

Utjecaj novosintetiziranih derivata 6,7-dihidroksikumarina na rast stanica leukemija i limfoma in vitro

Matić, Matea

Master's thesis / Diplomski 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:152:576015>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Matea Matić

**UTJECAJ NOVOSINTETIZIRANIH
DERIVATA
6,7-DIHIDROKSIKUMARINA NA RAST
STANICA LEUKEMIJA I LIMFOMA *IN*
*VITRO***

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Matea Matić

**UTJECAJ NOVOSINTETIZIRANIH
DERIVATA
6,7-DIHIDROKSIKUMARINA NA RAST
STANICA LEUKEMIJA I LIMFOMA *IN*
*VITRO***

Diplomski rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za kulturu tkiva pri Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Osijek.

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

Rad ima 47 listova, 1 tablicu i 16 slika.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Kumarin	1
1.1.1. Podjela kumarina.....	2
1.1.2. Biološka aktivnost derivata kumarina	4
1.1.3. Antikancerogena aktivnost	5
1.2. Leukemije	6
1.2.1. Koštana srž	7
1.2.2. Krvne stanice- podjela.....	7
1.2.3. Podjela leukemija	7
1.3. Limfomi	8
1.3.1. Podjela limfoma	9
1.4. Stanični ciklus.....	10
1.4.1. Faze staničnog ciklusa.....	11
1.4.2. Kontrolne točke staničnog ciklusa	11
1.4.3. Regulacija staničnog ciklusa	12
1.5. Apoptoza.....	12
1.5.1. Značajke apoptoze.....	12
1.6. Nekroza.....	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.1.1. Ispitivani spojevi	17
3.1.2. Kemikalije	18
3.1.3. Stanične linije.....	18
3.2. METODE.....	19
3.2.1. Kultivacija stanica <i>in vitro</i>	19
3.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi	19
3.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom.....	21
3.2.4. Određivanje staničnog ciklusa protočnim citometrom.....	22

3.2.5. Detekcija apoptoze protočnim citometrom	23
3.2.6. Statistička obrada podataka	24
4. REZULTATI	25
4.1. Određivanje citotoksičnog učinka derivata 6,7-dihidroksikumarina MTT testom.....	25
4.2. Utjecaj derivata 6,7-dihidroksikumarina na stanični ciklus	31
4.3. Utjecaj derivata 6,7-dihidroksikumarina na apoptozu stanica.....	35
5. RASPRAVA.....	38
6. ZAKLJUČAK	41
7. SAŽETAK.....	42
8. SUMMARY	43
9. LITERATURA.....	44
10. ŽIVOTOPIS	47

POPIS KRATICA

ALL akutna limfoblastična leukemija

AML akutna mijelocitna leukemija

Bcl-2 (eng. *B-cell lymphoma 2*) apoptotski regulatorni protein

CDK (eng. *cyclin-dependent kinase*) kinaze ovisne o ciklinima

CHOP ciklofosamid adriamicin® (doksorubicin), onkovin® (vinkristin) prednison

DD (eng. *Death Domain*) domena smrti

DISC (eng. *Death inducing signaling complex*) kompleks koji inducira smrt

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

DMSO dimetil sulfoksid

DNA (eng. *deoxyribonucleic acid*) deoksiribonukleinska kiselina

FADD (eng. *Fas-Associated-Death-Domain-Protein*) smrta domena adapterskog proteina

FAB francusko-američko-britanska (klasifikacija)

FBS (eng. *fetal bovine serum*) fetalni goveđi serum

HEPES 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina

KML kronična mijeloidna leukemija

M mol/dm³

MOMP (eng. *Mitochondrial outer membrane permeabilization*) permeabilizacija membrane mitohondrija

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

NK (eng. *natural killer*)

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

PI propidij jodid

PS (eng. *phosphatidylserine*) fosfatidil-serin

RNA (eng. *ribonucleic acid*) ribonukleinska kiselina

RPMI (eng. *Roswell Park Memorial Institute medium*) medij za uzgoj humanih staničnih linija

TNF (eng. *Tumor Necrosis Factor*) faktor tumorske nekroze

TNFR (eng. *Tumor Necrosis Factor Receptor*) receptor za faktor tumorske nekroze

WHO (eng. *World Health Organisation*) Svjetska zdravstvena organizacija

1. UVOD

Rak je skupina bolesti koje se očituju nekontroliranim rastom i širenjem abnormalnih stanica. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (*eng.* World Health Organization, WHO) jedna od osobina raka jest brzo stvaranje abnormalnih stanica koje rastu izvan svojih uobičajenih granica sa sposobnošću širenja u susjedne dijelove tijela i druge organe.

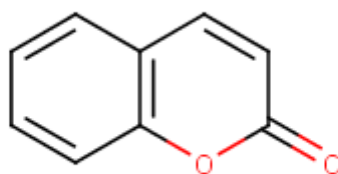
Maligni tumori čine vodeći uzrok smrtnosti svjetske populacije najviše zbog svojih ozbiljnih zdravstvenih posljedica. Smatra se da je 8,2 milijuna smrtnih slučajeva povezano s malignim oboljenjima, što je 13 % svih smrtnih slučajeva u svijetu u jednoj godini. Zbog visoke učestalosti i rizika za javno zdravstvo činjenica je da se sve više zdravstvenih istraživanja provodi upravo na tu temu. Također, poznato je da su maligne promjene uzrokovane različitim vanjskim, ali i unutarnjim čimbenicima (1).

Istraživanja provedena proteklih desetljeća pokazala su da se pacijenti s malignim oboljenjem mogu izliječiti pomoću novih ciljanih terapija uzimajući u obzir individualnu molekularnu karakterizaciju tumora (1). Upravo kumarini predstavljaju zanimljivu biološku skupinu molekula s zabilježenom antikancerogenom aktivnošću (2). Kumarin i 7-hidroksikumarin inhibiraju proliferaciju mnogih humanih staničnih linija *in vitro*, a pokazuju i aktivnost protiv nekoliko životinjskih tumora (3). Derivati kumarina ne koriste se samo u liječenju tumora već i za ublažavanje nuspojava uzrokovanih radioterapijom (4).

1.1. Kumarin

Kumarin (2H-1-benzopiran-2-on) je identificiran 1820-ih kao kisikov heterociklički spoj karakteristična mirisa po vaniliji ili svježje pokošene trave (5). Prvi put izoliran je iz biljke *Coumarouna odorata* Aube (lat. *Dipetryx odorata*) po kojoj je i dobio naziv. Kumarine u prirodi nalazimo kao slobodne ili u obliku heterozida u mnogim biljkama. Kumarinski prsten sadrži 6 C atoma na koje se može vršiti supstitucija što omogućava širok spektar prirodnih ili sintetičkih derivata (slika 1) (3). Zbog posjedovanja velikog broja elektrona u svojoj strukturi imaju vrlo dobra svojstva prijenosa naboja. Zahvaljujući svojoj jednostavnosti i rasprostranjenosti zanimljivi su za širok spektar primjena. Stoga ih možemo pronaći u parfemima, kozmetici i industrijskim aditivima, a neki se derivati koriste i kao pojačivači

aroma u duhanima i nekim alkoholnim pićima. No, ipak je njegova biološka i farmakološka primjena od najvećeg značaja (6). Kumarini i njihovi derivati pokazuju mnoštvo bioloških aktivnosti poput protuupalnih, antikoagulacijskih, antigljivičnih, antivirusnih, antihipertenzivnih, te mnogih drugih. Najvažnija su, ipak, antikancerogena i antioksidativna svojstva(7). Također, neki kumarini mogu uzrokovati promjene u regulaciji imunološkog odgovora, rastu stanica i diferencijaciji (8). Kumarini pokazuju dobra optička svojstva zbog kojih se koriste u laserskim bojama, nelinearnim optičkim kromoforima, fluorescentnim izbjeljivačima, kao fluorescentne boje, u polimerima, te za solarne kolektore (9).

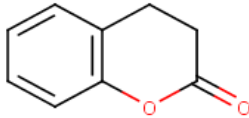
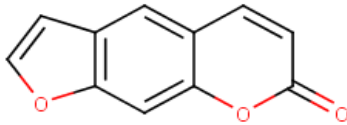
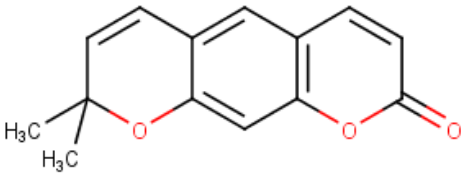
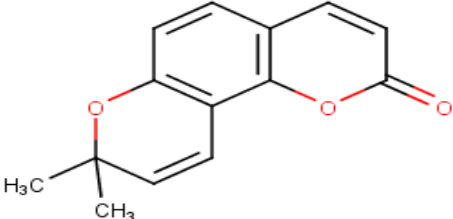
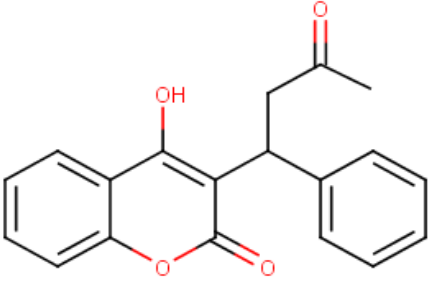


Slika 1. Prikaz kemijske strukture kumarina.

1.1.1. Podjela kumarina

Strukturalna raznolikost obitelji podijelila je kumarine u nekoliko kategorija – od jednostavnih do složenijih, policikličkih kumarina (furokumarina i piranokumarina) (tablica 1.)(10). Svaka od nabrojanih skupina koristi se u izradi brojnih lijekova.

Tablica 1. Strukturna podjela derivata kumarina (preuzeto i prilagođeno iz reference [10]).

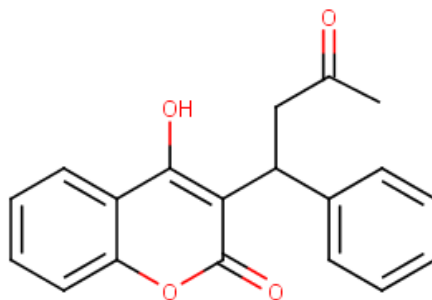
VRSTA KUMARINA	OPĆA STRUKTURA
Jednostavni kumarini	
Furanokumarini	
Piranokumarini	<p data-bbox="1034 853 1177 887">a) Linerani</p>  <p data-bbox="1050 1155 1161 1189">b) Kutni</p> 
Pirano-suspstituirani kumarini	<p data-bbox="1034 1532 1134 1565">Varfarin</p> 

1.1.2. Biološka aktivnost derivata kumarina

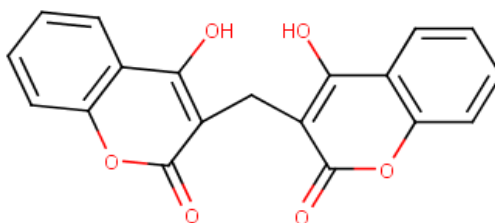
Kao što je već navedeno kumarini i njihovi derivati izuzetno su zanimljivi upravo zbog svoga farmakološkog djelovanja. Neke vrste tih djelovanja jesu antibakterijsko, protuupalno, antikoagulacijsko, antitumorsko, te anti-HIV djelovanje. Najčešća uporaba kumarina u klinici jest kao antikoagulansa u terapiji reumatoidnog artritisa. Kumarini su česta tema istraživanja zbog toga što različito djeluju na određene bolesti, te imaju manje štetan učinak za normalne stanice. Upravo zbog njihova fiziološkog, antioksidativnog, antitumorskog ali i svih ostalih svojstava, kumarini se svrstavaju u novu klasu spojeva terapijske primjene (2).

U koagulaciji, odnosno zgrušavanju krvi, vitamin K igra veliku ulogu. Po svojoj strukturi varfarin je dosta sličan strukturi vitamina K, te kao njegov antagonist ima antikoagulacijska svojstva. Varfarin se kao antikoagulans koristi već dugi niz godina, iako je u prvotnoj namjeni služio kao otrov za štakore. Način djelovanja varfarina kao antikoagulansa je takav da u jetri inhibira stvaranje faktora koagulacije (II, VII, IX, X) koji su ovisni o vitaminu K (2). Varfarin (slika 2.a) i dikumarol (slika 2.b) su antagonisti vitamina K koji izazivaju antikoagulacijski učinak.

Zasad su neki kumarini odobreni i za kliničku upotrebu. Eskulin je derivat kumarina koji se koristi u medicini, kao komponenta lijeka Proctosedyla, za tretiranje hemeroida i rektalnih lezija. Novobiocin i klorobiocin antibiotici su prirodnog porijekla na bazi kumarina, koji se ubrajaju u hidroksilirane kumarine te pokazuju široki spektar aktivnosti prema Gram-pozitivnim bakterijama. Kumarin prolazi kroz razna istraživanja vezana za liječenje limfoedema, raka dojke, karcinoma pluća i bubrega (8).



a) varfarin



b) dikumarol

Slika 2. Derivati kumarina sa antikoagulacijskim svojstvima.**1.1.3. Antikancerogena aktivnost**

Maligne bolesti su postale najveća opasnost za ljudsko zdravlje. Stoga je velik broj istraživanja usmjeren k traženju lijeka za te bolesti. Kumarini su izuzetno popularni u raznim istraživanjima upravo zbog svojih antikancerogenih svojstava (2). I razna istraživanja potvrdila su da u većini biljnih ekstrakata koji su se u prošlosti koristili u medicinske svrhe možemo pronaći visoke koncentracije kumarina. Kumarin i 7-hidroksikumarin pokazali su se kao dobri inhibitori proliferacije velike većine humanih staničnih linija *in vitro*. Pored takvih inhibitorynih svojstava, pokazuju i aktivnost protiv nekoliko životinjskih tumora. Sama kemijska struktura ima velik utjecaj na biološku aktivnost. Hidroksikumarini su tipični fenolni spojevi i imaju sposobnost vezanja metala i drugih iona te posjeduju snažne antioksidante koji

razgrađuju lanac. Kumarini pokazuju izuzetan niz biokemijskih i farmakoloških djelovanja, od kojih neki sugeriraju da neki članovi ove skupine spojeva mogu značajno utjecati na funkciju različitih staničnih sustava sisavaca. Studije su pokazale da kod kumarina citotoksičnu aktivnost pokazuju derivati koji sadržavaju orto-hidroksi supstituente. Dodatak kateholne skupine na osnovnu strukturu uzrokuje povećanu citotoksičnu aktivnost na stanice tumora, što su pokazale i brojne studije. Kumarinski derivat (RKS262) može inhibirati proliferaciju stanica raka jajnika. Ovaj spoj svoju je antikancerogenost pokazao smanjenjem mitohondrijske transmembranske depolarizacije, regulirajući mitohondrijski put Bcl-2 obitelji proteina povećavajući ekspresiju proapoptotičkih faktora Bid, Bad i Bax te smanjujući ekspresiju Bcl-xl i Mcl-1. Nedavne studije pokazale su kako Tr1 i Tr2 derivati kumarina mogu stupiti u interakciju sa G-kvadripleksom (struktura DNA) i stabilizirati je. Ovo zanimljivo otkriće pokazalo je novu metodu koja bi se mogla primjenjivati u liječenja raka (2). Kumarin i njegovi metaboliti pokazuju antitumorsku aktivnost na nekoliko linija stanica tumora kod ljudi (11). Osim u liječenju raka, kumarini, također, svoju ulogu pronalaze i u tretmanima ublažavanja nuspojava izazvanih radioterapijom (12). Istraživanja su pokazala da bi i u liječenju karcinoma bubrega, te kao dodatna kemijska terapija za melanom, kumarini mogli naći primjenu (13).

