinone derivatives on normal and tumour cell lines under 2D and 3D cell culture conditions *in vitro*.

Materials and methods: The cytotoxic effect of novel quinazolinone derivatives was monitored on three adherent tumor cell lines (HeLa, CaCo-2 and NCI-H358) and one normal cell line (MDCK1) in 2D culture and on HeLa, CaCo-2 and NCI-H358 cell lines in 3D culture. The cell viability was determined by MTT assay after 72 hour incubation.

Results: The novel quinazolinone derivatives acted cytotoxic at a concentration of 1×10^{-4} M on the 2D and 3D cultures of the tested cell lines. The best effect was achieved by the derivative 3, and the most sensitive was the HeLa cell line.

Conclusion: There is a difference in cytotoxic effect of novel quinazolinone derivatives in the 2D and 3D cultures *in vitro*. The inhibition of growth depends on the concentration of the compound and the cell line type.

Keywords: quinazolinones; cell culture techniques; antineoplastic agents

9. LITERATURA

1. Nilesh SK, Jogendra C H , Avinash VP. 3 H-Quinazolin-4-Ones As Anticancer Agents: A Review. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*.2016;6(10).
2. Tiwary BK, Pradhan K, Nanda AK, Chakraborty R. Implication of Quinazoline-4(3H)-ones in Medicinal Chemistry: A Brief Review. *J Chem Biol Ther*.2015; 1: 104.
3. Khan, I, Zaib, S, Batool, S, Abbas, N, Ashraf Z, Saeed A. Quinazolines and quinazolinones as ubiquitous structural fragments in medicinal chemistry: An update on the development of synthetic methods and pharmacological diversification. *Bioorg Med Chem*. 2016.1;24(11):2361-81
4. Mahato AK, Srivastava B, Nithya S. Chemistry structure activity relationship and biological activity of quinazoline- 4(3H)-one derivatives *Inventi Impact: Med Chem*. 2011. 1-6.
5. He D, i sur. Pharmaceutical prospects of naturally occurring quinazolinone and its derivatives. *Fitoterapia*. 2017;119:136-149.
6. Asif M: Chemical characteristics, synthetic methods, and biological potential of quinazoline and quinazolinone derivatives. *Int J Med Chem*. 2014;2014:395637.
7. Kumar D, Mariappan G , Husain A , Monga J , Kumar S. Design, synthesis and cytotoxic evaluation of novel imidazolone fused quinazolinone derivatives. *Arab J Chem*. 2017; 10: 344–350.
8. Kshirsagar UA. Recent developments in the chemistry of quinazolinone alkaloids. *Org Biomol Chem*. 2015 ;13(36):9336-52
9. Brown CE, i sur. Discovery of potent antiviral (HSV-1) quinazolinones and initial structure-activity relationship studies. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017;27(20):4601-4605
10. Cao SL, Feng YP, Jiang YY, Liu SY, Ding GY, Li RT. Synthesis and in vitro antitumor activity of 4(3H)-quinazolinone derivatives with dithiocarbamate side chains. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005 ;15(7):1915-7
11. Orvieto F, i sur. Identification of substituted pyrazolo[1,5-a]quinazolin-5(4H)-one as potent poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19(15):4196-200
12. Ahmed MF, Belal A, Synthesis, characterization, and biological evaluation of new quinazolin-4-one derivatives hybridized with pyridine or pyran moiety. *Res. Chem. Intermed*. 2015;42(2): 659–671
13. Purcell JW, i sur. Activity of the kinesin spindle protein inhibitor ispinesib (SB-715992) in models of breast cancer. *Clin Cancer Res*.2010;16(2):566-76
14. Cell culture basics handbook.2016. Dostupno na adresi <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/life->

- sciences/CellCultureandTransfection/pdfs/Gibco-Cell-Culture-Basics-Handbook-Global.pdf. Datum pristupa 17.8.2018.
15. Freshny RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. New York, 5. izd. Alan R. Liss Inc., 2005.
 16. Phelan K, May KM. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. *Curr Protoc Cell Biol.* 2015;66:1.1.1-22.
 17. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
 18. Duval K, i sur. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)* 2017; 32(4): 266–277.
 19. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough *in Vivo*. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):5517–5527.
 20. Kapałczyńska M, i sur. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* 2018;14(4): 910–919.
 21. 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.
 22. Arbor A. 3D cell culture 101: an introduction to 3D cell culture tools and techniques. *3D Biomatrix.* 2012;1:11.
 23. Breslin S, O’Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today Technol.* 2013;18:240-249.
 24. Przyborski S. 3D cell culture developments in technology to improve *in vitro* analyses. *Drug Discov World.* 2011;67-72.
 25. Bencherif SA, Braschler TM, Renaud P. Advances in the design of macroporous polymer scaffolds for potential applications in dentistry. *J Periodontal Implant Sci.* 2011; 43(6): 251–261.
 26. Hoarau-Véhot J, Rafii A, Touboul C, and Pasquier J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions?. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(1): 181.
 27. Zvezdaryk KJ, Warner JA, Machado HL, Morris CA, Höner zu Bentrup K. Rotating Cell Culture Systems for Human Cell Culture: Human Trophoblast Cells as a Model. *J Vis Exp.* 2012 ;(59):3367.
 28. Huh D, Geraldine A. Hamilton GA, Ingber DE. From three-dimensional cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* 2011;21(12):745-754.
 29. Vrdoljak E, Krajina Z, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D. *Klinička onkologija.* Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
 30. Dubravka Čvorišćec i Ivana Čepelak. Štrausova Medicinska biokemija. 3. izd., Zagreb: Medicinska naklada; 2009.