1.2. Leukemije

Leukemije su maligne bolesti krvotvornih organa, karakterizirane nekontroliranom proliferacijom, poremećajem u sazrijevanju i oslobađanjem malignih stanica. Akutne leukemije su obično brzo progresivne leukemije u kojima dolazi do zamjene normalne koštane srži zloćudnim stanicama koje nastaju malignom transformacijom matičnih stanica krvi. Glavna karakteristika kronične mijeloidne leukemije (KML) je nekontrolirano umnožavanje matičnih stanica u koštanoj srži, prelaženje i zadržavanje u krvi velikog broja mlađih i zrelijih stanica. Razvoj KML završava blastičnom krizom, tj. prelaskom u akutni oblik (14).

1.2.1. Koštana srž

Koštana srž spužvasto je tkivo koje ispunjava koštane šupljine, a glavna joj je uloga proizvodnja krvnih stanica koje se u krvotok ispuštaju kada sazriju te kada ih tijelo zatreba. Postoje 3 vrste krvnih stanica: crvena krvna zrnca (eritrociti), bijela krvna zrnca (leukociti) i krvne pločice (trombociti). Eritrociti sadrže hemoglobin za prenošenje kisika iz pluća u sve dijelove tijela. Leukociti se bore protiv infekcija u tijelu i uslijed nedovoljnog broja povećava se učestalost i jačina infekcija koje mogu biti opasne po život. Trombociti pomažu zgrušavanje krvi i sprječavaju krvarenje (14).

1.2.2. Krvne stanice- podjela

Svekrvne stanice potiču iz iste matične, tj. progenitorske stanice, no u svom ranom razvoju te stanice se podijele u dvije glavne loze: mijeloidnu lozu (eritrociti, trombociti i bijela krvna zrnca granulociti koje čine neutrofili, bazofili i eozinofili, te monociti)) i limfoidnu lozu (limfociti) (14).

Mijeloidna krvna zrnca bore se protiv infekcija, odnosno protiv infektivnih organizama i neposredna su obrana ljudskog tijela, dok limfoidnim stanicama treba duže vremena da počnu djelovati ali su specifičnije u svojoj borbi protiv organizama koji napadaju. Imaju sposobnost pamćenja organizma protiv kojeg se bore tako da su idućeg puta brže u svom djelovanju. Limfoidne stanice se nalaze, kako u limfnom tkivu, i u svim dijelovima tijela, a putuju u prozirnoj tekućini pod nazivom limfa (15).

1.2.3. Podjela leukemija

Leukemije se dijele na četiri oblika:

1. Akutna limfoblastična leukemija (ALL)
2. Kronična limfocitna leukemija (KML)
3. Akutna mijeloidna leukemija (AML)
4. Kronična mijeloidna leukemija (KML)

Akutna limfoblastična leukemija (ALL) najčešća je zloćudna bolest dječje dobi. Karakterizira ju nakupljanje i bujanje zloćudno promijenjenih limfocita, bijelih krvnih stanica, u koštanoj srži, perifernoj krvi, te u završnoj fazi nakupljanje limfocita u svim tkivima organizma. Akutno znači da je agresivno-progresivan tijek bolesti te da je rano otkrivanje od velike važnosti, a limfoblastična znači da se radi o bolesti krvnih stanica limfoidne loze koje promijenjene i nedozrele (blasti) dopijevaju u perifernu krv. Zbog nekontroliranog dijeljenja stanica dolazi do njihova nepotrebnog nakupljanja u perifernim organima (limfni čvorovi, slezena, jetra) i nekrvotvornim organima (koža, središnji živčani sustav, srce, pluća itd.). Citomorfološka podjela predložena od francusko-američko-britanskih autora, poznatija kao FAB klasifikacija, ALL dijeli u tri podtipa: L1, L2, L3 (prema izgledu stanica; morfološka podjela) (15).

Kronična mijeloidna leukemija (KML) vrsta je leukemije kod koje stanice izgledaju zrelo, ali su po svojoj funkciji nedjelotvorne. Ovakva vrsta leukemije ima tri stadija. Prvi stadij je sporo umnažanje promijenjenih stanica, kronična faza. Drugi stadij, koji se odlikuje postupnim povećanjem broja nezrelih stanica u punktatu koštane srži, naziva se akcelerirana faza i predstavlja prelazak bolesti prema akutnoj leukemiji. Nakon ove faze bolest prelazi u blastnu krizu koja je ujedno i finalna faza razvoja bolesti i ne razlikuje se od akutne mijeloidne leukemije (15).

1.3. Limfomi

Limfomi su maligne bolesti koje nastaju zloćudnom preobrazbom stanica limfatičkog sustava. Oni su definirani kao skupina tumora koji se razvijaju od limfocita i smatraju se "solidnim tumorima" imunskog sustava. Limfatički sustav sastoji se od međusobno povezanih limfnih vodova, limfnih čvorova i organa: koštana srž, timus, slezena i krajnici. Cijeli je limfatički sustav ispunjen prozirnom tekućinom pod nazivom limfa koja sadrži limfocite – stanice koje služe u borbi protiv infekcija. Ukoliko ove stanice razviju abnormalnosti dolazi do njihovog nakupljanja u limfnim čvorovima te domoćeg formiranja tumora. Podjela limfoma je vjerojatno najkompliciraniji dio hematopatologije. Temelji se na morfologiji, imunološkim i genetskim značajkama tumorskih stanica, te kliničkoj slici. Ovi tumori proizlaze iz stanica imunološkog sustava u različitim fazama razvoja, što uzrokuje raznoliku paletu morfologije i kliničkih nalaza. Postoje tri tipa limfocita: NK (eng. natural

killer cells, NK), T stanice koje pomažu B stanicama u proizvodnji protutijela, a također identificiraju i ubijaju strane stanice izravno, i B stanice specijalizirane da prepoznaju oznake na površini stranih stanica koje se nazivaju antigeni (15).

1.3.1. Podjela limfoma

Postoji više različitih tipova limfoma koji se generalno mogu podijeliti u dvije osnovne skupine: Hodgkinov limfom i neHodgkinovi limfom (15).

1.3.1.1. Hodgkinov limfom

Hodgkinov limfom agresivni je limfom koji nastaje iz B-limfocita i pogađa sve dobne skupine ljudi iako mu je najveća učestalost u mlađih odraslih. Bolest je karakterizirana tumorskim stanicama tipičnog izgleda nazvanim Reed-Sternbergovim stanicama s dvije velike jezgre i izraženim nukleolusom. Uzrok je nepoznat, no veliku ulogu igraju okolišni čimbenici, a sam rizik povećava se uz neke oblike imunosupresije, imunodeficijencije, te uz neke autoimune bolesti (15).

1.3.1.2. NeHodgkinov limfom

Postoji više od 30 podtipova neHodgkinovog limfoma koji se dijele u 2 glavne skupine i to prema brzini tumorskog rasta: indolentni limfomi i agresivni limfomi. Indolentni limfomi mogu rasti godinama pritom ne stvarajući smetnje bolesniku. Ovakva vrsta limfoma dobro odgovara na liječenje no često ulaze u relaps, odnosno ponovno se vraćaju. Agresivne limfome treba brzo liječiti jer se tumorske stanice brzo dijele i rastu u organizmu (15).

Neke vrste limfoma iz neHodgkin grupe:

- T limfomi su većinom agresivni i imaju lošu prognozu. Njihovo liječenje je većinom CHOPom(ciklofosamid adriamicin® (doksorubicin), onkovin® (vinkristin) prednison) ili još agresivnije, a nerijetko i autotransplantacijom. No, unatoč svemu rezultati su i dalje loše, te je tako petogodišnje preživljavanje oko 30 % (15).
- Burkittov limfom je rijetka, ali vrlo agresivna vrsta limfoma koja se obično javlja u djece i mlađih osoba. Često se na početku terapije zna javiti sindrom lize (raspadanja) stanica. Taj poremećaj nastaje uslijed jako povećane razgradnje tumorskih stanica. Takav sindrom može dovesti do akutnog zatajenja bubrega i drugih teških metaboličkih komplikacija (15).

1.4. Stanični ciklus

Diobeni ciklus temeljni je životni proces u kojem se događa, ne samo nastajanje zrelog odraslog organizma, nego također služi i za obnavljanje stanica, tkiva i organa (16).

Sve se stanice razmnožavaju tako da se podijele na dvije, a od svake roditeljske stanice nastanu dvije stanice kćeri na kraju svakog staničnog ciklusa. Novonastale stanice kćeri dalje same nastavljaju rasti i dijeliti se te na taj način omogućuju nastajanje velikog broja stanica. Iako je stanični ciklus obično poznat kao neprekidan proces, DNA se sintetizira tijekom jedne faze staničnog ciklusa (17).

Kada promatramo stanični ciklus u kulturi stanica i uz pomoć mikroskopa on upućuje na dvije osnovne faze: mitozu i interfazu. Mitoza je faza diobe stanične jezgre, odnosno faza u kojoj dolazi do odvajanja sestrinskih kromatida i kromosoma u stanice kćeri, te koja završava citokinezom, ukupnom diobom jezgre. Mitoza u sebi sadrži četiri faze: profazu, metafazu, anafazu i telofazu. Interfaza je razdoblje staničnog rasta koja obuhvaća 95 % vremena staničnog ciklusa. U njoj dolazi do rasta stanice i akumulacije hranjivih tvari kako bi se stanica mogla dalje dijeliti, a DNA replicirati, a sve u svrhu pripreme stanice za sljedeću diobu (17).

1.4.1. Faze staničnog ciklusa

Stanični ciklus eukariotskih organizama podijeljen je u četiri faze: M (mitoza), G1 faza, S i G2-faza. M faza ciklusa obuhvaća dva glavna događaja: podjela jezgre (kariokineza) i podjela citoplazme (citokineza). Nakon M faze slijedi G1 faza koja je interval između mitoze i početka replikacije DNA, odnosno tijekom koje je stanica metabolički aktivna i neprekidno raste no bez replikacije DNA. Stanice u ovoj fazi rastu do njihove optimalne veličine. S faza nastupa nakon G1 faze i u njoj se događa sama replikacija DNA. Nakon završetka sinteze DNA započinje G2 faza u kojoj se nastavlja stanični rast i sinteza proteina u svrhu pripreme za mitozu(17,18).U slučaju nepovoljnih izvanstaničnih uvjeta stanica ulazi u G0 fazu gdje može ostati danima, tjednima pa čak i godinama. Ova faza nije nužno trajna i stanice se mogu vratiti u ciklus ukoliko naiđu na povoljne uvjete putem specifičnih podražaja (19).

Trajanje faza staničnog ciklusa za tipičnu ljudsku stanicu koja se razmnožava kroz 24 sata traje različito. G1-faza traje oko 11 sati, S-faza oko 8 sati, G2-faza oko 4 sata i M-faza oko 1 sat (17).

1.4.2. Kontrolne točke staničnog ciklusa

U staničnom ciklusu postoje određene kontrolne točke koje osiguravaju da samo kompletni genomi prelaze u stanice-kćeri. Kontrolne točke u G1, S i G2 fazi staničnog ciklusa služe za otkrivanje nereplicirane ili oštećene DNA. Startna točka je na kraju G1 faze i služi kako bi se provjerili svi uvjeti potrebni za dalje repliciranje materijala. Nakon nje dolazi se do kontrole u S-fazi gdje se provjerava kvaliteta ispravno replicirane DNA, provjerava se DNA i na kraju signalizira bilo kakvo oštećenje DNA kako se ono ne bi prenijelo na stanice kćeri. Na kraju G2 faze kontrolna točka služi za kontrolu uspješnosti repliciranog genoma i prisutnost mitogenih čimbenika i uspješnost popravka oštećenja DNA. Dioba se dalje može nastaviti samo kada je genom potpuno repliciran ili oštećenje DNA popravljeno. Ako kromosomi kćeri na diobenom vretenu nisu pravilno poredani dolazi do zaustavljanja mitoze u M fazi, također putem kontrolne točke. Razdvajanje kromosoma započet će tek kada su svi kromosomi pravilno smješteni u ekvatorijalnu ravninu diobenog vretena (17).

1.4.3. Regulacija staničnog ciklusa

U staničnom ciklusu veliku ulogu imaju grupa proteina pod nazivom ciklini, kinaze ovisne o ciklinima (CDK; eng. cyclin dependent kinase) i inhibitori kinaza ovisnih o ciklinima. Oni stimuliraju daljnje napredovanje kroz stanični ciklus ukoliko su uvjeti normalni. Svaka faza staničnog ciklusa regulirana je ciklinima i CDK proteinima (20). Ravnoteža između aktivacije i inaktivacije CDK određuje hoće li stanice proći kroz G1 u S fazu, a od G2 do M, kroz regulacijske mehanizme koji se odvijaju u složenijim eukariotima. CDK se inaktivira prilikom ulaska stanice u sljedeću fazu ciklusa na način da uništava cikline. Kada ciklin postane dostupan u citoplazmi tada se i CDK aktivira. Sve do tada CDK ostaje neaktivan. Prije nego stanica ponovi ciklus, ciklin mora proći kroz transkripciju i translaciju (21). Kada mitozu dođe do svoga kraja, formira se diobenno vreteno te se kromosomi pravilno vežu za njegove niti osiguravajući tako stanicama kćeri pravilnu raspodjelu kromosomskog seta. Kromosomi se neće odvojiti sve dok setovi kromosoma nisu pravilno vezani za niti diobenog vretena (22).

1.5. Apoptoza

Poseban oblik stanične smrti (apoptoza) ima veliku važnost za organizam i održavanje stanične homeostaze, odnosno održavanja ravnoteže prilikom gubitka i stvaranja stanica normalnog tkiva tijekom života. Apoptoza se još naziva i „programirana smrt stanice“, morfološki se razlikuje od nekroze i nastavlja se sve do smrti. Ukoliko dođe do nekog patološkog oštećenja stanice, gdje one postaju opasne i nekorisne za organizam, stanice same pokreću apoptozu (23).

1.5.1. Značajke apoptoze

Ovisno o tipu stanice i njenom razvojnem stupnju ovisi i pokretanje te brzina apoptotskog procesa. Apoptoza nastaje ili zbog slabljenja, odnosno izostanka pozitivnih signala potrebnih za preživljavanje stanica ili zbog primanja negativnih signala. Kako ne bi došlo do pokretanja procesa apoptoze, tj. programirane stanične smrti, potrebna je

kontinuirana signalizacija čimbenicima rasta, hormonima, citokinima, te međudnos dvije susjedne stanice te stanice i matriksa (24).

Ukoliko premalo stanica doživi svoju programiranu smrt, odnosno podlegne apoptozi, u organizmu može doći do malignih bolesti, limfoproliferativnih bolesti, pojave autoimunih bolesti, učestalosti virusnih infekcija, te otpornosti prema kemoterapiji. S druge strane ako ipak prevelik broj stanica podlegne apoptozi dolazi do deficijencije imuniteta, te degenerativnih stanja (25).

Stanice u apoptozi obično podliježu nizu morfoloških promjena kao na primjer:

1. kondenzacija kromatina i stvaranje mjehurića na membranama
2. kidanje molekule DNA na dijelove veličine nukleosoma
3. razlaganje citoskeleta i formiranje apoptotičnih tjelešaca

Makrofagi i susjedne stanice odmah prepoznaju i fagocitiraju takve stanice i stanične fragmente, te se stanice koje dođu u stanje apoptoze učinkovito uklanjaju iz tkiva, bez upalnog procesa. Tijekom procesa apoptoze fosfatidilserin (PS; eng. phosphatidilserine) se premješta na staničnu površinu te biva prepoznat od strane specifičnih receptora izraženih na fagocitima (17,24).

Kod sisavaca postoje dva glavna puta programirane stanične smrti, unutarnji i vanjski, no oba na kraju rezultiraju aktivacijom izvršnih kaspaza. Vanjskim putem nazvana je apoptoza koja je pokrenuta putem „receptora smrti“, dok unutarnji put ovisi o općem metaboličkom stanju stanice te signalima prenošenim kroz mitohondrije. Iako su aktivacije ovih putova međusobno različita, ipak postoji povezanost, te oba puta na kraju izazivaju karakteristične biokemijske i strukturne promjene stanice tipične za apoptozu (26).

Vanjski put apoptoze započinje vezanjem liganda na receptore smrti. Takvi receptori spadaju u obitelj receptora za faktor tumorske nekroze (TNFR), a jedna od glavnih karakteristika im je posjedovanje citoplazmatske domene smrti (DD, eng. death domain). U njih se ubrajaju receptor za Fas (CD95, Apo1), receptori za ligand koji inducira apoptozu povezan s TNF (TRAIL-R1 i TRAIL-R2, engl. TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1 i 2) i receptor za sam faktor tumorske nekroze (TNFR-1). Fas ligand veže se na receptore smrti na kojem se nalazi adaptivni protein koji uključuje smrtnu domenu (FADD; eng. Fas-Associated-Death-Domain-Protein). Kada se ligand veže na pripadajući receptor smrti dolazi do vezanja inicijatorske prokaspaze 8 i proteina te se stvara signalni kompleks

koji inducira smrt (DISC, eng. death inducing signaling complex). Nakon završetka svih procesa prokaspaza 8 se cijepa te prelazi u aktivni oblik. Tim činom pokreće kaskadu izvršnih kaspaza uz razgradnju stanice putem apoptoze (26).

Unutarnji put apoptoze aktivira se oštećenjem DNA, nedostatkom hormona rasta, kemoterapijama ili virusnim infekcijama. Središnju ulogu u unutarnjem putu apoptoze ima Bcl-2 obitelj proteina koji kontroliraju i reguliraju apoptotičke mitohondrijske događaje zatvaranjem ili otvaranjem pora za propusnost na membrani (26). Ključni događaj je oslobađanje intermembranskih proteina, a do kojeg dolazi uslijed povećanja permeabilnosti mitohondrijske membrane (MOMP-a, eng. Mitochondrial outer membrane permeabilization). U Bcl-2 skupini poznato je petnaest proteina koji se dijele na: proapoptotičke proteine (Bad, Bax, Bak, Bag, Bid, Bik, Hrk) koji potiču MOMP i apoptozu te antiapoptotičke proteine (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-1, A1) koji inhibiraju oslobađanje citokroma c iz mitohondrija. U regulaciji apoptoze jedan od čimbenika je i p53- tumor supresorski gen. Jedna od njegovih značajki je pokretanje apoptoze na način da naruši odnos proapoptotičnih i antiapoptotičnih mitohondrijskih proteina Bcl-2 obitelji. Također, učinkovit način je i induciranje gena koji povećavaju produkciju reaktivnih spojeva kisika. Takvi reaktivni spojevi su snažni aktivatori oštećenja mitohondrija i apoptoze. Gen p53 svoju će aktivnost povećati ukoliko dođe do oštećenja DNA prilikom čega će mu glavni cilj biti započeti nakupljanje u stanicama. Na taj način će se stanični ciklus zaustaviti u G1 fazi te započeti popravljavanje oštećenja DNA. Ako je oštećenje preveliko da bi se popravilo dolazi do pokretanja apoptoze (24).

1.6. Nekroza

Nekroza stanice posljedica je znatnijeg oštećenja stanice izazvanog različitim fizikalno-kemijskim agensima (hipoksija, ekstremne temperature, djelovanje komplementa itd.). Kada se stanica jako ošteti, gubi mogućnost kontrole ravnoteže tekućine i iona (natrij i kalij ulaze nekontrolirano u stanicu), ona nabubri, a stanične organele izgube cjelovitost. Prilikom raspadanja stanice dolazi do istjecanja staničnog sadržaja i do nadraživanja okolnog tkiva jer se raspadom oslobađaju biomedijatori upale (24). Nekroza i apoptoza različiti su procesi. Razlikuju se prije svega u mehanizmima svoga djelovanja te u morfologiji. Nekroza

je pasivni proces koji ne zahtjeva energiju i napreduje paralelno s gubitkom mitohondrijske funkcije, dok je za apoptozu karakteristična aktivacija kaspaza koja ovisi o ATP-u (adenozin trifosfat) i zahtjeva mitohondrijsku funkciju (28). Novije studije pokazale su da nekroza, također, može biti inhibirana kaspazama dok se pojavljuje kroz regulirani mehanizam. Takva vrsta nekroze naziva se programirana ili regulirana nekroza, a posredovana je apoptotičkim receptorima smrti i protein kinazama 1 i 3 (29).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

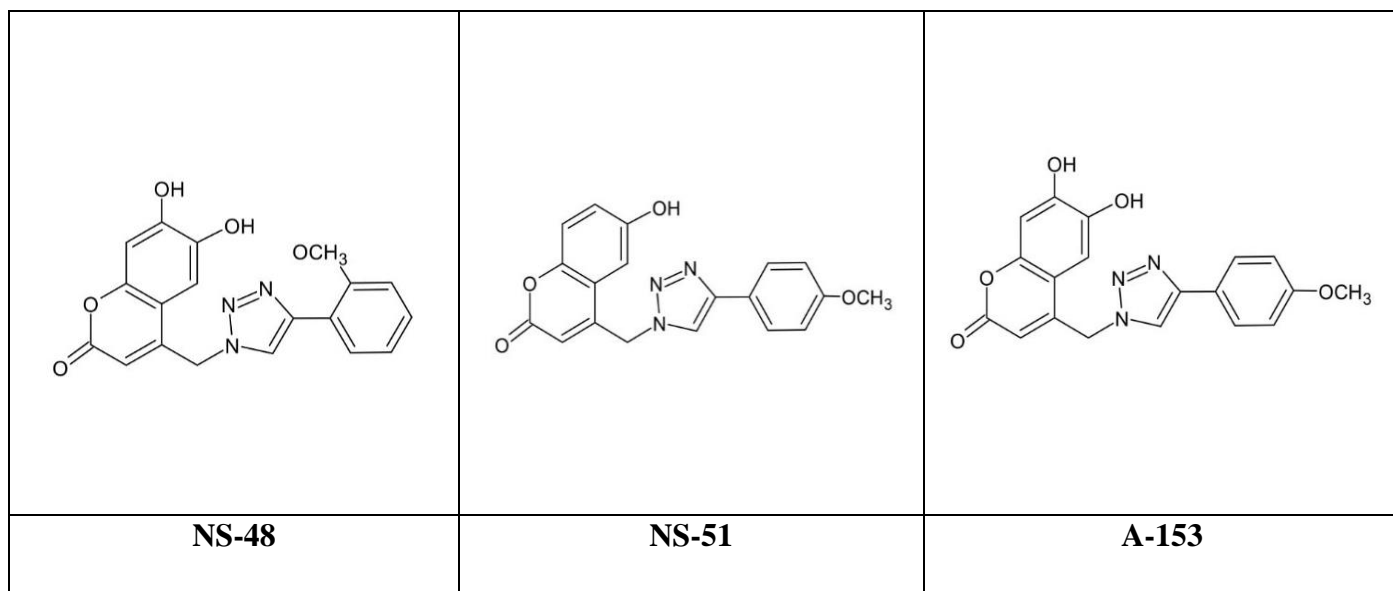
1. Ispitati utjecaj derivata 6,7-dihidroksikumarina na rast normalnih stanica i stanica limfoma i leukemija *in vitro*.
2. Ustanoviti povezanost između strukture i koncentracije novih spojeva i inhibicije rasta.
3. Definirati supstanciju koja ima najveću učinkovitost na rast tumorskih stanica, a da istovremeno ne djeluje inhibitorno na rast normalnih stanica.
4. Odrediti promjene u staničnom ciklusu i način umiranja tretiranih stanica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Ispitivani spojevi

Testni spojevi derivata 6,7-dihidroksikumarina sintetizirani su na Zavodu za organsku kemiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (slika 3). Derivati 6,7-dihidroksikumarina otopljeni su u DMSO-u (dimetilsulfoksid) kao koncentrirane otopine koncentracije 1×10^{-2} mol/l (M). Razrjeđenja derivata pripremljena su neposredno prije tretmana na stanice u mediju za uzgoj stanica.



Slika 3. Strukturne formule derivata 6,7-dihidroksikumarina

3.1.2. Kemikalije

- DMEM, s visokim udjelom glukoze (4.5 g/L) s L-glutaminom, kompletiran s 10% FBS, Capricorn Scientific GmbH (Slough, Velika Britanija)
- DMSO, dimetilsulfoksid 99,8%, Acros organics (New Jersey, SAD)
- RNase A, 50mg, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Njemačka)
- Propidij jodid, eBioscience (Massachusetts, SAD)
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) BioChemica, AppliChem (Darmstadt, Njemačka)
- Tripin plavilo 0.4%, 0.8 % NaCl, sterilno filtriran, Lonza (Basel, Švicarska)
- Tripsin/EDTA, tripsin 0.25%, 1Mm EDTA-Na₄ u HBSS, s phenolred, Panbiotech GmbH (Aidenbach, Njemačka)
- RPMI-1640 obogaćen dodatkom 10 %-tnog FBS-a, GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), 2 mM otopinom L-glutamina, GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), 1 mM natrijevog piruvata, GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija) te 10 mM HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina) pufera Sigma-Aldrich (St.Louis, SAD)
- Kit za određivanje apoptoze (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, eBioscience™)

3.1.3. Stanične linije

Biološki učinak derivata 6,7-dihidroksikumarina ispitan je na humanim staničnim linijama i jednoj normalnoj psećoj stanici:

1. Normalne stanice:
 - MDCK (ATCC® CCL-34™) - epitelne stanice bubrega psa
2. Humane stanične linije leukemija i limfoma:
 - K562 (ATCC® CCL-243™) – limfoblasti kronične mijeloične leukemije
 - CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™) - akutna limfoblastična leukemija
 - Raji (ATCC® CCL-86™)- Burkittov limfom
 - HuT 78 (ATCC® TIB-161™) - limfom T-stanica

3.2. METODE

3.2.1. Kultivacija stanica *in vitro*

Rad sa staničnim kulturama odvija se u sterilnim uvjetima u kabinetu s laminarnim protokom zraka. Prije početka samog rada potrebno je isključiti UV lampu te sa 70 % -tnim etanolom očistiti sve površine. Potom se u kabinet unosi sav potreban pribor za rad. Bitno je da sve što se unese bude sterilno. Nakon same organizacije radnog prostora pali se protok zraka i počinje se s radom.

Testne stanične linije uzgajanesu u CO₂inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s kontroliranom atmosferom uz 5 % CO₂ i temperaturu od 37 °C u bočicama za uzgoj stanica površine 25 cm² i 75 cm².

Leukemijske stanice (K562 i CCFR-CEM) i limfoidne stanice (Raji i HuT78) uzgajane su u RPMI mediju koji sadrži optimalne udjele aminokiselina i vitamina za rast stanica. Obogaćen je dodatkom 10 %-tnog FBS-a, 2 mM otopinom L-glutamina, 1 mM natrijevog piruvata te 10 mM HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina) pufera.

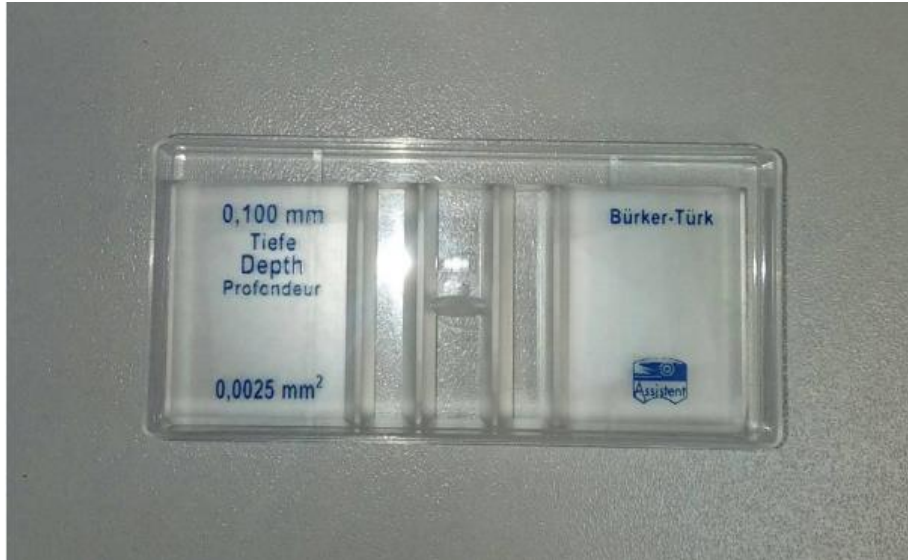
Adherentna normalna stanična linija (MDCK1) kultivirana je u DMEM mediju obogaćenim 10% temperaturno inaktiviranog FBS-a, 2 mM L-glutamina i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomycin antibiotika. Subkultivacija postignuta je enzimatskim odvajanjem stanica od podloge uz prethodno ispiranje PBS-om. Odvajanje stanica od površine postignuto je dodavanjem tripsina i inkubacijom u CO₂ inkubatoru. Odvojene stanice od podloge prikupljene su svježim medijem te prebačene u nove bočice za uzgoj stanica.