31. Nguyen HT-L, Nguyen ST, Van Pham P. Concise Review: 3D cell culture systems for anticancer drug screening. *Open Access. Biomed Res Ther.* 2016; 3(5): 625-632
32. Lv D, Hu Z, Lu L, Lu H, Xu X. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncol Lett.* 2017 ; 14(6): 6999–7010.
33. Fang Y, Eglen RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov.* 2017 ;22(5):456-472.
34. 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 Jul 1;148(1):3-15.
35. Nauli, AM, Whittimore, JD. Using Caco-2 Cells to Study Lipid Transport by the Intestine. *J Vis Exp.* 2015;(102):53086.
36. Dukes JD, Whitley P, Chalmers AD. The MDCK variety pack: choosing the right strain *BMC Cell Biol.* 2011;12:43.
37. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015., Bilten 40, Zagreb, 2018.
38. Hameed A, Al-Rashida M, Uroos M, Ali SA, Arshia, Ishtiaq M, Khan KM. Quinazoline and quinazolinone as important medicinal scaffolds: a comparative patent review (2011-2016). *Expert Opin Ther Pat.* 2018 ;28(4):281-297.
39. Zahedifard M, i sur. Synthesis, characterization and apoptotic activity of quinazolinone Schiff base derivatives toward MCF-7 cells via intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Sci Rep.* 2015;5:11544.
40. Jafari E, Khajouei MR, Hassanzadeh F, Hakimelahi GH, Khodarahmi GA. Quinazolinone and quinazoline derivatives: recent structures with potent antimicrobial and cytotoxic activities. *Res Pharm Sci.* 2016;11(1):1-14.
41. Alanazi AM, Abdel-Aziz AA, Al-Suwaidan IA, Abdel-Hamide SG, Shower TZ, El-Azab AS. Design, synthesis and biological evaluation of some novel substituted quinazolines as antitumor agents. *Eur J Med Chem.* 2014;79:446-54.
42. Jose A, Chittethu AB, Sankaran S, Suja ST, Ekambaram KP. Synthesis and characterization of quinazolinone derivatives against mammary carcinoma. *J Pharm Res.* 2013;6(9): 933-938.
43. Palem JD, i sur. Quinazolinones-Phenylquinoxaline hybrids with unsaturation/saturation linkers as novel anti-proliferative agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016;26(13):3014-3018.
44. El-Sayed S, Metwally K, El-Shanawani AA, Abdel-Aziz LM, Pratsinis H, Kletsas D. Synthesis and anticancer activity of novel quinazolinone-based rhodanines. *Chem Cent J.* 2017 ;11(1):102.
45. Zayed MF, Ahmed HEA, Ihmaid S, Omar ASM, Abdelrahim AS. Synthesis and screening of some new fluorinated quinazolinone-sulphonamide hybrids as anticancer agents *J Taibah Univ Sci.* 2015; 10(3): 333-339.

46. Khodarahmi GA, Khajouei MR, Hakimelahi GH, Abedi D, Jafari E, Hassanzadeh F. Antibacterial, antifungal and cytotoxic evaluation of some new 2,3-disubstituted 4(3H)-quinazolinone derivatives. *Res Pharm Sci.* 2012;7(3):151-158.
47. Khodarahmi GA, Shamsiri M, Hassanzadeh F. Synthesis and cytotoxic evaluation of some new 4(3H)-quinazolinones on HeLa cell line. *Res Pharm Sci.* 2012 ; 7(2): 119–125.
48. Dhiman HK, Ray AR, Panda AK. Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. *Biomaterials.* 2005;26:979–986.
49. 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.* 2014;12(4):207-18.
50. Adcock AF, Trivedi G, Edmondson R, Spearman C, Yang L. Three- Dimensional (3D) Cell Cultures in Cell-based Assays for *in-vitro* Evaluation of Anticancer Drugs. *J Anal Bioanal Tech.*2015; 6:247
51. Patel HM, Pawara R, Ansari A, Noolvi M, Surana, S. Design and synthesis of quinazolinones as EGFR inhibitors to overcome EGFR resistance obstacle. *Bioorg Med Chem.*2017; 25(10): 2713–2723.
52. Jacobi N, Seeboeck R, Hofmann E, i sur. Organotypic three-dimensional cancer cell cultures mirror drug responses *in vivo*: lessons learned from the inhibition of EGFR signaling. *Oncotarget.* 2017;8(64):107423-107440.
53. Kurioka D, Takagi A, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Watanabe M. Multicellular Spheroid Culture Models: Applications in prostate Cancer Research and Therapeutics. *J Cancer Sci Ther.*2011; 3(3) 60-65.
54. Wharton SB, McNelis U, Bell HS, Whittle IR. Expression of poly(ADP-ribose) polymerase and distribution of poly(ADP-ribosyl)ation in glioblastoma and in a glioma multicellular tumour spheroid model. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2000;26(6):528-35.
55. Ratnam K, Low JA. Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology. *Clin Cancer Res.* 2007;13(5):1383-8.
56. Imamura Y. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep.* 2015;33(4):1837-43.
57. Kim SH, Choi SJ, Kim YC, Kuh HJ. Anti-tumor activity of noble indirubin derivatives in human solid tumor models in vitro. *Arch Pharm Res.* 2009 ;32(6):915-22.

10. ŽIVOTOPIS

Antonio Periš rođen je 4.veljače 1996.godine. Nakon završenog osnovnog obrazovanja u OŠ Jagode Truhelke, 2011.godine upisuje smjer prirodoslovne gimnazije u Tehničkoj školi i prirodoslovnoj gimnaziji Ruđera Boškovića. Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike upisuje 2015. godine na Medicinskom fakultetu u Osijeku gdje je član udruge CMLDSA u sklopu koje sudjeluje u raznim aktivnostima. Dobitnik je Rektorove nagrade i STEM stipendije za akademsku godinu 2017./2018.