3.2.2. Određivanje broja živih stanica u kulturi

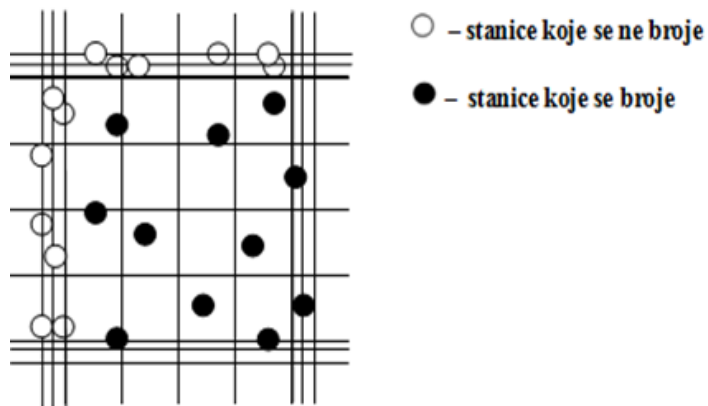
Određivanje broja stanica provedeno je bojanjem prethodno resuspendirane stanične suspenzije tripan plavilom. Sam postupak započinje uzimanjem 50 μL stanične suspenzije te miješanjem s 100 μL 0,4 %-tne otopine tripanskog plavila u jažici. Potom slijedi nanošenje ispod pokrovnog stakalca Bürker-Türk komorice (slika 4 a). Stanice obojane tripanskim plavilom predstavljaju mrtve stanice koje se ne broje, dok žive stanice koje aktivno izbacuju boju. Broj živih stanica određen je pod invertnim mikroskopom (Zeiss, Axiovert 25, Njemačka) (slika 4 b). Potom se izračunao broj stanica u 1 ml prema sljedećoj formuli:

$$N/4 \times 3 = X \times 10^4 \text{ stanica/mL}$$

Oznaka N u ovom slučaju označava broj stanica izbrojanih u sva četiri kvadranta, 4 je broj polja u komorici dok je 3 faktor razrjeđenja.



a) Bürker-Türk komorica

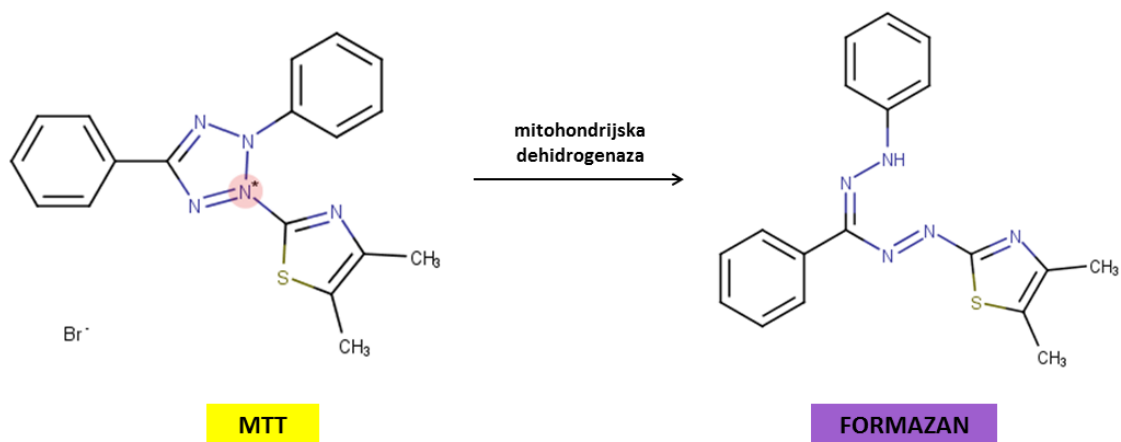


b) mikroskopski prikaz komorice

Slika 4. (a) Prikaz Bürker-Türk i (b) mikroskopski prikaz komorice

3.2.3. Određivanje citotoksičnosti MTT testom

MTT test je kolorimetrijska metoda kojom se mjeri aktivnost grupe enzima dehidrogenaza u živim stanicama. U živim stanicama dolazi do pretvorbe žutog MTT-a (3-(4,5-dimetiltiazol-2), 5-difenil tetrazol bromid) u crveno-ljubičasti produkt formazan koji se nakuplja u stanicama (slika 5). Intenzitet obojenja proporcionalan je broju živih stanica. Intenzitet se određuje spektrofotometrijski korištenjem automatskog čitača mikropločica (iMark, BIO RAD, Hercules CA, USA).



Slika5. Prikaz principa MTT metode.

Postupak: MDCK1 stanice nasađene su na mikrotitarske pločice s 96 jažica u koncentraciji od 2×10^4 st/ml. Ploča sa stanicama ostavljena je u CO₂ inkubatoru preko noći kako bi se stanice prihvatile za podlogu. MDCK1 stanice tretirane su 6,7-dihidroksikumarinskimderivatima u koncentraciji od 1×10^{-4} M i 1×10^{-5} M u vremenskom period od 72h. Po isteku vremena inkubacije sa stanica je uklonjen medij i na stanice je dodan MTT u koncentraciji od 5 mg/ml. Nakon 4h inkubacije stanice s MTT, formazanskikristalići otopljeni su dodatkom DMSO-a u trešnju na tresilici (OS-10 Orbital Shaker, Biosan, Latvija). Rezultati su potom očitani na mikročitaču pločica pri valnoj duljini od 595 nm.

Stanice u suspenziji (K562, CCRF-CEM, Raji i HuT78) nasađene su na pločice s 96 jažica u koncentraciji od 1×10^5 st/ml u volumenu od 100 μ l (90 μ l stanične suspenzije + 10 μ l testnog spoja). Stanice su isti dan tretirane s 6,7-dihidroksikumarinskim derivatima (NS-48, NS-51 i A-153) u koncentraciji od 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M i 1×10^{-6} M. Potom su mikrotitarske pločice s tretiranim stanicama pohranjene u inkubator (37 °C, 5 % CO₂) na 72 h. Po završetku vremena inkubacije na stanice je dodan MTT u koncentraciji od 5 mg/ml, te su ploče vraćene u inkubator kroz slijedeća 4 h. Formirani kristalići otopljeni su dodatkom 10 % -tnog SDS-a u 0,01 M HCl-u preko noći u inkubatoru. Rezultati su očitani na čitaču mikroploča pri valnoj duljini od 595 nm.

Na temelju očitanih rezultat apsorbancije, kontrola i pozadine (eng. *background*) određen je postotak preživljavanja pomoću formule:

$$\text{preživljenje [\%]} = \frac{A_{\text{tretman}} - A_{\text{background}}}{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{background}}} \times 100$$

$$\text{pozadina}_{\text{adherentne stanice}} = \text{medij} + \text{MTT} + \text{DMSO}$$

$$\text{pozadina}_{\text{stanice u suspenziji}} = \text{medij} + \text{MTT} + \text{SDS u HCl} - u$$

3.2.4. Određivanje staničnog ciklusa protočnim citometrom

Promjene u staničnom ciklusu određuju se protočnom citometrijom bojanjem stanice fluouescetnom propidij jodid (PI) bojom. Sama metoda zasnovana je na sposobnosti vezanja PI na molekulu DNA. Stanice je moguće podijeliti u faze staničnog ciklusa (G0/G1, S, ili G2/M) pomoću određivanja količine DNA u stanicama. Dijeljenje stanica u faze moguće je pomoću programa koji je ugrađen u protočni citometar a koji pretvara emitirane svjetlosne

signale u histogram. U histogramu su prikazani intenziteti fluorescencije koji odgovaraju određenim fazama ciklusa (G0/G1, S i G2/M fazi) i broj stanica. Intenzitet fluorescencije izravno je proporcionalan količini DNA u stanici i na taj način omogućeno je razlikovanje faza staničnog ciklusa.

Postupak: K562 i Raji stanice nasađene su u koncentracijama od 5×10^5 st/mL u ukupnom volumenu od 3mL po jažici uz kontrole na ploče sa šest jažica s ravnim dnom. Kako su se u radu koristile suspenzijske stanične linije, odmah nakon nasađivanja stanice su tretirane testnim spojevima finalne koncentracije 5×10^{-6} M i inkubirane kroz 24 h u CO₂ inkubatoru. Završetkom inkubacije uzgojene stanice sa medijem su prebačene u epruvete, isprane sa 1ml PBS-a i stavljene na centrifugu kako bi se spustile na dno. Nakon što je centrifugiranje završilo supernatant je dekantiranjem uklonjen sa stanica. Stanice su potom resuspendirane u PBS-u i fiksirane sa 3 mL 70%-tnog hladnog etanola kako bi se omogućilo PI da uđe u stanicu, a sve uz polagano stalno miješanje. Do analize stanice su čuvane na -20 °C. Na dan analize stanice su centrifugirane 6 min na 1000 rpm na Jouan BR4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD uređaju. Nakon centrifugiranja stanice su isprane s 1 mL PBS-a te ponovno centrifugirane. Na tako sedimentirane stanice dodano je 350µL PBS-a a stanice su prebačene u epruvete namijenjene za protočni citometar. U svaku epruvetu zatim je dodano 30 µL 10mg/mL RNAze. Potom su epruvete ostavljene 5 min kako bi RNAza djelovala. Prije same analize dodano je 150µL PI te su epruvete ostavljene nekoliko minuta u mraku a potom analizirane na protočnom citometru (BD FACSCanto, BD Biosciences, Češka).

3.2.5. Detekcija apoptoze protočnim citometrom

Odmah nakon pokretanja apoptoze stanice translociraju fosfatidil-serin (PS) s unutarnje strane plazma membrane na površinu stanice. Jednom kada PS dospije na površinu stanice može se lako detektirati bojenjem fluorescentnim konjugatom Annexin V, proteinom koji ima visoki afinitet za PS. Annexin V je protein iz skupine aneksina koji specifično veže PS. Bojanje Annexinom V vrlo je specifična metoda pogodna posebice u početnoj fazi apoptoze kada je očuvana cjelovitost stanične membrane (27).

Postupak: K562 i Raji stanice nasađene su u koncentracijama od 5×10^5 st/mL u ukupnom volumenu od 3mL po jažici, te su inkubirane kroz 24 h u CO₂ inkubatoru. Narednog dana

stanice su tretirane derivatima NS-48, NS-51 i A-153 i inkubacija se nastavila sljedeća 24 sata. Završetkom inkubacije stanice su s medijem prebačene u epruvete, isprane dva puta sa 1ml PBS-a. Nakon toga prebačene su u Eppendorf epruvete volumena 1,5 mL nakon čega su centrifugirane. Po završetku centrifugiranja uklonjen je supernatant, a stanice su resuspendirane u PBS-u. Načinjeno je nekoliko negativnih kontrola: a) neobjana kontrola, b) kontrola s Annexinom, c) kontrola sa PI i d) kontrola s Annexinom i PI zajedno. Nakon što su stanice resuspendirane u puferu za vezivanje dodano je 5 μ L Annexin, te su stanice promješane i inkubirane 10 min na sobnoj temperaturi. Stanice su isprane u puferu, te je topina prebačena u epruvete za mjerenje na protočnom citometru. Prije same analize dodano je 10 μ L PI te su epruvete ostavljene nekoliko minuta u mraku a potom analizirane na protočnom citometru (BD FACSCanto, BD Biosciences, Češka). Rezultati su analizirani programom FlowJo 7.2.5. (Trestar, SAD).

3.2.6. Statistička obrada podataka

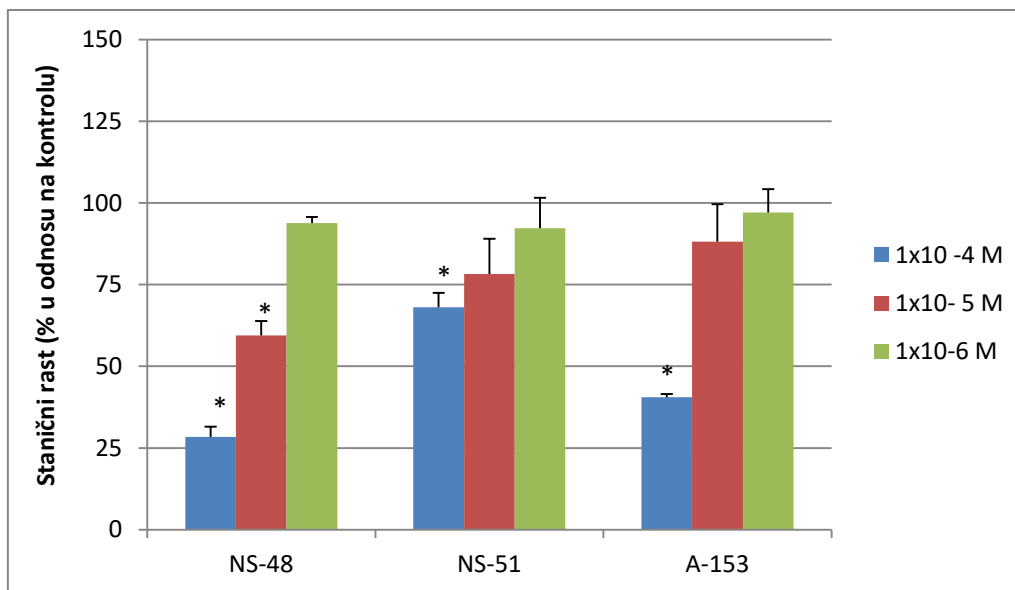
Biološki eksperimenti citotoksičnosti obavila se u triplikatu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost (\bar{X}) i standardna devijacija (\pm SD) za tri neovisna mjerenja. Normalnost raspodjele podataka dobivenih testovima citotoksičnosti odredila se Kolmogorov-Smirnov testom. Primjenio se neparametrijski test Mann-Whitney uz statističku značajnost $p < 0.05$. Statistička analiza podataka obavljena je pomoću statističkog programa STATISTICA 11.0 za Windows operativne sustave. Podatci dobiveni protočnom citometrijom prikazani su kao postotak populacije i koeficijent varijacija (CV) pomoću statističke funkcije za analizu podataka i obrade rezultata s protočne citometrije u FlowJo programu.

4. REZULTATI

4.1. Određivanje citotoksičnog učinka derivata 6,7-dihidroksikumarina MTT testom

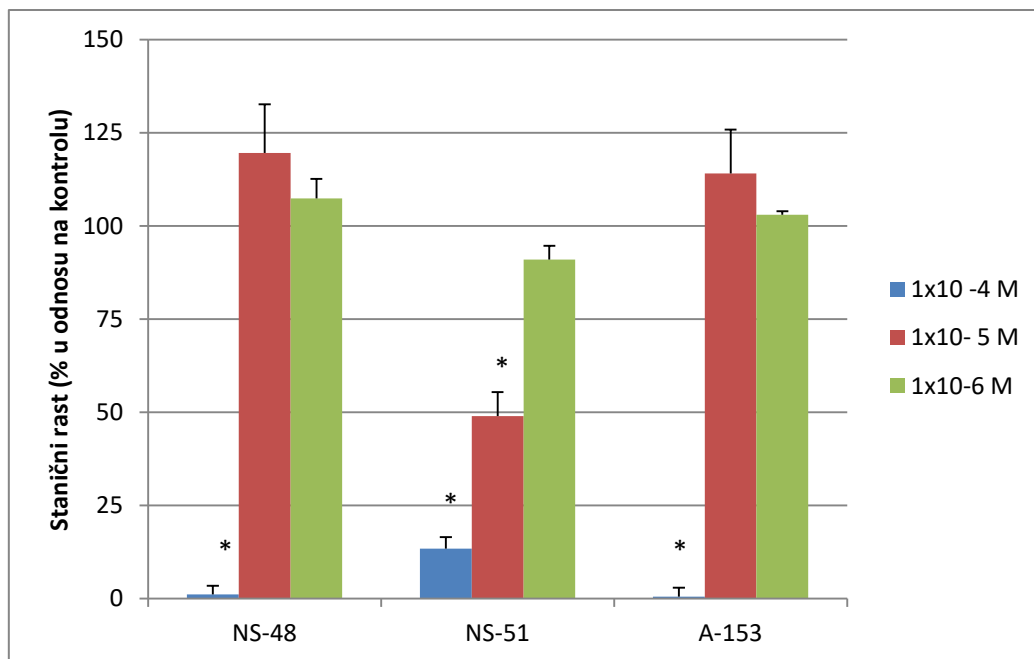
Utjecaj novosintetiziranih derivata 6,7-dihidroksikumarina ispitan je na humanim staničnim linijama, od čega su dvije leukemijske (K562 i CCFR-CEM) i dvije stanice limfoma (Raji i HuT-78) te na normalnoj staničnoj liniji (MDCK). Stanice su tretirane NS-48, NS-51 i A-153 derivatima u koncentracijama 1×10^{-4} , 1×10^{-5} i 1×10^{-6} M. Rezultati prikazuju postotak staničnog rasta navedenih staničnih linija u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

Djelovanje NS-48 derivata na rast CCFR-CEM stanice značajno je inhibirano za 71,6% pri koncentraciji od 1×10^{-4} M, sa vidljivom inhibicijom od 40,6 % i pri nižoj koncentraciji od 1×10^{-5} M. Derivat NS-51 ima najslabiji učinak na inhibiciju staničnog rasta od 30% koja je ostvarena pri najvišoj koncentraciji od 1×10^{-4} M. Inhibicijski rast od 59,4% ostvaren je djelovanjem A-153 derivata pri koncentraciji od 1×10^{-4} M, dok pri ostalim testnim koncentracijama A-153 derivat nije značajno djelovao. Svi testirani derivati kumarina nisu pokazali zamjetno djelovanje pri koncentraciji od 1×10^{-6} M gdje je stanični rast CCFR-CEM stanica viši od 95% (slika 6).



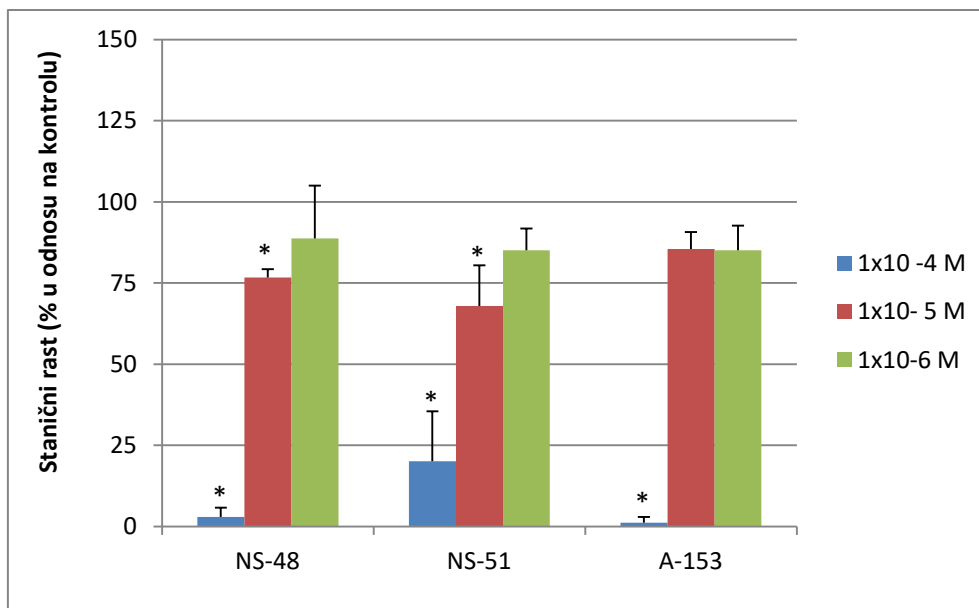
Slika 6. Citotoksični učinak 6,7-dihidroksikumarinskih derivata NS-48, NS-51 i A-153 na staničnu liniju CCRF-CEM. Stanice su izložene djelovanju derivata kroz 72 sata pri koncentracijama od 1×10^{-4} , 1×10^{-5} i 1×10^{-6} M. Citotoksičan učinak određen je MTT testom u triplicatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05$ (*) u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

Derivat NS-48 na rast K562 stanica djeluje izrazito inhibicijski sa svega 1,1 % preživljenja stanica pri koncentraciji od 1×10^{-4} M, dok pri ostalim koncentracijama nije pokazao inhibicijsko djelovanje. Derivat NS-51 ima značajan učinak na inhibiciju staničnog rasta od 86,6% koja je ostvarena pri najvišoj koncentraciji od 1×10^{-4} M. Najbolji inhibicijski učinak pokazuje derivat A-153, sa gotovo 100% inhibicije pri koncentraciji od 1×10^{-4} M. Međutim, derivat A-153 pri ostalim testnim koncentracijama nije djelovao inhibicijski. Svi testirani derivati kumarina nisu pokazali zamjetno djelovanje pri koncentraciji od 1×10^{-6} M pri čemu je preživljenje stanica više od 90% (slika 7).



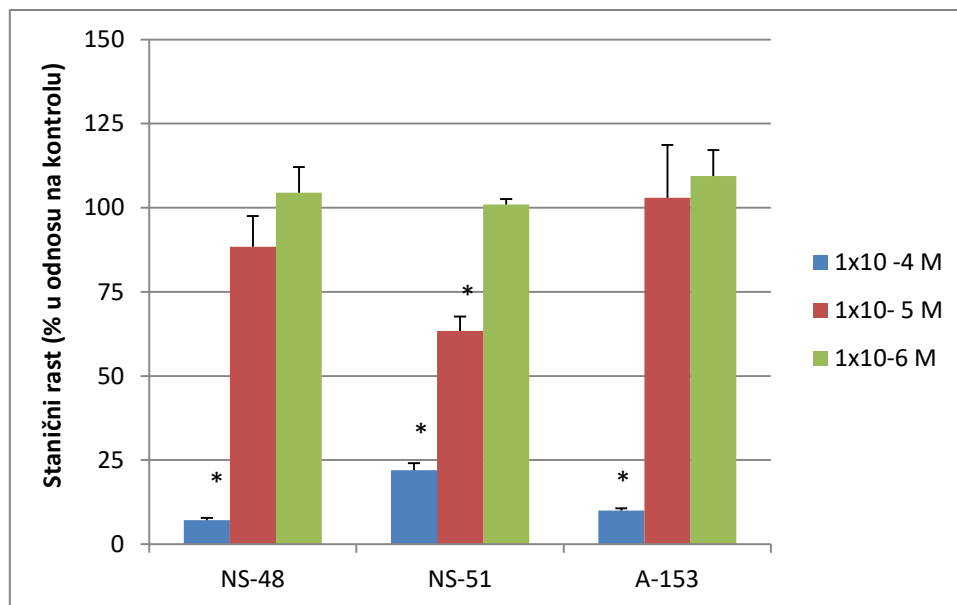
Slika 7. Citotoksični učinak 6,7-dihidroksikumarinskih derivata NS-48, NS-51 i A-153 na staničnu liniju K562. Stanice su izložene djelovanju derivata kroz 72 sata pri koncentracijama od 1×10^{-4} , 1×10^{-5} i 1×10^{-6} M. Citotoksičan učinak određen je MTT testom u triplicatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05$ (*) u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

Djelovanje NS-48 derivata na rast HuT 78 stanice značajno inhibirano za 97,1% pri koncentraciji od 1×10^{-4} M, sa vidljivom inhibicijom od 23,2 % i pri nižoj koncentraciji od 1×10^{-5} M. Derivat NS-51 inhibira stanični rast za 79,9% koji je ostvaren pri najvišoj koncentraciji od 1×10^{-4} M, dok pri nižoj koncentraciji pokazuje inhibiciju od svega 30%. Najviše se ističe djelovanje derivata A-153 s inhibicijom stanica od 98,9% pri koncentraciji od 1×10^{-4} M, dok pri ostalim testnim koncentracijama A-153 derivat nije značajno djelovao. Svi testirani derivati kumarina pokazali su slabo inhibicijsko djelovanje pri koncentraciji od 1×10^{-6} M gdje je inhibicija rasta HuT 78 stanica bila svega 10-15% (slika 8).



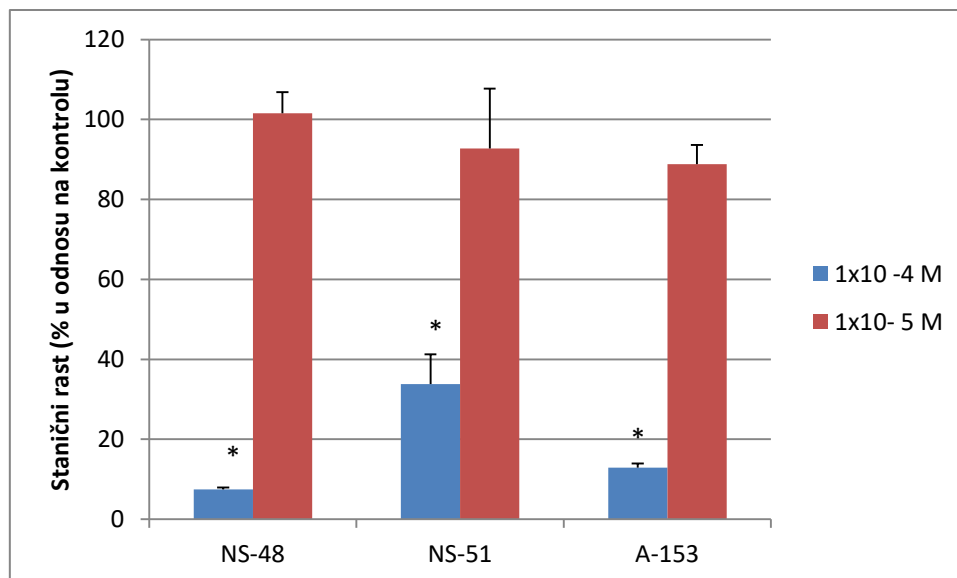
Slika 8. Citotoksični učinak 6,7-dihidroksikumarinskih derivata NS-48, NS-51 i A-153 na staničnu liniju HuT 78. Stanice su izložene djelovanju derivata kroz 72 sata pri koncentracijama od 1×10^{-4} , 1×10^{-5} i 1×10^{-6} M. Citotoksičan učinak određen je MTT testom u triplikatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05$ (*) u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

Kod Raji stanične linije, svi spojevi u koncentraciji 1×10^{-4} M značajno inhibiraju stanice. Najviše se ističe derivat NS-48 koji pokazuje inhibiciju od 92,9%, dok pri nižoj koncentraciji od 1×10^{-5} M pokazuje slabu inhibiciju od svega 11,6%. Značajniji inhibicijski učinak, više od 78% pokazuje derivat NS-51 pri koncentraciji od 1×10^{-4} M. Pri istoj koncentraciji ističe se derivat A-153 koji je ostvario inhibiciju od 90% te pri ostalim testnim koncentracijama nije pokazao inhibicijski učinak. Pri koncentraciji od 1×10^{-6} M navedeni derivati kumarina nisu pokazali zamjetno inhibijsko djelovanje (slika 9).



Slika 9. Citotoksični učinak 6,7-dihidroksikumarinskih derivata NS-48, NS-51 i A-153 na staničnu liniju Raji. Stanice su izložene djelovanju derivata kroz 72 sata pri koncentracijama od 1×10^{-4} , 1×10^{-5} i 1×10^{-6} M. Citotoksičan učinak određen je MTT testom u triplikatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05$ (*) u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

Kod stanične linije MDCK1, svi spojevi u koncentraciji od 1×10^{-4} M značajno inhibiraju stanice. Najviše se ističe derivat NS-48 koji pokazuje inhibiciju od 92,6%, dok pri nižoj koncentraciji od 1×10^{-5} M uopće ne inhibira stanice. Značajniji inhibicijski učinak, više od 66% pokazuje derivat NS-51 pri koncentraciji od 1×10^{-4} M. Pri istoj koncentraciji ističe se derivat A-153 koji je ostvario inhibiciju od 87,1% , dok je pri nižoj koncentraciji od 1×10^{-5} M pokazao blagi inhibicijski učinak od svega 11,2% (slika 10).



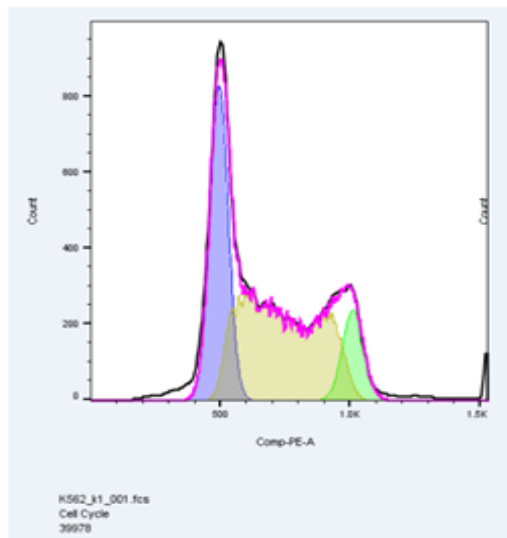
Slika 10. Citotoksični učinak 6,7-dihidroksikumarinskih derivata NS-48, NS-51 i A-153 na staničnu liniju MDCK-1. Stanice su izložene djelovanju derivata kroz 72 sata pri koncentracijama od 1×10^{-4} , 1×10^{-5} i 1×10^{-6} M. Citotoksičan učinak određen je MTT testom u triplikatu. Statistički značajna p vrijednost definirana je $p < 0,05$ (*) u odnosu na kontrolne netretirane stanice.

4.2. Utjecaj derivata 6,7-dihidroksikumarina na stanični ciklus

Utjecaj derivata 6,7-dihidroksikumarina (NS-48, NS-51 i A-153) ispitan je na staničnim linijama K562 i Raji. Stanice su bile izložene derivatima NS-48, NS-51 i A-153 u koncentraciji od $5 \times 10^{-6} \text{M}$. Analizirane stanice bojane su PI bojom koja se veže za DNA i pritom fluorescira, gdje je onda intenzitet fluorescencije proporcionalan količini DNA. Histogrami prikazuju udio K562 i Raji stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Rezultati ispitivanja učinka derivata na stanični ciklus K562 stanične linije prikazani su na slici 11 i 12, a rezultati stanične linije Raji na slici 13 i 14.

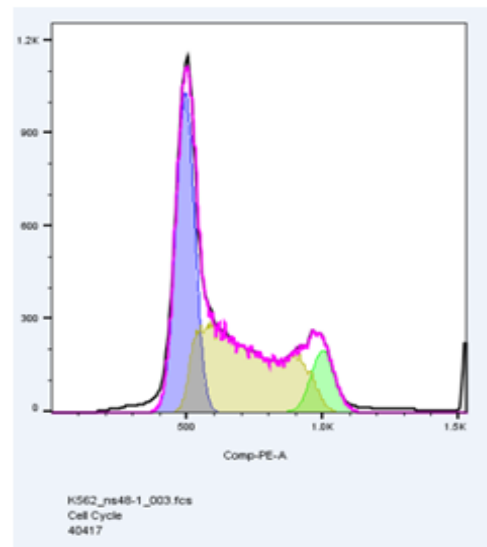
Analizom staničnog ciklusa pomoću modela Watson, FlowJo programskog paketa, K562 kontrolne stanice najvećim su udjelom u S fazi s 49,9% stanica. Izloženost K562 stanica derivatu A-153 uzrokovao je smanjenje broja stanica u G2/M fazi (9,01%) u odnosu na kontrolne stanice, s porastom broja stanica u G1 (35,7%) i S(51,2%) fazi staničnog ciklusa. Derivat NS-51 uzrokuje blago smanjenje broja stanica u S i G2/M fazama staničnog ciklusa, te porast u G1 fazi staničnog ciklusa. Izloženost stanica derivatu NS-48 dovodi do povećanja broja stanica u G1 fazi te do smanjenja broja stanica u fazama G2/M i S u kojoj je broj stanica smanjen za više od 5% u odnosu na netretirane stanice. Zajedničko svim derivatima u djelovanju na staničnu liniju K562 je uzrokovanje blagog porasta broja stanica u G1 fazi staničnog ciklusa.

K562 (kontrola)



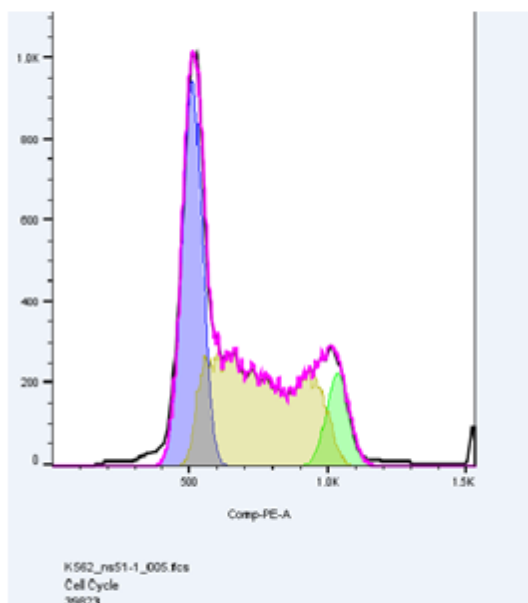
a)

K562 (NS-48)



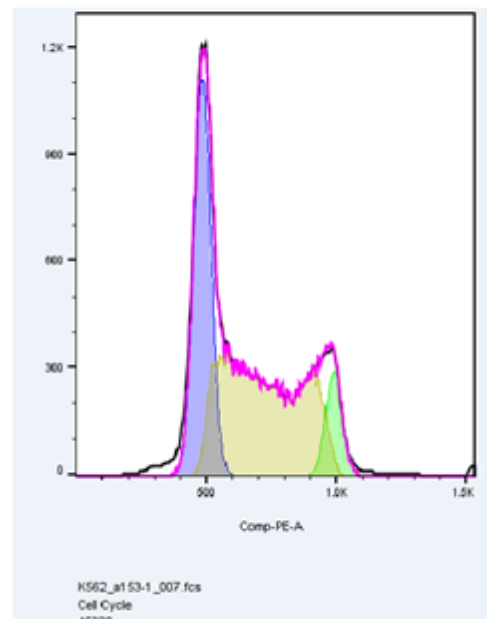
b)

K562 (NS-51)



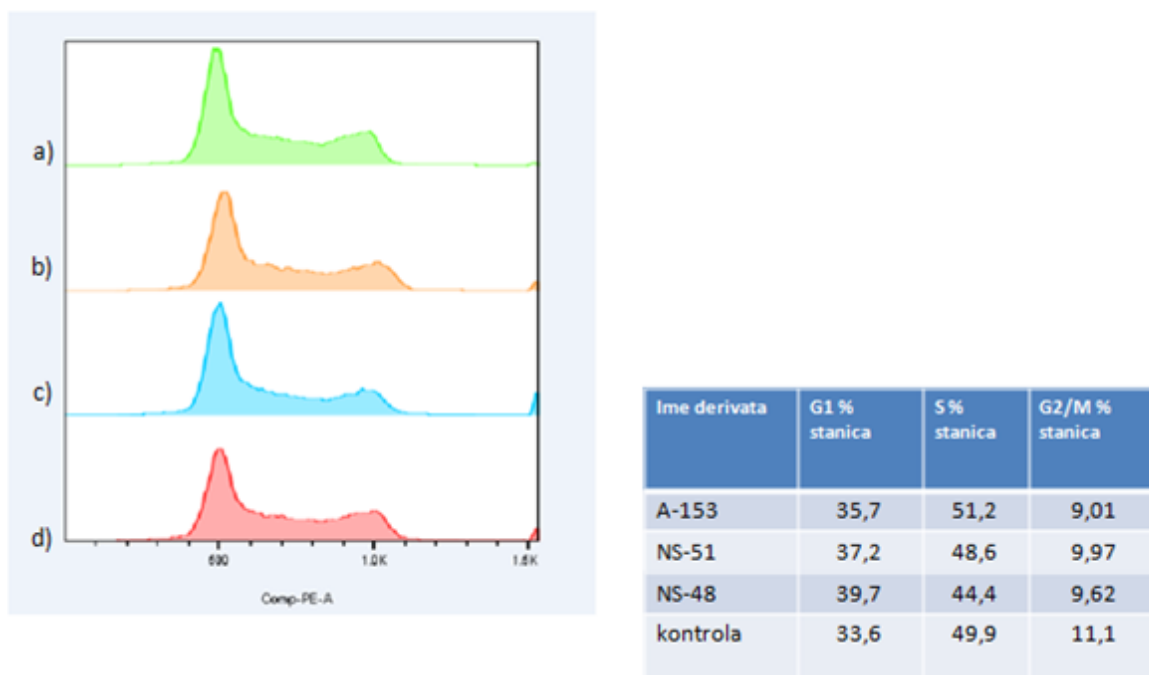
c)

K562 (A-153)



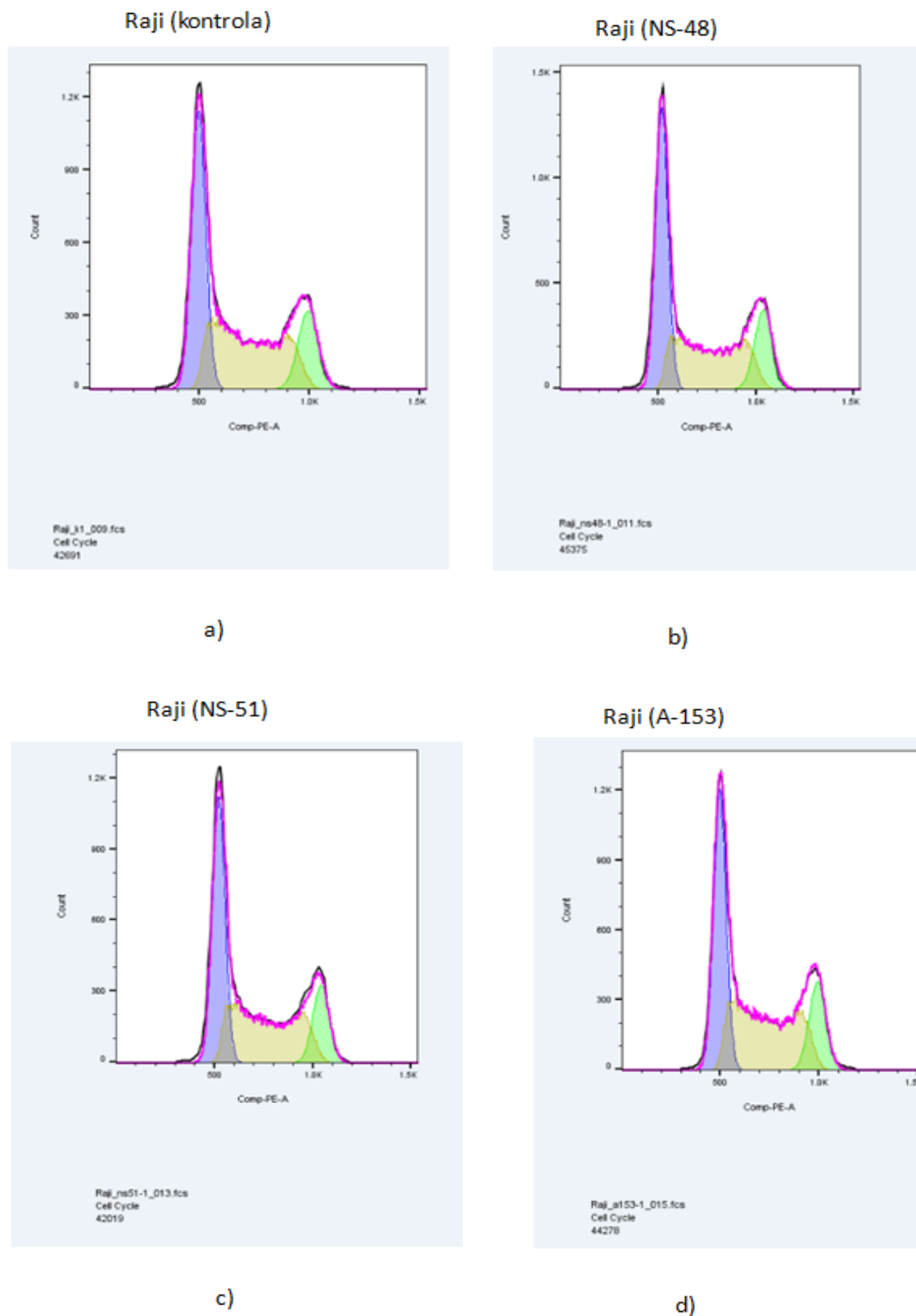
d)

Slika 11. Učinak derivata 6,7-dihidroksikumarina na stanice u staničnom ciklusu. Ispitivana stanična linija K562 izložena je djelovanju derivata NS-48 (b), NS-51 (c) i A-153 (d) u koncentraciji 5×10^{-6} M. Histogrami prikazuju učinak derivata kumarina na G1,S i G2/M faze ciklusa u odnosu na kontrolu (a).

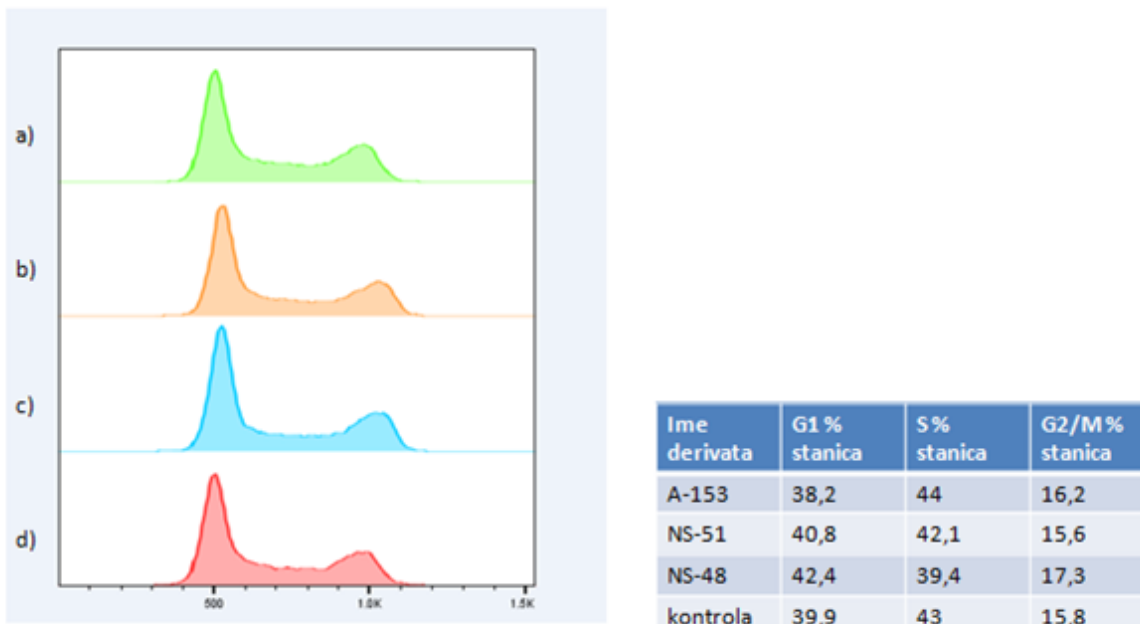


Slika 12. Histogramski prikaz usporedbe djelovanja derivata 6,7-dihidroksikumarina na staničnu liniju K562, te tablični prikaz s postotnim (%) udjelom stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa

Analizom staničnog ciklusa pomoću modela Watson, FlowJo programskog paketa, Raji kontrolne stanice najvećim su udjelom u S fazi s 43% stanica. Izloženost Raji stanica derivatu A-153 uzrokovao je skoro nezatno smanjenje broja stanica u G1 fazi (38,2%) u odnosu na kontrolne stanice, te povećanje broja stanica u S (44%) i G2/M (16,2%) fazi staničnog ciklusa. Derivat NS-51 minimalno djeluje na broj stanica u staničnom ciklusu povećavajući broj stanica u G1 fazi, te smanjujući broj stanica u S i G2/M fazi za manje od 1% u odnosu na netretirane stanice. Izloženost stanica derivatu NS-48 dovodi povećanja broja stanica u G1 i G2/M fazi te do smanjenja broja stanica u S fazi.



Slika 13. Učinak derivata 6,7-dihidroksikumarina na stanice u staničnom ciklusu. Ispitivana stanična linija Raji izložena je djelovanju derivata NS-48 (b), NS-51 (c) i A-153 (d) u koncentraciji 5×10^{-6} M. Histogrami prikazuju učinak derivata kumarina na G1,S i G2/M faze ciklusa u odnosu na kontrolu (a)



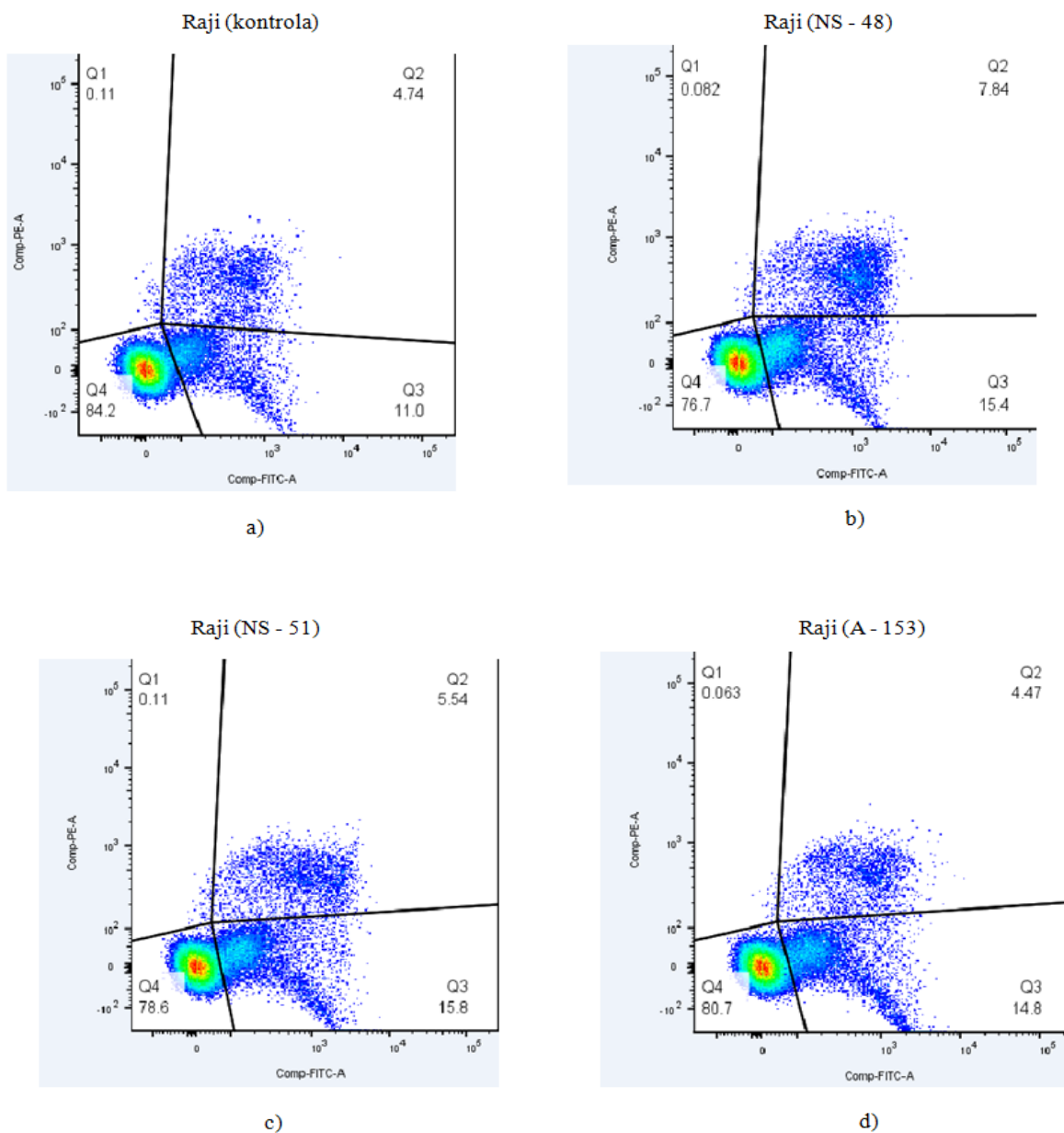
Slika 14. Histogramski prikaz usporedbe djelovanja derivata 6,7-dihidroksikumarina na staničnu liniju Raji, te tablični prikaz s postotnim (%) udjelom stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa

4.3. Utjecaj derivata 6,7-dihidroksikumarina na apoptozu stanica

Utjecaj derivata 6,7-dihidroksikumarina (NS-48, NS-51 i A-153) na apoptozu stanica ispitan je na staničnim linijama K562 i Raji. Stanice su bile izložene derivatima NS-48, NS-51 i A-153 u koncentraciji 5×10^{-6} . Kada se apoptoza pokrene stanice započinju translociranje fosfatidil-serina (PS) s unutarnje strane plazma membrane na površinu stanice. Prilikom translokacije stanice se mogu lako detektirati bojenjem fluorescentnim konjugatom Annexin V<, proteinom koji ima visoki afinitet za PS.

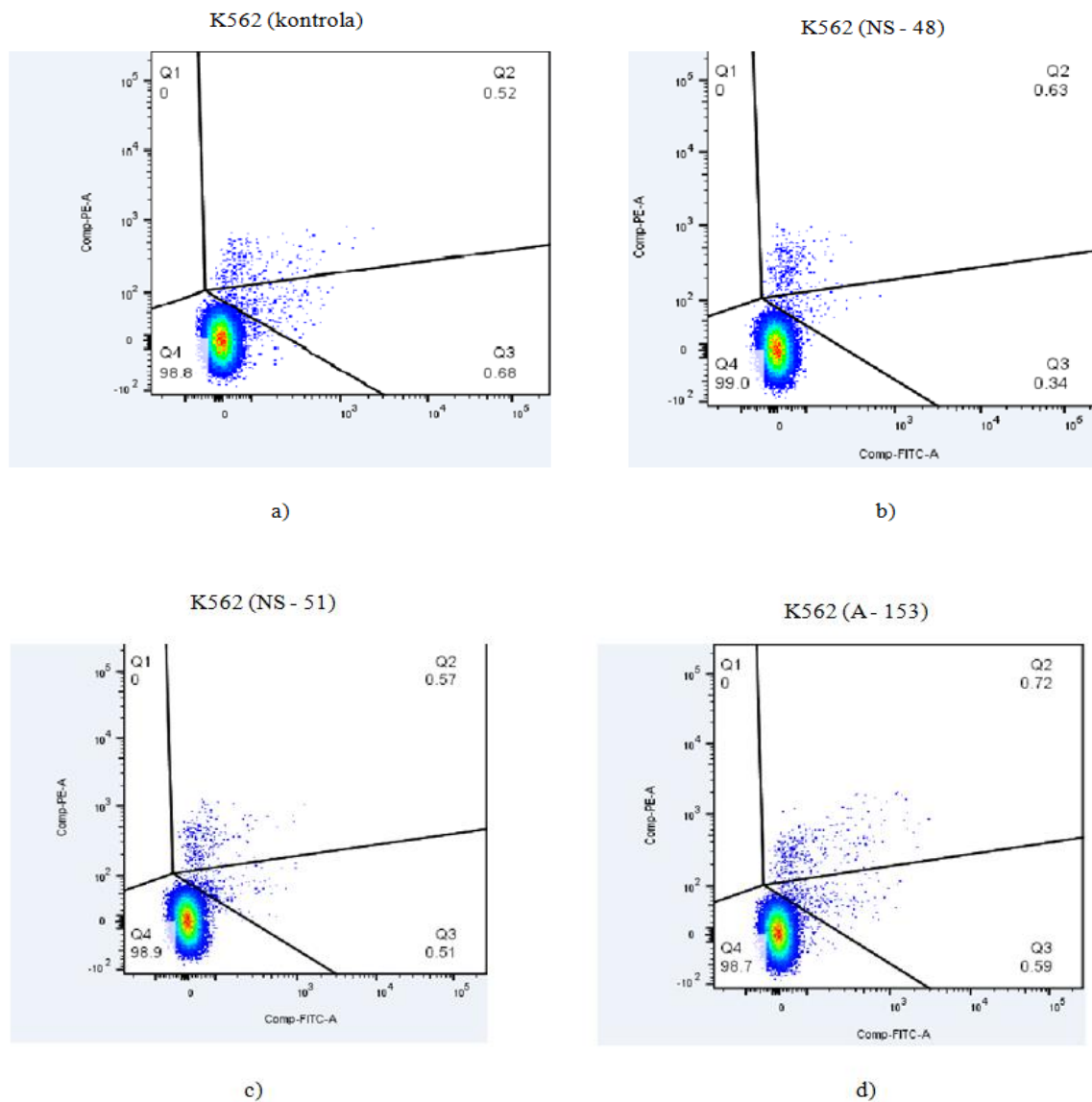
Mehanizam djelovanja NS-48 derivata na Raji stanice indukcija je apoptoze u 15,4% stanica i kasne apoptoze određene u 7,48% stanica. Potaknuta apoptoza od strane NS-51 derivata vidljiva je u 15,8 % Raji stanica sa 5,54% stanica u kasnoj apoptozi. Djelovanje

derivata A-153 na Raji stanice indikacija je apoptoze u 14,8% stanica kod kasne apoptoze određene u 4,47% stanica. Testirani derivati pokazuju povišeni udio stanica za oko 4% u apoptozi u odnosu na kontrolne netretirane stanice (slika 15).



Slika 15. Indukcija apoptoze u Raji stanicama tretiranim sa 6,7-dihidroksikumarinskim derivatima. Raji stanice izložene su djelovanju 6,7-dihidroksikumarinskih derivata u koncentraciji od 5×10^{-6} M kroz 24 sata. Slika prikazuje a) netretirane stanice, b) stanice tretirane sa NS-48, c) stanice tretirane sa NS-51 i d) stanice tretirane sa A-153.

Mehanizam djelovanja NS-48 derivata na K562 stanice indukcija je apoptoze u 0,34% stanica i kasne apoptoze određene u 0,63% stanica. Potaknuta apoptoza od strane NS-51 derivata vidljiva je u 0,51% K562 stanica sa zastupljenošću 0,57% stanica u kasnoj apoptozi. Djelovanje derivata A-153 na K562 stanice indikacija je apoptoze u 0,59% stanica kod kasne apoptoze određene u 0,72% stanica. Testirani derivati pokazuju da nema značajne promjene u apoptozi tretiranih stanica u odnosu na kontrolne netretirane stanice (slika 16).



Slika 16. Indukcija apoptoze u K562 stanicama tretiranim sa 6,7-dihidroksikumarinskim derivatima. K562 stanice izložene su djelovanju kumarinskim derivata u koncentraciji od 5×10^{-6} M kroz 24 sata. Slika prikazuje a) netretirane stanice, b) stanice tretirane sa NS-48, c) stanice tretirane sa NS-51 i d) stanice tretirane sa A-153.

5. RASPRAVA

Tumorska oboljenja jedna su od vodećih uzročnika smrtnosti, a kako do sada nije pronađen posve učinkovit lijek nameće se potreba za pronalaskom učinkovitijih molekula u suzbijanju tumorskih oboljenja (30). U svrhu pronalaska molekula koje će imati takva ljekovita svojstva, proveden je veliki broj istraživanja i to upravo na kumarinima. Različite vrste biljaka i biljni ekstrakti sadržavaju različite fitokemikalije sa biološkom aktivnošću koje mogu imati terapijski učinak. Nekoliko vrsta biljaka mogu pružiti određenu vrstu obrane protiv nekih vrsta raka te također stimulirati imunost sustav (11). Studije su dokazale da kumarini imaju visoku antiproliferativnu aktivnost te da induciraju apoptozu u različitim vrsta staničnih linija kao što su A549 (pluća), ACHN (bubreg), H727 (pluća), MCF-7 (dojka) te kod HL-60 (leukemija). Istraživanja također pokazuju da promjene u osnovnoj strukturi kumarina utječu i na farmakološka i biokemijska svojstva, uključujući i njegove terapijske primjene (31). Također je dokazano da je biološka aktivnost kumarina izoliranih iz prirodnih izvora povezana s niskom toksičnošću (32). U mehanizam djelovanja kumarina uključeno je inhibiranje telomerase, inhibiranje aktivnosti protein kinaze, te indukcija kaspaze 9 (33).

U ovom radu istraživao se utjecaj nosintetiziranih derivata kumarina, te njihov protutumorski učinak. Određen je njihov učinak na stanični rast, citotoksični učinak na odabranim tumorskim staničnim linijama, te njihova apoptotska aktivnost.

Određivanjem inhibicijskih učinaka na rast tumorskih stanica MTT testom svi testirani derivati kumarina (NS-48, NS-51 i A-153) u različitim koncentracijama pokazali su inhibitornu djelotvornost na rast stanica ispitivanih staničnih linija (CCRF-CEM, K562, Raji i Hut-78). Sumirajući rezultate, najizraženije citotoksično djelovanje spojeva je pri koncentraciji od 1×10^{-4} M na skoro sve stanične linije. Izuzetak jest stanična linija CCRF-CEM gdje derivat NS-51 ima najslabiji učinak na inhibiciju staničnog rasta od 30% koja je ostvarena pri najvišoj koncentraciji od 1×10^{-4} M. Najniži učinak na inhibiciju staničnog rasta ostvaren je pri koncentraciji od 1×10^{-6} M kod svih staničnih linija. Kostova i suradnici iznijeli su brojna izvješća o antiproliferativnim i antitumorskim aktivnostima različitih spojeva kumarina, kao npr. kumarin i 7-hidroksikumarin koji su pokazali da inhibiraju proliferaciju nekih ljudskih malignih staničnih linija *in vitro* (11). Prema Kolodzieju izrazitu citotoksičnost pokazuju kumarinski derivati sa orto-dihidroksi supstituentima (34). Nekoliko je hidroksiliranih i

metoksiliranih derivata kumarina ispitano u svrhu ispitivanja njihove citotoksičnosti na četiri humane tumorske stanične linije (karcinom HSC-2, HSC-3, melanom A-375 i promijelocitni HL-60) i tri normalne ljudske stanice (gingivalni fibroblast HGF, fibroblast parodontalnog ligamenta HPLF i stanice zubne pulpe HPC) (35). Specifična citotoksičnost prema tumorskim stanicama otkrivena je samo u 6,7- dihidroksi supstituiranim kumarinima. Također je uočeno da se citotoksičnost prema tumorskim stanicama kod prirodnog kumarina eskuletina (6, 7- dihidroksikumarin) može dodatno povećati pravilnim supstitucijama na 3 ili 4 poziciji na molekuli (11).

Proučavani derivati kumarina uzrokovali su na K562 leukemijskim stanicama blagi porast broja stanica u G1 i G2/M fazi staničnog ciklusa. Današnja istraživanja prikazuju komplekse rijetkih metala poput lantan klorida koji pokazuje antitumorsku aktivnost. Ovakvi kompleksi induciraju inhibiciju rasta stanica Burkittovog limfoma za oko 30% pri određenim koncentracijama (11). Također su jako zanimljivi *in vitro* rezultati studije kod K562 stanične linije, koju su izradili Kostova i suradnici. U toj studiji dalo se zaključiti kako kompleksi lantana sa određenim tvarima djeluju snažno inhibicijski na proliferaciju stanica. Preživljenje stanica izloženih takvim spojevima bilo je oko 30 % (11).

Apoptoza je od izuzetne važnosti za održavanje stanične homeostaze, a indukcija apoptoze poželjan je mehanizam umiranja stanica koje su izložene kemoterapeutcima (36). Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako djelovanje derivata kumarina nema značajne promjene kod tretiranih i kontrolnih K562 stanica. Rezultati apoptoze kod Raji stanične pokazali su povišeni udio stanica za oko 4% u apoptozi u odnosu na kontrolne netretirane stanice. 6,7-dihidroksikumarin (eskuletin) fenolni je spoj koji se nalazi u prirodnim biljnim proizvodima koji potiče apoptozu u nekoliko vrsta ljudskih stanica raka. Razna istraživanja pokazala su kako eskuletin selektivno inducira apoptozu tumorskih stanica kod različitih vrsta raka te se smatra obećavajućim kemoterapijskim sredstvom (37,38). Velik broj istraživanja sugerira da defekti apoptotičkih putova imaju ključnu ulogu u karcinogenezi i da su mnoge nove strategije liječenja usmjerene na apoptozu izvedive i mogu se koristiti u liječenju raznih vrsta raka (39).

Otkriće i razvoj učinkovitijih molekula protiv karcinoma dali su uvjerljive dokaze da biljke mogu biti izvor novih kemoterapijskih agensa raka. Iako prirodni produkt izoliran kao aktivni spoj i nije najprikladniji za razvoj kao djelotvorni lijek, može poslužiti kao primjer za pretvorbu u klinički korisno sredstvo (11).

Usporedbom rezultata dosadašnjih istraživanja, kumarinski derivati predstavljaju dobre kandidate u istraživanju novih spojeva s protutumorskim djelovanjem.

6. ZAKLJUČAK

- 1.) Derivati kumarina pokazuju značajno antiproliferativno i citotoksično djelovanje na odabranim tumorskim staničnim linijama
- 2.) Svi testirani derivati pokazuju izrazitu citotoksičnost pri najvećoj koncentraciji od 1×10^{-4} M
- 3.) Proučavani derivati kumarina uzrokovali su porast broja stanica u G1 fazi staničnog ciklusa na K562 staničnoj liniji i smanjenje broja stanica u S i G2/M fazi staničnog ciklusa, te porast broja stanica Raji stanične linije u G1 i G2 fazi staničnog ciklusa sa smanjenjem broja stanica u S fazi staničnog ciklusa
- 4.) Mehanizam djelovanja derivata 6,7-dihidroksikumarina na Raji staničnu liniju indukcija je apoptoze u oko 15% stanica, dok na K562 staničnoj linijinama značajne promjene

7. SAŽETAK

Uvod: Maligne bolesti jedan su od glavnih uzroka smrtnosti u svijetu, a njihova se stopa pojavnosti u populaciji sve više povećava. Kumarini su spojevi koji imaju inhibicijski učinak na određene tumorske stanice te upravo zbog tih svojih antitumorskih obilježja imaju potencijalnu primjenu u terapiji malignih bolesti.

Ciljevi istraživanja: Ispitati utjecaj derivata kumarina na rast normalnih stanica i stanica limfoma i leukemija *in vitro*. Odrediti promjene u staničnom ciklusu i način umiranja stanica.

Materijali i metode: Inhibitorni učinak derivata kumarina (NS-48, NS-51 i A-153) određen je MTT testom na komercijalno dostupnim linijama humanih tumorskih stanica (CCFR, K562, Raji i HuT-78) i normalnoj staničnoj liniji (MDCK1). Promjene staničnog ciklusa i apoptoze praćene su na staničnoj liniji K562 i Raji protočnim citometrom.

Rezultati: Testirani derivati kumarina pokazuju antiproliferativan i citotoksičan učinak na humane tumorske stanice. Inhibicija ovisi o koncentraciji spoja i staničnoj liniji. Na temelju rezultata može se zaključiti kako sva tri derivata kumarina djeluju inhibitorno na rast stanica pri koncentraciji od 1×10^{-4} M.

Zaključak: Derivati kumarina u ovisnosti prema koncentracijama i tipu stanica djeluju inhibitorno na rast stanica. Uočljive su i promjene staničnog ciklusa te apoptoze.

Ključne riječi: kumarin, leukemije, limfomi, citotoksičnost, stanični ciklus, apoptoza

8. SUMMARY

The effect of newly synthesized derivatives of 6,7-dihydroxycoumarins on the growth of leukemia and lymphoma cells *in vitro*

Introduction: Malignant diseases are one of the major causes of mortality in the world, and their incidence rate in the population is increasing. Coumarins are compounds that have an inhibitory effect on certain tumor cells and because of these anti-tumor properties they have potential use in the treatment of malignant diseases.

Study aim: To investigate the effect of coumarin derivatives on the growth of normal cells and lymphoma and leukemia cells *in vitro*. Determine changes in cell cycle and cell death.

Materials and Methods: The inhibitory effect of coumarin derivatives (NS-48, NS-51 and A-153) was determined by MTT assay on commercially available human tumor cells (CCRF, K562, Raji and Hut-78) and normal cell line (MDCK1). The alterations of the cell cycle have been monitored by flow cytometry on the K562 and Raji cell lines.

Results: The coumarin derivatives show antiproliferative and cytotoxic effects on human tumor cells. The inhibition depends on the concentration of the compound and the cell line used. Based on the results it can be concluded that all three coumarin derivatives act to inhibit cell growth at a concentration of 1×10^{-4} M.

Conclusion: Coumarin derivatives depending on concentrations and type of cell, inhibit cell growth. Cell cycle and apoptosis changes are also apparent.

Keywords: coumarin, leukemias, lymphoma, cytotoxicity, cell cycle, apoptosis

9. LITERATURA

1. Nitulescu GM, Margina D, Juzenas P, Peng Q, Olaru OT, Saloustros E, i sur. Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *Int J Oncol.* 2016 Mar;48(3):869-85.
2. Xu L. i sur. *The Study on Biological and Pharmacological Activity of Coumarins* Atlantis Press, 2015, 9, 135-138.
3. Molnar M, Čačić M. Biološka aktivnost derivata kumarina – pregledni rad. *Croat J Food Sci Technol.* 2013;3:55–64.
4. Jain PK i sur. Coumarin: Chemical and pharmacological profile. *J. Appl. Pharm. Sci,* 2012, 2, 236-240.
5. Kumar KA, Renuka N, Pavithra G, Kumar GV. Comprehensive review on coumarins: Molecules of potential chemical and pharmacological interest. *J Chem Pharm Res.* 2015;7(9):67–81.
6. Matos JM, Santana L., Uriarte E, Abreu OA, Molina E., Yordi EG, *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health.* 2015, 1, 113-140
7. K. N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. *BioMed. Res. Int.,* 2013, 2013, 1-14.
8. M. Molnar, M. Čačić, *Croat. J. Food Sci. Technol.,* 2011, 3, 55-64
9. Medina FG, Marrero JG, Macías-Alons, M. C. Gonzalez, I. Córdova-Guerrero, A. G. Teissier García, S. Osegueda-Robles. Coumarin heterocyclic derivatives: chemical synthesis and biological activity. *Natural Product Reports,* 2015, 32, 1472–1507
10. Katsori A-M, Hadjipavlou-Litina D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2012-2014). *Expert Opin Ther Pat.* 2014;24(12):1323–47.
11. Kostova, I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents, *Curr. Med. Chem. Anti Canc. Agents.* 2005, 5, 29-46.
12. Ramesh B, Pugalendi KV. Umbelliferone in STZ-diabetic rats, *Yale J. Biol. Med.* 2005, 78, 131-138.
13. Lacy A, O’Kennedy R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer, *Curr. Pharm. Des.* 2004, 10, 3797-3811.
14. E. Vrdoljak, M. Šamija, Z. Kusić, M. Petković, D. Gugić, Z. Krajina: *Klinička onkologija,* Medicinska naklada, Zagreb, 2013.

15. Sertić J. Klinička kemija i molekularna dijagnostika. Medicinska naklada. Zagreb, 2008.
16. Schnerch D, Yalcintepe J, Schmidts A i sur. Cell cycle control in acute myeloid leukemia. *Am J Cancer Res.* 2012;2:508-28.
17. Cooper GM, Hausman RE. Stanica, molekularni pristup. 4. izd. Medicinska naklada Zagreb 2004. str. 653-79.
18. Pollard T, Earnshaw W, Lippincott-Schwartz JGJ. Cell biology. 3. izdanje. Philadelphia: Elsevier; 2017.
19. Bruce A, Alexander J, Julian L, Martin R, Keith R, Peter W. Molecular Biology of the cell. 5. izdanje. New York: Garland Science; 2008.
20. Vrdoljak ED, Šamija MR i sur. Klinička onkologija. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str. 1-8.,
21. Van den Heuvel, S. Cell-cycle regulation (September 21, 2005), WormBookm The C.elegans Researsch Community, Wormbook, doi/10.1895/wormbook.1.28.1, <http://www.wormbook.org>.
22. Diaz-Moralli S, Tarrado-Castellarnau M, Miranda A, Cascante M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 2013;138:255–71.
23. Zhang Y, Herman B. Ageing and apoptosis. *Mech Aeing Dev* 2002;123:245-60.
24. Žlender V. Apoptoza - programirana smrt stanice. *Arh Hig Rada Toksikol.* [Internet]. 04.02.2004. [pristupljeno 28.08.2018.];54(4):267-274. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/344>
25. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(4), 495– 516.
26. Janković M, Markotić A. Virusi i apoptoza. *Infektološki glasnik* [Internet]. 30.06.2007. [pristupljeno 28.08.2018.];27(2):63-70. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/17840>
27. Ulukaya E., Acilan C., Ari F., Ikitimur E., Yilmaz Y. A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively. *Turk J Biochem.* 2011; 36 (3); 261–269 .
28. Karch J, Molkenin JD. Regulated necrotic cell death: The passive aggressive side of Bax and Bak. *Circ Res.* 2015 May 22;116(11):1800–9.
29. Sun L, Wang X. A new kind of cell suicide: mechanisms and functions of programmed necrosis. *Trends Biochem Sci.* 2014 Dec;39(12):587–93.

30. Mendelsohn J, Gray JW, Howley PM, Israel MA, Thompson CB. The Molecular Basis of Cancer: Fourth Edition. Elsevier Inc., 2014. 863 p
31. Musa MA, Badisa VL, Latinwo LM, Cooperwood J, Sinclair A, Abdullah A. Cytotoxic activity of new acetoxycoumarin derivatives in cancer cell lines. *Anticancer Research/Open Access Articles*, 2011, 31.6: 2017-2022.
32. Sharma A, Gupta M. Underlying mechanisms of Anticancer Coumarins : An overview. 2018;6(3):361–70.
33. Amin KM, Taha AM, George RF, Mohamed NM, Elsenduny FF. Synthesis, antitumor activity evaluation, and DNA-binding study of coumarin-based agents. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2018;351(1):1–18.
34. Kolodziej H, Kayser O. Antibacterial Activity of Simple Coumarins: Structural Requirements for Biological Activity. *Zeitschrift fur Naturforschung*. March 1999 C 54(3-4):169-74.
35. Kawase M, Sakagami H, Hashimoto K, Tani S, Hauer H, Chatterjee SS. Structure-cytotoxic activity relationships of simple hydroxylated coumarins. *Anticancer research* 23 4 (2003): 3243-6.
36. Sherr CJ. *Cancer Cell Cycles*. *Science*. 1996;274:1672–1677.
37. Rubio V, Calviño E, García-Pérez A, Herráez A, Diez JC. Human acute promyelocytic leukemia NB4 cells are sensitive to esculetin through induction of an apoptotic mechanism. *Chem Biol Interact*. 2014, 220:129-139
38. Chu CY, Tsai YY, Wang CJ, Lin WL, Tseng TH. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells. *Eur J Pharmacol*. 2001, 416 (1-2), 25-32.
39. Wong SY R. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011; 30(1): 87.

10. ŽIVOTOPIS

Matea Matic

Datum i mjesto rođenja: 25. srpnja 1994., Dubrovnik

Broj telefona: 098/932-7537

E-mail: mateamatic14@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- 2001.-2009. Osnovna škola Kardinala Stepinca, Neum
- 2009.-2013. Jezična gimnazija, Metković
- 2013.-2016. Preddiplomski stručni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu
- 2016. – 2018. Diplomski sveučilišni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku